การศึกษาคุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียเขตรากพืช จากระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่มีศักยภาพในการควบคุมชีวิต *Pythium* spp.

STUDY ON SOME CHARACTERISTICS OF SELECTED RHIZOSPHERE BACTERIA IN HYDROPONICS FOR THEIR CONTROLLING OF *Pythium* spp.

จักรพงษ์ พรั่งอริญ

CHAKRAPONG RANGJAROEN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-M-051-028

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาคุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียเขตรากพืช จากระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp.

STUDY ON SOME CHARACTERISTICS OF SELECTED RHIZOSPHERE BACTERIA IN HYDROPONICS FOR THEIR CONTROLLING OF *Pythium* spp.

T105507

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ

CHAKRAPONG RANGJAROEN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....105507
วัน,เดือน,ปี.....24 พ.ย. 2552

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2009-AG-M-061-028

STUDY ON SOME CHARACTERISTICS OF SELECTED RHIZOSPHERE BACTERIA IN HYDROPONICS FOR THEIR CONTROLLING OF *Pythium* spp.

CHAKRAPONG RANGJAROEN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN PLANT PEST MANAGEMENT TECHNOLOGY

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2009-AG-M-061-028

COPYRIGHT 2009
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียเขตรากพืชจากระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp.
ชื่อนักศึกษา	นายจักรพงษ์ หรั่งเจริญ
รหัสประจำตัว	49065502
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.พรหมมาศ ดูหากาญจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.ถนิมนันต์ เจนอักษร ดร.นงลักษณ์ เภรินทวงค์

บทคัดย่อ

แยกแบคทีเรียจากบริเวณเขตรากพืชที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบต่างๆ ในประเทศไทยจำนวน 741 สายพันธุ์ นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pythium aphanidermatum* และ *Pythium myriotylum* สาเหตุโรครากเน่า โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วม พบแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้จำนวน 222 สายพันธุ์ จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งครั้งนี้ มาทดสอบผลกระทบต่อพืช ด้วยการเพาะเมล็ดที่ใส่ด้วย bacterial suspension แต่ละสายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผ่านการทดลองที่ทำให้พืชทดสอบมีค่าดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าเทียบเท่าหรือสูงกว่ากลุ่มทดลองควบคุมมีจำนวน 121 สายพันธุ์ แบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบนี้ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี แล้วนำมาทดสอบซ้ำถึงความคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* การทดสอบพบว่ามีแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวจำนวน 88 สายพันธุ์ ได้นำมาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินขนาดเล็ก (lab scale hydroponics) จนได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพจำนวน 30 สายพันธุ์ จากนั้นนำไปทดสอบในระบบปลูกพืชแบบ solution culture แล้วคัดเลือกให้เหลือแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพดีที่สุดซึ่งได้แก่สายพันธุ์ ECO 008, ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025 และ SSWC 110 ในการคัดเลือกขั้นสุดท้ายแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวได้นำไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในระบบปลูกพืชแบบ nutrient film technique พบว่ามีแนวโน้มในการควบคุมโรคได้เป็นอย่างดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษากลไกของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Py. myriotylum* พบว่า แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีกลไกการยับยั้งเชื้อแบบ antibiosis โดยการสร้างสาร secondary metabolite ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า ซึ่งในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย พบว่าส่วนของ purified cell และ cell culture เป็นส่วนออกฤทธิ์ที่สำคัญ ในขณะที่ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยในส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate แต่อย่างใด การศึกษาความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *Py. myriotylum*. ที่สัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ ECO008, ERO001, EWC065, RCO010, RWC021, SSMIX013, SSMIX020, SSMIX023 และ SSMIX025 ด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์ พบความผิดปกติได้แก่ การแตกแขนงของเส้นใยผิดปกติ การเคลื่อนที่ของ cytoplasm ผิดปกติ จนส่งผลให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคแตก โดยเฉพาะส่วนปลายของเส้นใย

คุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยทดลองในพืช *Lactuca sativa* cv. Butter head และ *Lactuca sativa* cv. Red coral พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวคือ ECO 008, ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025 และ SSWC 110

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพทั้ง 10 สายพันธุ์โดยใช้ลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร คุณสมบัติทางกายภาพ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยานั้นสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้เป็น 2 สกุลคือ *Bacillus* และ *Pseudomonas* นอกจากนั้นได้ดำเนินการจัดจำแนกโดยนำมาเทียบความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน 16S rRNA กับธนาคารพันธุกรรม (www.ncbi.nlm.nih.gov) สามารถจำแนกได้เป็น *Pseudomonas* sp. 2 สายพันธุ์ คือ ECO 008 (GQ926880) และ SSWC 110 (GQ926881) และ *Bacillus* sp. 8 สายพันธุ์ คือ ERO 001 (GQ926882), EWC 065 (GQ926883), RCO 010 (GQ926884), RWC 021 (GQ926885), SSMIX 013 (GQ926886), SSMIX 020 (GQ926887), SSMIX 023 (GQ926888) และ SSMIX 025 (GQ926889)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Study on some characteristics of selected rhizosphere bacteria in hydroponics for their controlling of *Pythium* spp.
Student	Mr. Chakrapong Rangjaroen
Student ID.	49065502
Degree	Master of Science
Program	Plant Pest Management Technology
Year	2009
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Prommart Koohakan
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Tanimnun Jaenaksorn
	Dr. Nonglak Parinthawong

ABSTRACT

Seven hundred and forty one rhizobacteria were isolated from hydroponic crop roots and various hydroponic growing systems. The obtained isolates were firstly screened *in vitro* against *Pythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum*, causal agents of plant root rot, using bi-culture test. 221 promising isolates were selected and then evaluated for their detrimental effects on *Lactuca sativa* L. using seedling bioassay. On the basis of *in vitro* seedling bioassay screening, 121 isolates showed insignificantly different from healthy control and no toxicity on plant was detected. After being stored in freezer at -20 °C for 1 year, the 121 qualified isolates were *in vitro* biological control tested against the *Pythium* once again. 88 of 121 isolates showed their consistency in inhibiting the pathogen. Lab-scale hydroponics test for controlling the Pythium root rot was conducted and 30 isolates were selected accordingly. Furthermore, the isolates screening were continued in solution culture test and 10 isolates namely ECO 008, ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025 and SSWC 110 were obtained. The efficiency of the 10 isolates for controlling Pythium root rot was determined in Nutrient Film Technique using *L. sativa* L. cv. Red coral and *L. sativa* L. cv. Butter head. The result showed that all 10 isolates tended to be effective in reducing Pythium root rot.

Regarding the mode of action of antagonistic rhizobacteria against Pythium root rot, it revealed that cell culture and purified cells were the active part to inhibit the growth of pathogen. Microscopic observation showed that the pathogen hyphal tips were destroyed resulting in cell death later on by the potential rhizobacteria isolates, namely ECO 008, ERO 001, EWC 065,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 and SSMIX 025. In terms of crop growth, an increase was noted both in *L. sativa* L. cv. Red coral and *L. sativa* L. cv. Butter head after being applied with the above mentioned-potential rhizobacteria.

Based on the morphological, physiological characteristics and partial sequencing of signature regions at 16s rRNA gene, the obtained potential rhizobacteria were classified as *Pseudomonas* sp. ECO 008 (GQ926880) and SSWC 110 (GQ926881), *Bacillus* sp. ERO 001 (GQ926882), EWC 065 (GQ926883), RCO 010 (GQ926884), RWC 021 (GQ926885), SSMIX 013 (GQ926886), SSMIX 020 (GQ926887), SSMIX 023 (GQ926888) and SSMIX 025 (GQ926889)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุดฤดี ประเทืองวงค์ และ รศ.ดร.อิทธิสุนทร นันทกิจ กรุณาแนะนำในการดำเนินการจัดทำวิทยานิพนธ์ให้เป็นไปด้วยดี ขอบพระคุณ ผศ.ดร.พรหมมาศ ดูหากาญจน์ อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.ถนิมนันต์ เจนอักษร และ ดร.นงลักษณ์ เภรินทวงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ประจำปี 2551 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบพระคุณ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข นพ. ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ ที่ให้การอนุเคราะห์ในการเข้าใช้สถานที่ และ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการปฏิบัติงาน .รวมไปถึงเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยยาสูบ แม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดยาสูบเพื่อใช้ศึกษาและวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ชัยสิทธิ ปรีชา ดร. สุพจน์ กาเซ็ม คุณวิลาวรรณ์ เชื้อบุญ (ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) ดร.ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ (Texas A&M University, Texas, USA) ผศ. มานพ นชะพงษ์ (สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช, สจล.) ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่อยู่ในฝ่ายแบคทีเรียทั่วไป (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข) คุณพิสมัย เรืองบุพผา คุณจรงศักดิ์ พุมนวล คุณชัชฎา ยังนิตย์ คุณกรุณา ชมชาติ คุณกิตติพันธ์ สมนึก คุณปิยชาติ แสงศาสตร์ (สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช, สจล.) คุณฉันทวัฒน์ อาชวาคม (สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์, สจล.) คุณวิทิดา สาธิตโกวิทชัย คุณกฤตพร รำจวนเกียรติ และคุณพันธิพา แทนกุดเรือ (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร สจล.) ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการศึกษาทดลอง ประสบการณ์ และข้อคิดต่างๆ ที่ทำให้การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้เป็นไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา เป็นอย่างมาก ในความรัก ความเข้าใจ กำลังใจ การอุปการะเลี้ยงดู และทุกสิ่งทุกอย่างที่ท่านได้ให้ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือปฏิบัติงานจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงคุณนิภาพร หรั่งเจริญ ที่ให้ความรัก ข้อคิดการดำเนินชีวิตให้อยู่รอดในสังคมปัจจุบัน ข้าพเจ้าหวังว่าเนื้อหาที่อยู่ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะเกิดประโยชน์ไม่มากก็น้อยกับส่วนรวม และผู้ที่ได้อ่าน มากกว่าประโยชน์ส่วนตัวที่ข้าพเจ้าได้รับ

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ

2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	XI
สารบัญภาพ	XIV
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน	2
1.4 ขั้นตอนการศึกษา	3
1.5 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช	4
2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช กับพืช	5
2.2.1 ชนิดพืช	6
2.2.2 อายุ และการพัฒนาการของพืช	7
2.2.3 การเจริญของพืช	7
2.2.4 ชนิด และปริมาณจุลินทรีย์	8
2.3 กลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช	8
2.3.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ	8
2.3.2 การการสลายตัวจากระบบการสื่อสารระหว่างเซลล์	9
2.3.3 การแข่งขันการใช้ธาตุเหล็ก	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.4 การชักนำให้เกิดความต้านทาน..... 10

2.3.5 ส่งเสริมการเจริญเติบโต และช่วยในการดูดซึมธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช.. 11

2.4 โรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* spp. (Pythium root rot) ในระบบปลูกพืช..... 12

2.4.1 ลักษณะของเชื้อ *Pythium* spp. 12

2.4.2 การเข้าทำลายพืชจากเชื้อ *Pythium* spp. 14

2.4.3 ความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *Pythium* spp. 14

2.5 การควบคุมโรครากเน่าสาเหตุจาก *Pythium* spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช..... 15

2.6 วิธีการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย..... 20

2.6.1 การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ 20

2.6.2 ลักษณะทางสันฐานวิทยา..... 21

2.6.3 ส่วนประกอบของผนังเซลล์..... 21

2.6.4 การทดสอบทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี 21

2.6.5 การทดสอบทางเซรุ่มวิทยา (Serology)..... 22

2.6.6 Chemoxonomic marker..... 24

2.6.7 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคด้าน nucleic acid..... 24

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 26

3.1 การแยกเชื้อ *Pythium* spp. จากผักกินใบ..... 26

3.2 การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคจากเชื้อ *Pythium* spp. 28

3.3 การแยกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช (rhizosphere bacteria)..... 31

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช ในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. ด้วยวิธี bi-culture test. 35

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืชด้วยวิธี seeding bioassay..... 38

3.6 การทดสอบยืนยันความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์..... 39

3.7 การทดสอบประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ..... 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ solution culture 42

3.9 การทดสอบประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ NFT..... 45

3.10 การศึกษากลไกในการยับยั้งเชื้อ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ ด้วยวิธี agar disk diffusion..... 48

3.11 การศึกษากลไกในการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์..... 51

3.12 การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดย แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในระบบปลูก..... 52

3.13 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งโรค ด้วยวิธี split root technique 53

3.14 การศึกษาลักษณะโคโลนี และคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มี ศักยภาพบนอาหารทดสอบ..... 55

3.15 การจัดจำแนกชนิด ของแบคทีเรีย โดยทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการ..... 56

3.16 การจัดจำแนกชนิด ของแบคทีเรีย โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และ คุณสมบัติทางสรีรวิทยา..... 59

3.17 การจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ด้วยวิธี 16s rRNA..... 65

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 74

4.1 การแยกเชื้อ *Pythium* spp. จากผักกินใบ..... 74

4.2 การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคจากเชื้อ *Pythium* spp. 77

4.3 การแยกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช (rhizosphere bacteria)..... 81

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการยับยั้งการ เจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. ด้วยวิธี bi-culture test..... 94

4.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืชด้วยวิธี seeding bioassay..... 98

4.6 การทดสอบยืนยันความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์..... 104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.7 การทดสอบประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ..... 105

4.8 การทดสอบประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ solution culture..... 112

4.9 การทดสอบประสิทธิภาพ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ NFT..... 117

4.10 การศึกษากลไกในการยับยั้งเชื้อ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ ด้วยวิธี agar disk diffusion..... 121

4.11 การศึกษากลไกในการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์..... 134

4.12 การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดย แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในระบบปลูก..... 138

4.13 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งโรค ด้วยวิธี split root technique 144

4.14 การศึกษาลักษณะโคโลนี และคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มี ศักยภาพบนอาหารทดสอบ..... 147

4.15 การจัดจำแนกชนิด ของแบคทีเรีย โดยทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการ..... 151

4.16 การจัดจำแนกชนิด ของแบคทีเรีย โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และ คุณสมบัติทางสรีรวิทยา..... 153

4.17 การจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ด้วยวิธี 16s rRNA..... 158

บทที่ 5 วิจารณ์การทดลอง..... 185

5.1 การแยกเชื้อ และความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคจากเชื้อ *Pythium* spp. 185

5.2 แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช 186

5.3 การคัดเลือกแบคทีเรียเขตรากพืชในการควบคุมโรคจากเชื้อ *Pythium* spp. 187

5.4 กลไกของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. 188

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.4.1 การสร้างสาร secondary metabolit 188

5.4.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช..... 190

5.4.3 อื่นๆ..... 191

5.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. 192

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 194

6.1 การคัดเลือกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp.ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน..... 194

6.2 กลไกของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* spp. 195

6.3 การจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศัยภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp.ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน..... 195

บรรณานุกรม..... 196

ภาคผนวก..... 209

ประวัติผู้เขียน..... 255

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ตัวอย่างพืชที่นำมาทำการแยกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชในแบบต่างของระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน..... 32

4.1 ความแตกต่างของเชื้อ *Pythium* spp. ตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร potato dextrose agar..... 75

4.2 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณเขตรากพืชตามการอาศัยอยู่ของแบคทีเรีย..... 81

4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหาร nutrient agar ของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช..... 85

4.4 จำนวนแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อ *Pythium myriotyrum* และ *Pythium aphanidermatum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA..... 95

4.5 ค่าการเจริญเติบโต และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าของพืชทดสอบที่ทรีตด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากระบบ DFT..... 99

4.6 ค่าการเจริญเติบโต และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าของพืชทดสอบที่ทรีตด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากระบบ DRFT..... 101

4.7 ค่าการเจริญเติบโต และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าของพืชทดสอบที่ทรีตด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากระบบ NFT..... 102

4.8 ค่าการเจริญเติบโต และดัชนีความแข็งแรงของต้นของพืชทดสอบที่ทรีตด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากระบบ Substrates..... 104

4.9 ค่าเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง bacilli ที่สร้างสปอร์ในการยับยั้งเชื้อโดยการปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ..... 107

4.10 ค่าเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง bacilli ที่ไม่สร้างสปอร์ในการยับยั้งเชื้อโดยการปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ..... 109

4.11 ค่าเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง cocci ในการยับยั้งเชื้อโดยการปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ..... 109

4.12 ค่าเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง rod (anaerobic) ในการยับยั้งเชื้อโดยการปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ..... 109

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.13 ค่าเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง rod (aerobic) ในการยับยั้งเชื้อโดยการปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ.. 110

4.14 ค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรคในการยับยั้งเชื้อ *P. myriotylum* โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ solution culture..... 113

4.15 ค่าเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *P. myriotylum* โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ solution culture..... 114

4.16 ค่าการเจริญเติบโตของพืชทดสอบในการควบคุมเชื้อ *P. myriotylum* โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ solution culture..... 115

4.17 กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 24 ชั่วโมง..... 124

4.18 กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 48 ชั่วโมง..... 125

4.19 กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 96 ชั่วโมง..... 126

4.20 กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 192 ชั่วโมง..... 127

4.21 กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 24 ชั่วโมง..... 128

4.22 กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 48 ชั่วโมง..... 129

4.23 กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 96 ชั่วโมง..... 130

4.24 กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 192 ชั่วโมง..... 131

4.25 ค่าการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Butter head ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ NFT ครั้งที่ 1..... 140

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.26 ค่าการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Butter head ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ NFT ครั้งที่ 2..... 141

4.27 ค่าการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Red coral ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ NFT ครั้งที่ 1..... 142

4.28 ค่าการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Red coral ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ NFT ครั้งที่ 2..... 143

4.29 ลักษณะการเจริญบนอาหารบางชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ..... 149

4.30 คุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ..... 152

4.31 คุณสมบัติทางชีวเคมี และทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ..... 154

4.32 การจัดหมวดหมู่ของเชื้อตั้งแต่ระดับ domain จนถึง genus จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Ribosomal Database Project..... 184

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	บริเวณเขตราก และแบคทีเรียเขตรากพืช.....	5
2.2	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ส่งผลต่อบริเวณเขตรากพืช	6
2.3	วงจรการเข้าทำลายของเชื้อ *Pythium* spp.	12
3.1	อาการรากเน่าที่ปรากฏจากระดับความรุนแรงของการเกิดโรค.....	30
3.2	ตัวอย่างระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน.....	33
3.3	แผนภาพการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปริเวณเขตรากพืช ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aphanidermatum* ด้วยวิธี bi-culture test.....	36
3.4	แผนภาพการทดสอบกลไกของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพด้วยวิธี agar disk diffusion.....	50
3.5	แผนภาพการทดสอบกลไกของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *Pyhtium* sp. ด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่น.....	52
3.6	แผนภาพการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งโรครากเน่าด้วยเทคนิค split-root technique	54
4.1	ลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีเชื้อ *Pythium* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA.....	76
4.2	อาการโรครากเน่าใน *L. sativa* cv. Butter head หลังจากปลูกเชื้อไอโซเลท PGO 011, PGO 014 และ PGO 016 เป็นเวลา 5 วันเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ....	77
4.3	อาการโรครากเน่าใน *L. sativa* cv. Red oak หลังจากปลูกเชื้อไอโซเลท PGO 014 และ PGO 016 เป็นเวลา 5 วันเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ.....	78
4.4	ส่วนประกอบของเชื้อ *Pythium aphanidermatum*	79
4.5	ส่วนประกอบของเชื้อ *Pythium myriotylum*	80
4.6	รูปร่างของโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง.....	84
4.7	ลักษณะการเจริญบนอาหาร nutrient agar ของแบคทีเรียเขตรากพืชแกรมบวก	92
4.8	ลักษณะการเจริญบนอาหาร nutrient agar ของแบคทีเรียเขตรากพืชแกรมลบ	93
4.9	ตัวอย่างแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *Pythium spp.* ด้วยวิธี bi-culture test.....	97
4.10	ตัวอย่างแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการทดสอบความเป็นพิษกับพืช.....	98
4.11	การจัดกลุ่มตามการติดสีแกรม และคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คาดว่าจะมีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp.	105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.12 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโดยการปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ..... 111

4.13 การเจริญเติบโตของพืชทดสอบในการควบคุมเชื้อ *P. myriotylum* โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ solution cultureของสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือก... 116

4.14 ปลูกพืชแบบ Nutrient Film Technique ที่ใช้ในการทดสอบ..... 118

4.15 ค่าดัชนีการเกิดโรครากเน่า จากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *L. sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT ครั้งที่ 1..... 119

4.16 ค่าดัชนีการเกิดโรครากเน่า จากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *L. sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT ครั้งที่ 1..... 119

4.17 ค่าดัชนีการเกิดโรครากเน่า จากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *L. sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT ครั้งที่ 2..... 120

4.18 ค่าดัชนีการเกิดโรครากเน่า จากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *L. sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT ครั้งที่ 2..... 120

4.19 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method ที่ 192 ชั่วโมง..... 132

4.20 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method ที่ 192 ชั่วโมง..... 133

4.21 กลไกของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *P. myriotylum* บนแผ่นกระจกสไลด์โดยใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุเท่ากับ 10× 136

4.22 กลไกของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *P. myriotylum* บนแผ่นกระจกสไลด์โดยใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุเท่ากับ 40× 137

4.23 ค่าการยับยั้งโรครากเน่าจากแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชด้วยวิธี split-root technique. 145

4.24 การยับยั้งโรครากเน่าจากแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชด้วยวิธี split-root technique ... 146

4.25 ลักษณะโคโลนี และคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ..... 150

4.26 คุณสมบัติสัณฐานวิทยาบางประการของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ..... 152

4.27 คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการ ของแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ..... 156

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.28	คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการ ของแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ.....	157
4.29	ผลสกัด Chromosomal DNA แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. .	158
4.30	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp.	159
4.31	ผลของพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene และการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I และ *Bam* HI.	160
4.32	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท ECO 008 ที่มีความเหมือนกับเบสของ*Pseudomonas putida* strain J312 (GenBank No.: EF203210).....	163
4.33	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท ERO 001 ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682).....	165
4.34	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท EWC 065 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682).....	167
4.35	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท RCO 010 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus licheniformis* (GenBank No.: AY971527).....	169
4.36	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท RWC 021 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682).....	171
4.37	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท SSMIX 013 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682).....	173
4.38	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท SSMIX 020 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain DYU1 16S (GenBank No.: EF442670)..	175
4.39	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท SSMIX 023 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682).....	177
4.40	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท SSMIX 025 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682).....	179
4.41	ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท SSWC 110 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Pseudomonas putida* strain BM2 (GenBank No.: DQ989291)...	181
5.1	จำนวนไอโซเลทการคัดเลือกแบคทีเรียเขตรากพืชในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp.	188

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปัจจุบันการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ถือได้ว่าเป็นการทำการเกษตรทางเลือกแนวใหม่ที่กำลังได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากสามารถเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรได้ดี อย่างไรก็ตามในการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินนี้ยังประสบปัญหาจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Pythium* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่า (Spadaro and Gullino. 2005; Calvo-Bado *et al.* 2006; Liu *et al.* 2007) ในการป้องกันกำจัดโดยทั่วไปแล้วนิยมใช้สารเคมี แต่การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอาจส่งผลกระทบต่างๆ ตามมา เช่น การที่เชื้อโรคปรับตัวให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดศัตรูพืช การตกค้างในสภาพแวดล้อมและผลผลิต รวมทั้งส่งผลเสียต่อสุขภาพผู้บริโภคอีกด้วย เหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ต้องมีการค้นคว้าหาวิธีการควบคุมต่างๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี หรือไม่ก็ลดปริมาณการใช้สารเคมีให้น้อยลง ไม่ว่าจะเป็นการใช้วิธีทางกายภาพ (physical methods) เช่น การใช้แสงอัลตราไวโอเลท แต่พบปัญหาเรื่องความสามารถของพืชในการนำสารละลายธาตุอาหารมาใช้ได้ลดลง เพราะจะทำให้เกิดปฏิกิริยากับแร่ธาตุบางชนิดที่มีอยู่ในสารละลายธาตุอาหาร อีกทั้งยังทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์กับพืชอีกด้วย จึงทำให้การควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ (biological control) ดูจะเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับมากกว่า อีกทั้งมีรายงานว่า การควบคุมโดยชีววิธีในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินมีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูง (Paulitz. 1997; Postma *et al.* 2000) เช่น Postma *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการควบคุมเชื้อ *P. aphanidermatum* โดยเชื้อ *Lysobacter enzymogenes* สายพันธุ์ 3.1T8 ที่แยกได้จากบริเวณปลายราก ร่วมกับไคโตซาน ที่ปลูกแตงกวาใน rockwool พบว่าสามารถควบคุมโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ 50-100 เปอร์เซ็นต์ และการควบคุมโดยชีววิธีรวมไปถึงการใช้สารสกัดจากพืช ซึ่งกำลังได้รับการยอมรับในปัจจุบัน แต่วิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดบางประการ ได้แก่ความไม่คงตัวของสารออกฤทธิ์ที่ได้

การนำแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช (rhizobacteria) มาใช้ในระบบการปลูกพืชเป็นวิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างหนึ่งที่มีรายงานมากมายถึงการส่งผลดีทั้งในด้านการจัดการดิน การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ตลอดจนการชักนำพืชให้เกิดความต้านทานโรคได้ (Compant *et al.* 2005; Gravel. 2006; Liu *et al.* 2007) ปัจจุบันยังได้รับการยอมรับอย่างมาก จนมีผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์จำหน่ายอยู่ตามท้องตลาดกันเป็นจำนวนมาก แต่ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมุ่งเน้นการควบคุมพืชที่ปลูกในดิน ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินอาจได้ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ไม่ดีนัก จนทำให้เกิดแนวคิดในการนำแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่อยู่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* spp. ในระบบการปลูกพืช (พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2548; Khan *et al.* 2003; Islam *et al.* 2005; Gravel. 2006; Liu *et al.* 2007) เนื่องจากเป็นการนำแบคทีเรียท้องถิ่นที่มีอยู่เดิมมาใช้ โดยแบคทีเรียเหล่านี้น่าจะมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินได้ ซึ่งน่าจะส่งผลให้สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่าที่ปลูกในระบบได้อย่างเต็มประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้ทำการคัดสรรแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชทั้งในห้องปฏิบัติการ และในสภาพแปลงปลูกเพื่อให้ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบการปลูกพืชดังกล่าว รวมไปถึงศึกษาคุณสมบัติ กลไก และจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพดังกล่าวเพื่อเป็นองค์ความรู้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 คัดเลือกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

1.2.2 ศึกษากลไกของสายพันธุ์แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* spp.

1.2.3 จำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

1.3 สถานที่ดำเนินงาน และเก็บตัวอย่าง

1.3.1 ห้องปฏิบัติการโรคพืช 1-3 และ โรงเรือนปลูกพืชทดลอง
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.3 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.4 ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียทั่วไป สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

1.3.5 แปลงปลูกพืชโครงการฟื้นฟูสภาพป่าเชียงดาว-ไชยปราการณ์
อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

1.3.6 แปลงปลูกพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน อ.เมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.7 แปลงปลูกพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ

1.3.8 แปลงปลูกพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

1.4.1 คัดเลือกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในห้องปฏิบัติการ โรงเรือนทดลอง และระบบการปลูกพืชใกล้เคียงกับการค้า

1.4.2 ทดสอบคุณสมบัติ และกลไกของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* spp.

1.4.3 จำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศัยภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

1.5 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

ใช้ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย และสรุปผลเป็นระยะเวลา 2 ปี 6 เดือน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่มีศักยภาพ ในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp.

1.6.2 ทราบถึงกลไกที่เป็นไปได้ของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp.

1.6.3 สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช

เขตรากพืช (rhizosphere) คือบริเวณที่มีการแสดงออกถึงปฏิสัมพันธ์ต่างๆที่ได้รับอิทธิพลมาจากรากพืช (Lynch. 1984) ซึ่งเขตรากพืชนี้เป็นบริเวณที่ส่งผลต่อสภาพแวดล้อมในระยะห่างอย่างน้อย 1 หรือ 2 มิลลิเมตรนับจากผิวของรากพืช (Metling. 1993) สาเหตุที่ส่งผลเช่นนี้เนื่องมาจากมีการหลั่งสารคัดหลั่งออกมาจากราก (root exudates) จนส่งผลต่อการเจริญเติบโต การกระตุ้นหรือยับยั้งกิจกรรมที่เกิดขึ้นของประชากรของจุลินทรีย์ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า rhizosphere effect จนเป็นผลให้เกิดความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับรากพืช (Metling. 1993; Travis *et al.* 2003; Pinton *et al.* 2007) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช (rhizosphere bacteria)

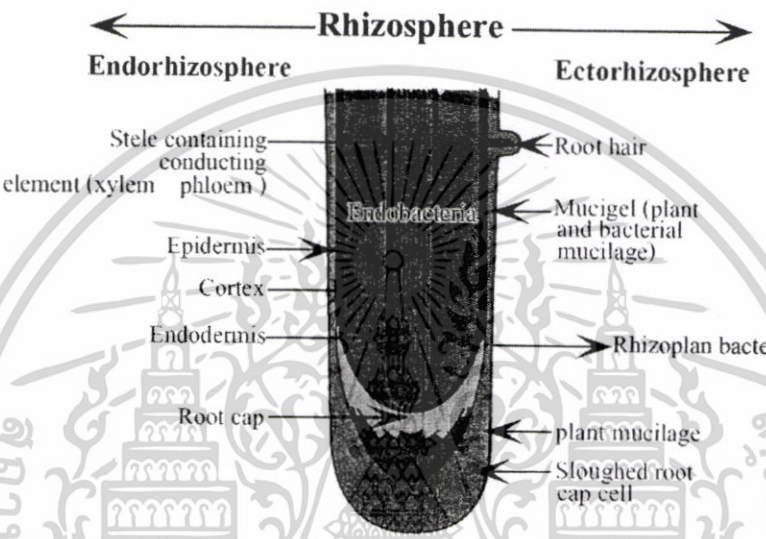
การที่รากปลดปล่อยสารคัดหลั่งออกมาจากบริเวณเขตรากนั้น พบว่าเป็นสารจำพวก ions, free oxygen และ water, enzymes, mucilage และสารประกอบคาร์บอนที่ได้จากทั้ง primary metabolites และ secondary metabolites ซึ่งสารดังกล่าวจะส่งผ่านในส่วนของ cellular membrane และกระจายออกมารอบๆ บริเวณเขตรากพืช (Bais *et al.* 2006)

แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ในส่วนต่างๆ ของรากพืช (ภาพที่ 2.1) ซึ่งสามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากได้ดังนี้ คือ แบคทีเรียผิวราก (rhizoplane bacteria) แบคทีเรียภายนอกราก (ectorhizobacteria) แบคทีเรียภายในราก (endophytic bacteria) แต่แบคทีเรียบริเวณผิวราก จะมีความหลากหลาย (diversity) ที่ต่ำกว่าแบคทีเรียในบริเวณเขตรากมาก แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่สามารถอาศัยอยู่กับรากพืช (root colonizing bacteria) ได้ (Pinton *et al.* 2007)

แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชทั้งที่ผิวราก และพวกที่แทรกตัวเข้าไปอาศัยอยู่ในรากพืชจะมีการเข้าสู่ระบบรากพืชโดยใช้ระบบการส่งสัญญาณ (signal) ที่มีความสัมพันธ์ระหว่างกัน (Bais *et al.* 2006) ซึ่งสัญญาณดังกล่าวจะอยู่ในรูปสารอินทรีย์ ระบบการใช้สารอินทรีย์ที่เป็นสัญญาณในการสื่อสารระหว่างเซลล์แบคทีเรียด้วยกันเองเรียก quorum sensing ซึ่งถูกพบครั้งแรกจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเล (Nealson and Hastings. 1979) โดยแบคทีเรียจะสร้างสารอินทรีย์ดังกล่าวขึ้นก็ต่อเมื่ออยู่ด้วยกันในความหนาแน่นของประชากรที่พอเหมาะ หรือสร้างขึ้นเพื่อใช้ควบคุมปริมาณประชากรให้เหมาะสม สาเหตุที่เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวขึ้นนั้นเนื่องมาจากสารอินทรีย์จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สำคัญ (Fray. 2002) จนส่งผลให้แบคทีเรียเกิดการรวมกลุ่มกัน เมื่อเซลล์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียรวมกลุ่มกันได้แล้ว ก็จะมีการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณผิวของราก โดยได้รับอิทธิพลของสารคัดหลั่งบริเวณรากที่พืชผลิตขึ้น จากนั้นแบคทีเรียก็มีการสร้าง biofilm ขึ้นภายในกลุ่มประชากรเพื่อเข้าจับกับโมเลกุลของสารที่บริเวณรากพืช (Walker *et al.* 2003) หรือสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการควบคุมการรุกรานจากเชื้ออื่น (Bais *et al.* 2006) แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย รวมไปถึงการรวมกลุ่มกันเกิดเป็นประชากรของแบคทีเรียได้นั้นยังมีปัจจัยอื่นประกอบด้วยเช่นกัน (Germida *et al.* 1998)



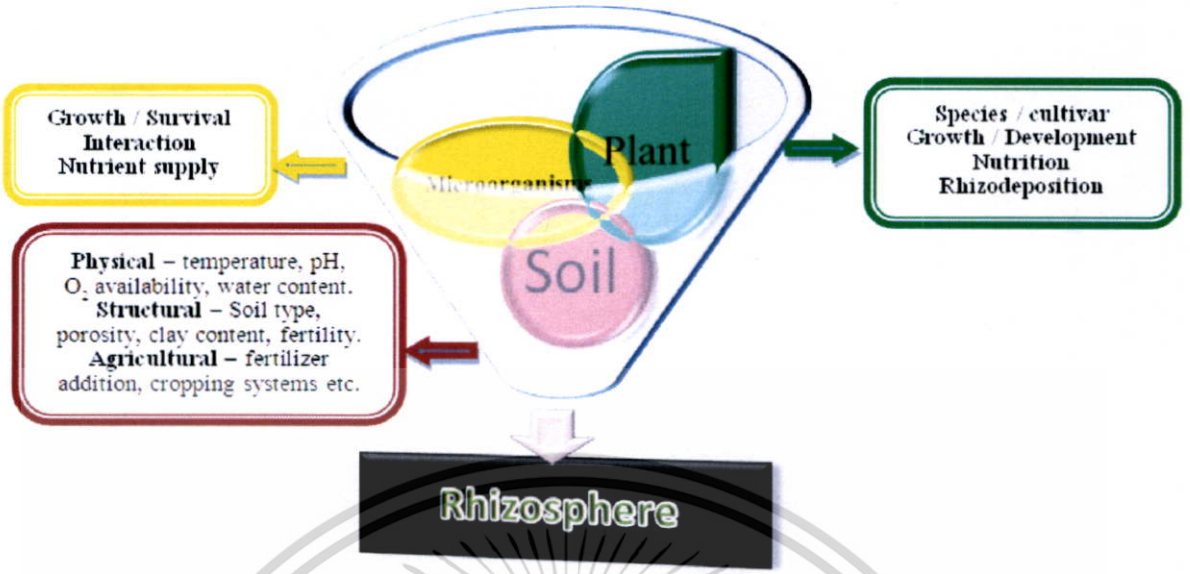
ภาพที่ 2.1 บริเวณเขตราก และแบคทีเรียเขตรากพืช

ที่มาภาพ: ดัดแปลงจาก Pinton *et al.* 2007

2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช กับพืช

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างแบคทีเรียเขตรากพืชกับพืชนั้นจะถูกกำหนดด้วยปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่นวัสดุที่ใช้ในการปลูกพืช และชนิดของพืชนั้นๆ ที่จะส่งผลทั้งทางตรงและทางอ้อมให้พืชมีสารคัดหลั่งจากราก เพื่อส่งผลในการกำหนดความหลากหลาย และปริมาณของจุลินทรีย์บริเวณเขตรากพืช (ภาพที่ 2.2) ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนั้นจะมีพืชเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสัมพันธ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับแบคทีเรียเป็นอย่างมาก โดยปัจจัยของพืชที่จะส่งผลกับแบคทีเรียดังกล่าว เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ส่งผลต่อบริเวณเขตรากพืช

ที่มาภาพ: ดัดแปลงจาก Pinton *et al.* 2007

2.2.1 ชนิดพืช พืชแต่ละชนิดจะมีปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นกับคาร์บอน (C) ที่แตกต่างกันโดยผลของคาร์บอนนี้จะทำให้ความสามารถในการอยู่รอดของพืชรวมไปถึงชนิด และปริมาณของสารคัดหลั่งจากรากที่แตกต่างกันไปด้วย โดยสารที่หลั่งออกมานั้นทำให้เกิดการเรียนรู้จดจำ (recognition) ของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์พืช โดยพืชที่มีชนิด หรือสายพันธุ์ใกล้เคียงกันก็จะมีกลไกการหลั่งสาร และชนิดของสารคัดหลั่งที่ไม่แตกต่างกันมากนัก (Christensen-Weniger *et al.* 1992)

จากรายงานวิจัยของ Marschner *et al.* (2001) พบว่าจากการตรวจสอบประชากรของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช 3 ชนิดคือ ถั่วชิคพี ผักกาดก้านขาว และ หญ้าซูดาน ด้วยวิธี PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) ในส่วนของ 16S rDNA มีผลที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ชนิดของพืช และบริเวณต่างๆ ของรากพืช โดยบริเวณ รากที่เจริญแล้ว (mature root) มีประชากรแบคทีเรียสูงกว่าบริเวณปลายราก

Germida *et al.* (1998) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากรใน endobacteria ของต้นคาโนล่า กับ ข้าวสาลี ที่ปลูกในพืชที่เดียวกันพบว่าแบคทีเรียมีความหลากหลายแตกต่างกันออกไป สรุปได้ว่าความหลากหลายของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและประชากรของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียจำพวก endophytic bacteria จะเป็นกลุ่มย่อยของ rhizosphere bacteria

Priha *et al.* (1999) ทำการศึกษาพืชปลูก 3 ชนิดคือ สนสามใบ สนฉัตร และ ต้นคาโนล่า พบว่าชนิดของพืชปลูกมีอิทธิพลต่อโครงสร้างของประชากร และกิจกรรมของจุลินทรีย์ในบริเวณเขตรากของต้นคาโนล่าจะพบเชื้อรามากที่สุด ในขณะที่บริเวณเขตรากของพืชอีกสองชนิดที่เหลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีแบคทีเรียแกรมบวกอยู่จำนวนมาก เช่นเดียวกับ Marschner *et al.* (2001) ได้ศึกษาพืช 3 ชนิดคือ ถั่วชิคพี, ต้นคาโนล่า และ ข้างฟ่าง พบว่าพืชแต่ละชนิดทำให้โครงสร้างของประชากรสิ่งมีชีวิตบริเวณเขตรากพืชแตกต่างกันไป

Miller *et al.* (1989) ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในแต่ละพันธุ์ของพืช 3 ชนิดคือข้าวโพด หญ้าเคนตักกีบลู และ ข้าวสาลี โดยพืชแต่ละชนิดจะศึกษาจำนวน 2 พันธุ์ พบว่าในพืชทุกชนิดและทุกพันธุ์พบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (*B.*) และ fluorescent pseudomonas น้อยกว่า actinomycetes และในข้าวโพด และข้าวสาลี แต่ละพันธุ์ก็มีประชากรของทั้ง fluorescent pseudomonas และ actinomycetes แตกต่างกันด้วยเช่นกัน

จากการรวบรวมการรายงานของ Desh (1992) ได้อ้างอิงจาก Smit *et al.* (1986) เรื่องการศึกษาบริเวณขนรากของถั่วลันเตา ต้นโคเวอร์ และ ถั่วเหลือง พบว่า บริเวณขนรากของต้น pea เป็นบริเวณที่ดีที่สุดในการยึดเกาะของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช จากนั้นทำการยืนยันผลการทดลองโดยการอ้างอิงรายงานของ Smit *et al.* (1988) ใน Desh (1992) เรื่องการศึกษากลไกที่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลพบว่า สภาวะของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกจำกัดของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ส่งผลต่อความสามารถในการเข้าสัมผัสพืช

2.2.2 อายุ และการพัฒนาการของพืช เป็นปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลต่อความสามารถในการครอบครองจุลินทรีย์บริเวณรากพืช เนื่องจากสารคัดหลั่งของพืชที่มีอายุ และการพัฒนาการที่แตกต่างกันนั้นส่งผลทำให้คุณภาพ และปริมาณของ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรทจากสารคัดหลั่งในปริมาณมาก-น้อยแตกต่างกันไป (Pinton *et al.* 2007) จากการรายงานการวิจัยของ Schonfeld *et al.* (2001) พบว่าปริมาณของจุลินทรีย์ในบริเวณเขตรากพืชจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชมีอายุมากขึ้น และปริมาณของจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อพืชเริ่มมีการพัฒนาในระยะดอก

2.2.3 การเจริญของพืช จากรายงานของ Pinton *et al.* (2007) พบว่าในแต่ละระดับในการพัฒนาของเซลล์รากพืช จนกระทั่งเป็นอวัยวะรากพืชนั้นจะมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาที่ทำให้เกิดการหลั่งสารออกมาภายนอกเซลล์ได้แตกต่างกัน ซึ่งการเจริญของระบบรากในช่วงที่ได้รับการกระตุ้น (active state) ก็ย่อมมีการหลั่งสารออกมาได้อย่างดี แต่สารคัดหลั่งจะลดลงเมื่อเซลล์รากพืชตาย และอายุพืชที่มากขึ้นด้วยเช่นกัน อีกทั้ง Ulrich *et al.* (2008) ได้รายงานถึงแบคทีเรียที่เจริญอยู่ภายในเซลล์รากว่ามีความสำคัญต่อสุขภาพพืช และความสมดุลของระบบนิเวศน์ ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวนี้สามารถพบได้หลายสกุลเช่น *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Pseudomonas* (*Ps.*) และ *Curtobacterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 ชนิด และปริมาณจุลินทรีย์ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ถูกกระตุ้นมากจากสารคัดหลั่ง ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลง และมีความเฉพาะตามปริมาณของสารคัดหลั่งเช่น Meharg and Killham (1995) พบว่าประชากรของ *Ps. aeruginosa* เพิ่มมากขึ้น 12 เท่าเมื่อได้รับการกระตุ้นอย่างต่อเนื่องจากสารคัดหลั่งจากหญ้าข้าวไรที่ติดฉลากด้วยสารรังสี ^{14}C-labeld

ปัจจัยต่างๆ ข้างต้นส่งผลต่อปริมาณ และชนิดของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช และความหลากหลายของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เช่น จากการรายงานของ Atlas and Bartha (1981) พบว่าส่วนใหญ่ในบริเวณเขตรากพืชจะพบแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแบบแท่ง (rod shape) และไม่สร้างสปอร์ (non-spore) เป็นจำนวนมาก เช่น แบคทีเรียจำพวก *Pseudomonas, Flavobacterium* และ *Alcaligenes*

Kloepper (1992) ได้รายงานไว้ว่าแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชส่วนใหญ่แล้วเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยพบแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent pseudomonad และยังมีการพบแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Serratia* รวมไปถึงแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก *Bacillus* อีกด้วย

Germida *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชต้นคาโนล่า จากการสุ่มเลือก rhizosphere bacteria 300 ไอโซเลท และ endophytic bacteria 200 ไอโซเลท แล้วนำไปจัดจำแนก พบแบคทีเรียทั้งหมด 18 สกุล โดยเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* 29 เปอร์เซ็นต์ *Flavobacterium* 12 เปอร์เซ็นต์ *Micrococcus* 20 เปอร์เซ็นต์ และ *Rathayibacter* 12 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังพบว่า endophytic bacteria มีปริมาณน้อยกว่า rhizosphere bacteria

2.3 กลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช

การควบคุมโดยชีววิธีจากการนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จากธรรมชาติ ที่มีความสามารถในการแข่งขันด้านแหล่งแร่ธาตุอาหาร และแหล่งที่อยู่อาศัย การเป็นปรสิต รวมถึงการผลิตสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นซึ่งถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี เพื่อลดปริมาณประชากรของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อก่อโรคที่จะก่อให้เกิดโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืช (Prathuengwong *et al.* 2004) ซึ่งจากความสามารถของจุลินทรีย์ในรายงานข้างต้นจึงนำมาเป็นแนวทางในการจำแนกกลไกของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชโดยประยุกต์ตาม Pinton *et al.* (2007) ได้ดังนี้

2.3.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะเป็นโมเลกุลของสารที่ผลิตขึ้นมาจากแบคทีเรียเพื่อใช้ในการ ฆ่า ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (สิ่งมีชีวิตเป้าหมาย) ซึ่งปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับสารปฏิชีวนะไว้อยู่มาก เช่น สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น อาทิ butyrolactones, hydrogen cyanide, 2,4-diacetylphloroglucinol (Ph1), Pyoluterin (Plt), oomycin A, phenazine, pyoluteorin, pyrrolnitrin,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tensin, tropolone และ cyclic lipopeptides ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* และ kanosamine, oligomycin A, zwittermicin A และ xanthobaccin ซึ่งผลิตจาก *Bacillus*, *Streptomyces* และ *Stenotrophomonas* spp. (Laville *et al.* 1992; Defago. 1993; Sacherer *et al.* 1994; Nielsen and Sorensen. 2003)

Shang *et al.* (1999) พบว่าสารปฏิชีวนะ zwittermicin A และ kanosamine ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus cereus* UW30 และ UW85 สามารถยับยั้งการพัฒนาของเชื้อ *Pythium* (*Py.*) *torulosum* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรค damping-off ได้โดยไปยับยั้งการเคลื่อนที่ การยึดเกาะ และทำให้อัตราการงอก germ tubes ของ zoospore ลดลง

Islam *et al.* (2005) พบว่าจาก *Lyzobacter* spp. ที่แยกได้จากบริเวณเขตรากพืชสามารถผลิตสาร xanthobaccin เพื่อยับยั้ง Aphanomyces zoospore และสามารถทำลายเชื้อ *Py. aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าของแตงกวาได้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

Farah *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษา rhizospheric bacteria ที่เจริญบริเวณเขตรากพืชทั้งหมด 72 ไอโซเลทประกอบไปด้วยแบคทีเรียที่อยู่ใน สกุล *Azotobacter*, fluorescent Pseudomonas, *Mesorhizobium* และ *Bacillus* ซึ่งการทดสอบพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารจำพวก ammonia (NH3), hydrogen cyanide (HCN), siderophore และ สารที่สามารถละลายฟอสเฟส (phosphate solubilization)

2.3.2 การสลายตัวจากระบบการสื่อสารระหว่างเซลล์

quorum sensing เป็นกลไกการส่งสัญญาณการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะส่งสัญญาณที่เป็นสารประกอบเคมี จำพวก autoinducers ออกมาเป็นตัวกระตุ้นให้ยีนเป้าหมายทำงาน จนส่งผลต่อความหนาแน่น และการเรียกรวมพลของแบคทีเรีย (Danhorn and Fuqua. 2007) แต่จากการส่งสัญญานดังกล่าว จะมีการส่งสัญญาณหรือมีตัวรับสัญญาณเพื่อรบกวนหรือขัดขวางระบบ quorum sensing เรียกระบบดังกล่าวว่า quorum quenching ซึ่งการส่งสัญญานลักษณะนี้จะเป็นแนวทางการควบคุมการติดเชื้อและการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Nelson. 2004) การทำงานของ quorum quenching จะเกี่ยวข้องกับ signal molecule ที่ส่งสัญญานไปรบกวนหรือยับยั้งระบบ quorum sensing เช่น การผลิต signal molecule จำพวก AHL-lactonase, AHL-acylase หรือ การผลิต receptor เช่น AIT (analogues including truncated) ที่แย่งกับ signal ในระบบ quorum sensing ทำให้ quorum sensing เกิดการชะลอตัว และหยุดลง อีกทั้ง quorum quenching จะไปตัดสัญญาณ หรือ ขัดขวางการทำงานของ quorum sensing อีกทั้งปัจจุบันมีการศึกษา quorum quenching อย่างกว้างขวางเพื่อที่จะพัฒนา และปรับปรุงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Nelson. 2004; Bais *et al.* 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการรายงานของ Danhorn and Fuqua (2007) ถึงแบคทีเรีย *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* และ แบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonad อีกหลายชนิดที่มีความสัมพันธ์ได้ทั้งในส่วนของ ใบ ราก และ

ส่วนของพืชใต้ดิน โดยเชื้อดังกล่าวจะสร้าง biofilms ขึ้นบริเวณพืชเพื่อป้องกันพืชจาก เชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งผลจากการสร้าง biofilms นี้จะทำให้เกิดการปกป้องแบบแก่งแย่งแข่งขัน และการเข้าครอบครองพื้นที่ เช่น *Ps. fluorescens* สามารถผลิตสาร exopolysaccharide ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้เกิดความสัมพันธ์ระหว่างพืช กับ arbuscular mycorrhizal fungi

2.3.3 การแข่งขันการใช้ธาตุเหล็ก

siderophore เป็นสารที่มีความสามารถในการจับกับอนุมูลของธาตุเหล็กในดิน ทำให้เชื้อสาเหตุโรคที่มีความจำเป็นต้องใช้ธาตุเหล็กในการเจริญถูกยับยั้งการเจริญเติบโต การสร้างสาร siderophore เพื่อใช้ในการแก่งแย่งธาตุอาหารกับเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยการสังเคราะห์ siderophore นั้นโปรตีนจำพวก GacS และ GacA จะถูกกระตุ้นในตำแหน่ง *N*- terminal ที่มีความเฉพาะเจาะจงตรงส่วนของ sigma factors RpoS, PvdS, และ FpvI เพื่อให้แบคทีเรียสร้างสาร siderophore (Compant *et al.* 2005) สารในกลุ่มนี้สามารถพบได้มากในเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* spp. จากการรายงานของ Latour *et al.* (2003); Djibaoui and Bensoltane (2005) และ Compant *et al.* (2005) พบว่า *Ps. jessenii, Ps. putida, Ps. fluorescens* และ *Ps. chlororaphis* สามารถสร้างสาร siderophore พวก pyoverdines เป็นสารสีเขียวอมเหลืองที่ช่วยลดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยมีผลในการแข่งขันแย่งธาตุเหล็กเพื่อใช้ในการเจริญ โดยเฉพาะภายใต้สภาวะที่ธาตุเหล็กมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้ยังพบว่าสาร siderophore มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Bakker *et al.* 1993)

2.3.4 การชักนำให้เกิดความต้านทาน

แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชบางสายพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคพืชได้ทั้งทางใบ และทางราก จากการรวบรวมของ Han *et al.* (2000) พบว่า เชื้อ *Ps. fluorescens* สายพันธุ์ 89B-27 และ *Serratia marcescens* สายพันธุ์ 90-166 สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคแอนแทรกโนส โรคเหี่ยว โรคใบจุด และโรคด่างไวรัสได้ในพืชตระกูลแตง โดยการใช้ seed treatments

Chen *et al.* (2000) รายงานว่าการใช้ *Ps. corrugata* 13 หรือ *Ps. aureofaciens* 63-28 ทำการกระตุ้นรากเป็นเวลา 2 วัน พบว่า ที่บริเวณรากจะมี peroxidase (PO) และ polyphenol oxidase (PPO) เพิ่มขึ้น ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะมีผลต่อการพัฒนาการเกิดโรคของเชื้อ *Py. aphanidermatum* ในแตงกวา

Hanafi and Fellah (2006) ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำให้มะเขือเทศเกิดความต้านทานต่อโรค Pythium root rot พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 ส่งเสริมการเจริญเติบโต และช่วยในการดูดซึมธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช

Vancura (1998) รายงานถึงเชื้อ *Pseudomonas* หลายสายพันธุ์ ที่สามารถผลิต indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-propionic acid (IPA), indole-3-butyric acid (IBA), indole-3-lactic acid (ILA) และ gibberellic acid (GA3) ได้

Weild *et al.* (2000) พบว่า *Paenibacillus polymyxa* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และสามารถให้ธาตุอาหารไนโตรเจนแก่พืช

Farah *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษา rhizospheric bacteria ที่เจริญบริเวณเขตรากพืชพบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตสารจำพวก indoleacetic acid (IAA) และ phosphate solubilization ได้ ซึ่งในการศึกษามีแบคทีเรียพวก *Azotobacter*, fluorescent pseudomonad และ *Mesorhizobium ciceri* จำนวน 80 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถผลิตสาร IAA และแบคทีเรียจำพวก *Bacillus* สามารถผลิตสาร IAA ได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรียที่สามารถช่วยในการดูดซึม และสลาย phosphate พบว่าเป็นแบคทีเรียจำพวก *Bacillus* 80 เปอร์เซ็นต์ *Azotobacter* 74.47 เปอร์เซ็นต์ *Pseudomonas* 55.56 เปอร์เซ็นต์ และ *Mesorhizobium* 16.67 เปอร์เซ็นต์

Ramos *et al.* (2002) รายงานว่าการใช้ *Bacillus licheniformis* กับการปลูกต้นกล้า *Alnus glutinosa* จะสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ โดยพบว่าระบบรากจะสมบูรณ์ขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากสารในกลุ่ม auxin และ gibberllin ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มนี้

Khan (2005) ได้รายงานว่า กิจกรรมของ *Nitrobacter* และ *Thiobacillus* สามารถผลิตกรดพวก formic acetic lactic ซึ่งจะทำให้ pH ลดต่ำลงจนเกิดการสลายตัวของฟอสฟอรัสมากขึ้นทำให้พืชได้รับฟอสฟอรัสในปริมาณที่มากขึ้น

Danhorn and Fuqua (2007) ได้อ้างอิงการรายงานของ Dandurand *et al.* (1997) ถึงการเข้าครอบครองต้นกล้าของ pea โดย *Ps. fluorescens* ซึ่งพบว่าแบคทีเรียมีความสามารถครอบครองได้ในปริมาณสูงในส่วนของ root tips ส่วนเชื้อ *Ps. putida* สามารถกระตุ้นการเจริญของข้าวโพดได้เมื่อมีการเข้าครอบครองรากของพืช และมีการหลั่ง chemotaxis เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้าง microcolony และ ความสัมพันธ์ที่เกี่ยวเนื่องกับประชากรแบคทีเรียบริเวณราก ส่วนในเชื้อ *Lysobacter* sp. SB-K88 สามารถสร้างความต้านทานโรค damping-off และแบคทีเรียดังกล่าวจะสร้างสาร xanthobaccin ที่สามารถทำลาย zoospores ซึ่งสาร xanthobaccin จะผลิตได้ก็ต่อเมื่อเชื้อสายพันธุ์ SB-K88 มีการสร้าง biofilms ที่ผิวของรากพืช ซึ่งจากการสร้าง bioflim ขึ้นบริเวณรากพืชจะมีการตอบสนองโดยการปลดปล่อยสารบางอย่างออกมาผ่านทางผิวราก

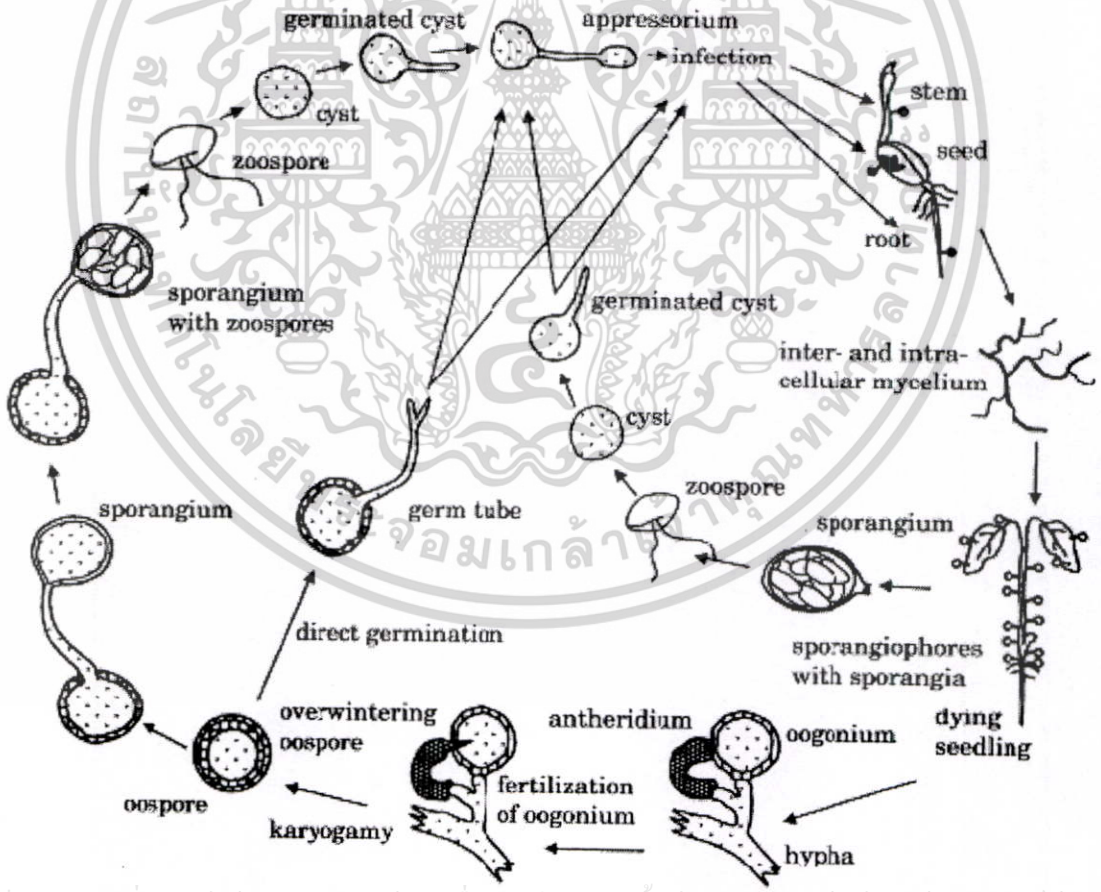
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 โรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* spp.

2.4.1 ลักษณะของเชื้อ *Pythium* spp.

เชื้อ *Pythium* จัดเป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม fungus-like organisms ที่อยู่ในอาณาจักร (Kingdom) Chromista (or Straminopila) ชั้น (Class) Oomycetes อันดับ (Order) Saprolegniales และ วงศ์ (Family) Pythiaceae ตามลักษณะของ phytopathogenic genera ซึ่งมีโครงสร้างในการเจริญเติบโต (somatic structure; vegetative growth) ที่มีนิวเคลียสเป็นแบบ diploid (n+n) (van West *et al.* 2003) ซึ่งเชื้อนี้จะมีลักษณะเป็นแบบเส้นสาย (filamentous) ซึ่งเมื่ออยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียก mycelium เชื้อ *Pythium* spp. จะมีเส้นใย (hypha) มีสีใส (hyaline) ไม่มีผนังกั้น (non-septate หรือ coenocytic hypha) แตกกิ่งก้านและเจริญได้อย่างรวดเร็ว (van West *et al.* 2003; Agrios. 2005)

วงจรการเข้าทำลายพืชโดยเชื้อ *Pythium* spp. จะสามารถเข้าทำลายพืชได้ทั้งในวงจรที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (asexual cycle) และ การสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual cycle) (ภาพที่ 2.3)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.3 วงจรการเข้าทำลายของเชื้อ *Pythium* spp.

ที่มา : van West *et al.* (2003)

การสืบพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ จะสร้าง sporangia ที่ปลายเส้นใยหรือระหว่างเส้นใย (terminal or intercalary sporangium) ก็ได้ ซึ่งมีรูปร่าง spherical หรือ filamentous ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งส่วนของ sporangia จะแทงผ่าน (penetrate) เข้าสู่พืชได้โดยการงอก germ tube (direct germination) หรือ sporangia ของเชื้อ *Pythium* จะให้กำเนิดเส้นใยสั้นๆ และตอนปลายโป่งออกเป็น vesicle จากนั้น protoplasm ใน sporangium จะไหลไปอยู่บริเวณ vesicle และพัฒนากลายเป็น zoospores (indirect germination) ที่มีนิวเคลียสเป็นแบบ haploid (n) ผนังเซลล์มี cellulose เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ zoospore มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วที่มีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) มีหางสำหรับว่ายน้ำ 2 หาง heterokont flagellae (biflagellate zoospores) คือ tinsel flagellum ซึ่งมีลักษณะยาวช่วยในการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และ whiplash flagellum ซึ่งมีลักษณะสั้นกว่า ช่วยในการเคลื่อนที่ไปข้างหลัง zoospore จะเข้าหาพืชได้โดยถูกปล่อยออกจาก vesicle จากนั้นก็จะว่ายน้ำ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารคัดหลั่งจากรากพืช zoospore จะว่ายเข้าหารากพืชเพื่ออยู่ที่พืชอาศัย จากนั้นจะมีการตั้งถิ่นฐาน (settle) และ พักตัว (encystment) zoospore จะมีการรวมกลุ่มกันอย่างอัตโนมัติ (autoaggregation) โดยมีสารประกอบแคลเซียม สารประกอบ polyuronates และสารประกอบ certain fucosyl ที่สะสมอยู่บริเวณราก เป็นตัวกระตุ้นการพักตัวของ zoospores จนทำให้ zoospore มีการยึดเกาะ (adhesion) ที่บริเวณผิวพืช โดยสารเหนียวที่เรียกว่า adhesins และปล่อย zoospore ที่ปราศจากหาง (naked zoospore) ให้อยู่ที่ผิวพืช จากนั้นจะมีการพัฒนา germ tube หรือโครงสร้างจำพวก appressorium (appressorium-like) เพื่อแทงผ่าน (penetrate) เข้าสู่พืช เมื่อเชื้อ *Pythium* สามารถเข้าสู่พืชแล้วจะเจริญอยู่ในเซลล์พืชแบบ intracellular aseptate hyphae โดยการพัฒนาเส้นใยหรือกลุ่มของเส้นใยผ่านไปยังเนื้อเยื่อของพืช (พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2539; van West *et al.* 2003; Agrios. 2005)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *Pythium* เชื้อจะสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (oogonium) ซึ่งมีรูปร่างกลม และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium) มีรูปร่างทรงกระบอกขึ้นที่ปลายของเส้นใย ซึ่งอาจเกิดจากเส้นใยเดียวกัน หรือคนละเส้นก็ได้ เมื่อ oogonium และ antheridium มาสัมผัสกัน antheridium จะสร้าง fertilization tube เข้าสู่ oogonium ซึ่งนิวเคลียสจาก antheridium จะเคลื่อนที่ผ่านท่อนี้ไปผสมกับ oogonium เกิดการปฏิสนธิขึ้นเป็น zygote จากนั้นผนังของ zygote จะพัฒนาให้มีความหนาขึ้น กลายเป็น oospores ที่มี β-1,4-glucan เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง oospores ที่สร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการอยู่ข้ามฤดู (over-wintering) และ สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (harsh environmental) เนื่องจากมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงและต่ำได้ดี และในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนี้จะมีส่วนที่เรียกว่า resting spore ซึ่งเป็น oospores ที่ต้องการระยะพักตัวก่อนที่จะมีการงอกโดยการสร้างได้ทั้ง germ tube หรือ vesicle ได้เช่นเดียวกับ sporangia ในวงจรที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2539; van West *et al.* 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การเข้าทำลายพืชจากเชื้อ *Pythium* spp.

เชื้อ *Pythium* เป็น saprobe และอาศัยอยู่ในน้ำ ขณะที่บางพวกเป็น แบบปรสิตชั่วคราว (facultative parasite) ซึ่งส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดินในที่ชื้นแฉะ (วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546) โดยเชื้อดังกล่าวจะมีความสามารถทำให้เกิดโรคแก่พืชได้หลายชนิดโดยทำให้เกิดอาการ damping-off, seed rot, root rot, seedling blight, stem rot และ collar rot โดยเชื้อดังกล่าวจะทำลายพืชโดยการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า zoospores ซึ่งจะเคลื่อนที่เข้าหาสิ่งกระตุ้นทางเคมี เช่น exudates ที่ออกมาบริเวณรากพืช จากนั้นก็ฝังตัวและงอก germ tube แทงผ่านเข้าไปในเซลล์พืชโดยวิธีกล และอาจมีเอนไซม์บางชนิดร่วมด้วยเพื่อให้สะดวกต่อการแทงผ่านเช่น pectinolytic enzymes, cellulolytic enzymes และ proteolytic enzyme เป็นผลทำให้พืชแสดงอาการของโรคต่างๆตามมาคือ ถ้าเกิดกับเมล็ดก็ทำให้สูญเสียความงอก ถ้าเป็นลำต้นหรือราก เชื้ออาจเข้าไปทำลายถึงส่วนของ vascular tissue ทำให้เกิดอาการโคนเน่า รากเน่า เหี่ยว และตายในที่สุด (van West *et al.* 2003; Agrios. 2005; Hon-Hing. 2009) ซึ่งอาการที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. อาจยังไม่ปรากฏอาการทันทีในระบบปลูกแต่พบได้หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต (Johnstone *et al.* 2004)

2.4.3 ความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *Pythium* spp. ที่มีผลกระทบกับพืชที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

โรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Pythium* spp. สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากทั่วโลก โดยเฉพาะพืชที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน สามารถเข้าทำลายพืชได้ตั้งแต่ในระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว (Stanghellini and Resmussen. 1994; van West *et al.* 2003; Khalil. 2005)

Krober and Sauthaff (1999) รายงานว่าการเพาะกล้าคื่นฉ่ายของบางพื้นที่ในประเทศเยอรมันพบเชื้อ *Py. mastophorum* ทำให้เกิดโรครากเน่าได้ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบเศรษฐกิจโดยจะพบอาการตั้งแต่ในระยะเมล็ด

Gull *et al.* (2004) พบว่าเชื้อ *Py. acanthicum, Py. aphanidermatum, Py. coloratum, Py. diclinum, Py. irregulare, Py. myriotylum, Py. perplexum, Py. spinosum* และ *Hetrothallicpythium* groups F, G, HS, P และ T สามารถสร้างความเสียหายโดยทำให้เกิดโรคเหี่ยว และโรครากเน่าที่สำคัญในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทางตอนใต้ของแอฟริกา

Sutton *et al.* (2006) รายงานว่าโรค Pyhtium root rot เป็นโรคที่สำคัญในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในประเทศแคนาดา โดยเชื้อสาเหตุ *Pythium* spp. สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิดเช่น แตงกวา มะเขือเทศ ผักกาด, พริกหวาน, ผักขม, ต้นอรูกูล่า, กุหลาบ และไม้ดอกอีกหลายชนิด รวมไปถึงรายงานของ Chillemi and Lazzarin (1998) พบว่าเชื้อ *Py. tracheiphilum* เป็นสาเหตุหลักที่สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากต่อพืชตระกูลผักกาด ของประเทศอิตาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำเอกสารนี้ไปเผยแพร่ต่อในรูปแบบอิเล็กทรอนิกส์ หรือช่องทางอื่นๆ ทั้งนี้ผู้ที่ต้องการใช้เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gutierrez and Melton (2001) พบว่ามีเชื้อ *Pythium* ที่สามารถเข้าทำลายพืชปลูกได้อย่างรุนแรง เชื้อดังกล่าวได้แก่ *Py. aphanidermatum, Py. spinosum, Py. dissotocum, Py. irregulare, Py. myriotylum* และ *Py. volutum*

Huang and Lin (1998) รายงานว่า พบโรครากเน่าในต้นถั่วที่ปลูกในระบบปลูกไม่ใช้ดิน โดยทำการสำรวจในช่วงในฤดูร้อนและฤดูหนาวแล้วนำพืชมาทำการแยกเชื้อพบว่าเป็นเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. ultimum* ซึ่งสามารถเข้าทำลายพืชร่วมกับเชื้อราชนิดอื่นๆ (*Mucro* spp., *Fusarium* spp. และ *Dactylaria* spp.) จากการปลูกพืชทำให้ทราบว่าการติดเชื้อของพืชขึ้นอยู่กับอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญคือ *Py. aphanidermatum* ประมาณ 20-32 องศาเซลเซียส และ *Py. ultimum* ประมาณ 12- 28 องศาเซลเซียส

ส่วนในประเทศไทย Koohakan (2007) ได้รายงานว่าเชื้อ *Pythium* spp. เป็นปัญหาสำคัญในการปลูกผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยสามารถตรวจพบ *Py. myriotylum* ได้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทั้งในรากที่แสดงอาการ และไม่แสดงอาการโรครากเน่า ดังนั้นความเสียหายอาจเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาหากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

พรหมมาศ คูหากาญจน์ และคณะ (2539) รายงานว่า เชื้อ *Pythium* ที่ตรวจพบได้ในประเทศไทย มีอยู่ด้วยกันหลายสายพันธุ์แต่สำหรับในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จากการศึกษาเบื้องต้นสามารถตรวจพบเชื้อ *Pythium* ที่ปนเปื้อนอยู่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบมีวัสดุปลูก ที่ใช้ปลูกแตงกวายุโรป โดยสามารถจัดจำแนกได้เป็น 4 สายพันธุ์ด้วยกัน คือ *Py. aphanidermatum, Py. carolinianum, Pythium* group G และ *Pythium* group HS โดยปริมาณและความถี่ที่ตรวจพบได้ในสารละลายธาตุอาหารพบว่า *Py. carolinianum* เป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบได้ในปริมาณ และความถี่ที่มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *Py. aphanidermatum* ส่วน *Pythium* group G และ *Pythium* group HS ตรวจพบได้ไม่บ่อยครั้งนัก สำหรับสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุสำคัญในเกิดโรคโคนเน่ารากเน่า จากการศึกษาในครั้งนี้มีเพียง *Py. aphanidermatum* เท่านั้น

2.5 การควบคุมโรครากเน่าที่มีสาเหตุจาก *Pythium* spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

การควบคุมโดยชีววิธีถือได้ว่าเป็นกลยุทธ์หนึ่งที่ใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทางรากจำพวก oomycetes ได้เป็นอย่างดี ซึ่งในการพัฒนาถึงกลยุทธ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคโดยกระบวนการทางชีววิธีนั้น จำเป็นต้องเข้าใจถึงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างพืช เชื้อสาเหตุโรค และ กรรมวิธีทางชีวภาพที่จะนำไปใช้ ภายใต้สภาพที่มีการควบคุม รวมไปถึงความเข้าใจถึงระบบนิเวศน์วิทยา (Whipps. 2001) ปัจจุบันกรรมวิธีทางชีวภาพที่กำลังได้รับความนิยมที่จะนำมาใช้ในการควบคุมโรครากเน่าคือการใช้แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชโดยมีรายงานการนำไปใช้ในการควบคุมโรค เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรหมมาศ คูหากาญจน์ (2548) ได้รายงานถึงการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* สาเหตุโรคเน่าของผักสลัดที่ปลูกในระบบ NFT พบว่ามีแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช 31 ไอโซเลทจากจำนวนทั้งหมด 63 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และมี 2 ไอโซเลท ที่ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่า พบว่าเมื่อใส่แบคทีเรียดังกล่าวลงไปในสารละลายธาตุอาหารมีแนวโน้มที่จะลดความเสียหายจากโรคได้

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ และ พรหมมาศ คูหากาญจน์ (2550) พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ K3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Py. aphanidermatum* ได้ดีโดยใช้ส่วนของ purified cell และ cell culture นอกจากนี้ยังพบว่าผลของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Py. aphanidermatum* จะขึ้นอยู่กับอายุของเชื้อ และเวลาการบ่มเชื้อ โดยอายุของเชื้อที่เหมาะสมคือ 48 ชั่วโมง ส่วนระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เพิ่มขึ้นก็จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้สูงขึ้น

Yang *et al.* (2004) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *Paenibacillus polymyxa* PKB1 ในการต่อต้านเชื้อ *Pythium* spp. ซึ่งเป็นปัญหาสำหรับการปลูกแตงกวาโดยได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า *Paenibacillus polymyxa* PKB1 สามารถยับยั้งเชื้อ *Pythium* ได้ 9 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA และ WA โดยเชื้อดังกล่าวจะไปห่อหุ้มเมล็ดแตงกวาทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเข้าทำลายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการงอกและการมีชีวิตอยู่รอดของพืชทดสอบจะสูงกว่าเมล็ดที่ไม่มี *Paenibacillus polymyxa* PKB1 ห่อหุ้ม ส่วนการทดลองภายใต้สภาพโรงเรือนโดยใช้สารละลายแบคทีเรียปริมาณ 10^6-10^8 CFU/ml ใส่ลงในสารละลายธาตุอาหาร พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถลดความรุนแรงของโรคและช่วยเพิ่มผลผลิตของแตงกวาให้สูงขึ้น เช่นเดียวกับการรายงานของ Spadaro and Gullino (2005) พบว่าเชื้อ *Ps. fluorescens* และ *Ps. corrugate* สามารถลดปริมาณ zoospore ของเชื้อ *Pythium* spp. ในการเข้าทำลายแตงกวาในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินได้

Garvel *et al.* (2005) รายงานว่า จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ปลูกมะเขือเทศในระบบปลูกพืชแบบไม่ใช้ดินในสภาพ greenhouse พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 237 ชนิด และพบว่ามี 40 ชนิด สามารถควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าได้ โดยทำการทดลองในวัสดุปลูก rock wool ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ *Ps.corrugate* สายพันธุ์ 1-2, *Pseudomonas subgroup F* และ *G* สายพันธุ์ 1, 2, 3, 4, และ 5, *Ps. syringae* สายพันธุ์ 1 และ *Ps.viridiflava* ซึ่งมีความสำคัญในการลดการเกิดรากเน่าโคนเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Py. ultimum* หรือ *Py. aphanidermatum* โดยเฉพาะ *Ps. marginalis* เท่านั้นที่สามารถลดการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Py. ultimum* และ *Py. aphanidermatum* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Raftoyannis and Dick (2006) ศึกษาอิทธิพลของวิธีการปลูก อายุพืช ความเข้มข้นของ zoospore และอุณหภูมิกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่จากการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อ *Pythium* sp. และ *Phytophthora* sp. พบว่า ระบบปลูกพืชมีความสำคัญต่อการเข้าทำลายของ

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

zoospore และมีความแตกต่างกันระหว่างพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่ซึ่งพืชใบเลี้ยงคู่จะถูกเข้าทำลายน้อยกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยวพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ zoospore บริเวณรากพืชจะเพิ่มการเข้าทำลายของ zoospore ที่บริเวณรากพืชเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส

Postma *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Py. aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าของแตงกวาที่ปลูกในวัสดุปลูก rockwool โดยเชื้อ *Lysobacter enzymogenes* สายพันธุ์ 3.1T8 ร่วมกับไคโตซาน พบว่าสามารถควบคุมเชื้อ *Py. aphanidermatum* ได้ 50-100 เปอร์เซ็นต์ซึ่งอาจเป็นผลจากไคโตซานไปกระตุ้นการทำงานของเชื้อปฏิปักษ์ *L. enzymogenes* ได้ดียิ่งขึ้น

การรายงานถึงการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น สาร butyrolactones, 2,4-diacetylphloroglucinol (Ph1), pyoluterin (Plt), hydrogen cyanide, oomycin A, phenazine, pyoluteorin, pyrrolnitrin, tensin, tropolone และ cyclic lipopeptides ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* และ สาร xanthobaccin, kanosamine, zwittermicin A และ oligomycin A ซึ่งผลิตจาก *Bacillus*, *Streptomyces* และ *Stenotrophomonas* spp. (Laville *et al.* 1992; Defago. 1993; Sacherer *et al.* 1994; Nielsen and Sorensen. 2003)

Nielsen and Sorensen (1999) ทำการศึกษาเชื้อ *Ps. fluorescene* ที่แยกได้จากบริเวณเขตรากพืช *Beta vulgaris* พบว่ามีความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Py. ultimum* เนื่องจากมีความสามารถในการย่อยสลายไคตินโดยอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง endochitinase และ chitobiosidase ที่เป็น extracellular enzyme ในการย่อยสลายไคตินได้ อีกทั้งจะปลดปล่อยออกมาในช่วง stationary phase

Nyochembeng *et al.* (2002) รายงานว่า เชื้อ *Py. myriotylum* ก่อให้เกิดโรครากเน่าของต้นกระดาดดำ เมื่อทำการทดลองโดยใช้ soaking solution ซึ่งมีส่วนประกอบของแคลเซียม และ น้ำตาล sucrose พบว่าช่วยลดความสามารถของ sporangia ในการปลดปล่อย zoospores ที่จะเข้าทำลายรากของต้นกระดาดดำได้

Folman *et al.* (2004) รายงานว่าเชื้อ *L. enzymogenes* สายพันธุ์ 3.1T8 สามารถยับยั้ง *Py. aphanidermatum* ในแตงกวาที่ปลูกในระบบปลูกพืชไม่ใช้ดิน พบว่าในสภาพห้องปฏิบัติการ *L. enzymogenes* สายพันธุ์ 3.1T8 ผลิตสาร antibiotic ยับยั้งการงอกของ zoospore ของ *Py. aphanidermatum* ได้

Islam *et al.* (2005) ได้รายงานถึงสาร xanthobaccin ที่ได้จาก *Lysobacter* spp. ที่แยกได้จากบริเวณเขตรากพืชสามารถยับยั้ง zoospore ของ Aphanomyces และสามารถทำลายเชื้อ *Py. aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าของแตงกวาได้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยใช้สารเพียง 3 ไมโครกรัมต่อต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

105507

แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชมีส่วนช่วยในการควบคุมเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชได้ด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น การสร้าง siderophore ซึ่งสารดังกล่าวมีความสามารถในการจับกับอนุมูลของธาตุเหล็กในดิน ทำให้เชื้อสาเหตุโรคที่มีความจำเป็นต้องใช้ธาตุธาตุเหล็กในการเจริญนั้นถูกยับยั้งการเจริญเติบโต โดยพบได้มากในเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* spp. จากการรายงานของ Latour *et al.* (2003); Djibaoui and Bensoltane (2005); Compant *et al.* (2005) พบว่า *Ps. Chlororaphis*, *Ps. fluorescens*, *Ps. jessenii* และ *Ps. putida* สามารถสร้างสาร siderophore พวก pyoverdines ซึ่งเป็นสารสีเขียวอมเหลืองที่ช่วยลดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เนื่องจากการแข่งขันในการแย่งเหล็กเพื่อใช้ในการเจริญ โดยเฉพาะภายใต้สภาวะที่ธาตุเหล็กมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้ยังพบว่าสาร siderophore บางชนิดยังมีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Bakker *et al.* 1993)

Pagliaccia *et al.* (2007) พบว่าการใช้ fluorescent pseudomonad ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินจะสามารถลดความรุนแรงของโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* และ *Phytophthora* ได้ อาจเนื่องมาจากการที่ fluorescent pseudomonad สามารถเจริญครอบครองรากได้ในส่วนของ rhizoplane อีกทั้งยังสามารถสร้างสารพวก siderophores ในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรค และประสิทธิภาพในการควบคุมจะดีขึ้นเมื่อมีการเติมสารจำพวก nitrapyrin ลงไป ทั้งยังสามารถยับยั้งการเข้าไปติดเชื้อของ zoosporic ได้อีกด้วย

Molina *et al.* (2000) ได้ศึกษาการเข้าครอบครองรากข้าวโพด และถั่วเหลืองโดยเชื้อ *Ps. putida* KT 2440 ในสภาพโรงเรือนเมื่อใส่เชื้อ *Ps. putida* KT 2440 ลงไปในดินที่ปลูกข้าวโพดและถั่วเหลือง พบว่าความสามารถในการอยู่รอดของประชากรแบคทีเรียมีความหนาแน่นสูงในบริเวณ rhizosphere และเมื่อพิจารณาถึงวัสดุปลูก 2 ชนิดคือ ในดินกับ bulk soil พบว่าเชื้อ *Ps. putida* KT 2440 ที่เติมลงในดินมีความหนาแน่นมากกว่า bulk soil และ Raja *et al.* (2002) ได้ศึกษาโดยทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบริเวณรากพืชและใบ โดยทำการศึกษาภายในห้องปฏิบัติการและในแปลงทดลอง พบว่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บริเวณเขตรากพืชและใบ มีผลต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช

Khan *et al.* (2003) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *Ps. chlororaphis* สายพันธุ์ Tx-1 โดยจะใส่แบคทีเรียปริมาณ 2×10^{3}-1.2×10^{5} cfu/ml ลงในสารละลายธาตุอาหาร 3 วันหลังจากทำการปลูกเชื้อ *Py. aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าในพริกหวานในระบบปลูกไม่ใช้ดินในสภาพโรงเรือน พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทำให้พริกหวานไม่แสดงอาการโรครากเน่าสีน้ำตาล นอกจากนี้ *Ps. chlororaphis* ยังช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากเชื้อโรคอีกด้วย และยังพบว่าเชื้อยังสามารถครอบครองรากได้เท่ากับ 0.7-0.78 cfu/g โดยจะส่งผลให้ zoospore ไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้นอกจากนี้ยังช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากเชื้อโรค 18 – 48 เปอร์เซ็นต์สำหรับเดือนมกราคม 50 – 73 เปอร์เซ็นต์สำหรับเดือน กุมภาพันธุ์ และ 62 – 77 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเดือนมีนาคม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chen *et al.* (2000) รายงานว่า แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่สนับสนุนการเจริญของพืช หรือ Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) สามารถยับยั้งการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจาก *Py. aphanidermatum* ในต้นแตงกวาได้ โดยการเติมแบคทีเรีย *Ps. corrugate 13* หรือ *Pseudomonas aureofaciens* 63-28 เพื่อกระตุ้นให้รากของแตงกวามีการผลิตเอนไซม์ชนิด peroxidase ป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อ *Py. aphanidermatum*

ในเรื่องการชักนำพืชให้เกิดความต้านทานพบว่าแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชบางสายพันธุ์ สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคพืชได้ทั้งทางใบ และทางรากเช่น

จากการรายงานของ Hanafi and Fellah (2006) ได้ทำการศึกษาการชักนำให้มะเขือเทศเกิดความต้านทานต่อโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* พบว่า *B. subtilis* สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Han *et al.* (2000) พบว่า เชื้อ *Ps. fluorescens* สายพันธุ์ 89B-27 และ *Serratia marcescens* สายพันธุ์ 90-166 สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคแอนแทรกโนส โรคเหี่ยว โรคใบจุด และโรคด่างไวรัสได้ในพืชตระกูลแตง โดยการใช้ seed treatments

Chen *et al.* (1999) ทำการทดสอบ salicylic acid (SA) ที่ผลิตจากเชื้อ *Py. corrugate* สายพันธุ์ 63-28 ชักนำให้รากของแตงกวาต้านทานต่อ *Py. aphanidermatum* พบว่า SA มีการสะสมภายในเซลล์รากพืชซึ่งไม่ได้ยับยั้งการเกิดโรคแต่ SA ที่สะสมในรากอาจชักนำให้พืชมีความต้านทานมากขึ้น

จากการรายงานข้างต้นเห็นได้ว่า การควบคุมโดยชีววิธีถือได้ว่าประสิทธิภาพการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* spp.และมีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อมแล้วยังมีการรายงานการควบคุมด้วยวิธีอื่นๆที่มีประสิทธิภาพด้วยเช่น

Sheng *et. al.* (2002) ได้ทำการทดลองหาวิธีป้องกันกำจัดโรค Pythium root rot โดยทำการปลูกต้นถั่วลงในถาดเพาะเมล็ดที่ผ่านการใช้แล้ว ซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อเป็นอย่างดีโดยก่อนการเพาะเมล็ดได้นำถาดเพาะเมล็ดไปแช่ในสารละลาย calcium hypochlorite (2000 ppm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนที่จะนำเมล็ดลงไปปลูก ผลปรากฏว่า วิธีนี้สามารถป้องกันกำจัดโรค Pythium root rot ได้ ความรุนแรงของโรคจะลดจากที่มีมากถึง 60-80 เปอร์เซ็นต์เหลือเพียงน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดถั่วจะงอกมากขึ้นโดยเฉลี่ยประมาณ 212-772 กรัม/ถาด

Tu (2002) ทำการทดลองป้องกันกำจัดโรค Pythium root rot ในมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Py. aphanidermatum* โดยใช้วิธีการแบบผสมผสานพบว่าก่อนการย้ายต้นกล้าจะใช้ระบบรังสี UV 100 $mJ.cm^{-2}$ ต่อเข้ากับระบบการให้สารละลายธาตุอาหารพืช เพื่อฆ่าเชื้อสารละลายธาตุอาหารที่หมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ และ หลังย้ายต้นกล้าจะทำการปรับค่า pH ของสารละลายธาตุอาหารให้ค่า pH=5 เป็นเวลา 5 สัปดาห์ หลังจากนั้นปรับค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 5.8-6.2 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถควบคุมโรค Pythium root rot ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grote *et. al.* (1992) ทำการศึกษาวิธีการควบคุมเชื้อ *Py. aphanidermatum* ในการปลูกมะเขือเทศและแตงกวาโดยใช้ Propamocarb ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อราที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Py. aphanidermatum* ในสภาพ in vitro ได้ และเมื่อใช้ Propamocarb ผ่านทางสารละลายธาตุอาหารในระบบการปลูกพืชจะสามารถกำจัดโรครากเน่าได้ 7-21วัน

Zhao *et. al.* (2000) ศึกษาการควบคุมโรค Pythium root rot ในแตงกวาด้วย Silver-coated cloth (SCC) เมื่อใส่ SCC ลงในสารละลายธาตุอาหารพบว่าสามารถลดอาการรากเน่าได้ 100 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 วันหลังจากที่ทำการปลูก zoospore ของเชื้อ *Py. aphanidermatum*

2.6 วิธีการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

การจัดจำแนกแบคทีเรียในระยะเริ่มแรกใช้วิธีการดูรูปร่าง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบง่ายๆ โดย Van Leeuwenhoek ได้ส่องกล้องพบแบคทีเรียมีรูปร่างต่างๆ กันแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ รูปกลม (cocci) รูปแท่ง (bacilli) และรูปเกลียว (spirals) จนในปี ค.ศ. 1763 Michael Adanson ได้เขียนหนังสือชื่อ Familles des Plants เกี่ยวกับการจัดจำแนกพืชรวมทั้งแบคทีเรีย โดยมีหลักการต่างจากของ Linnaeus คือ จัดในลักษณะที่เรียกว่า unweight system โดยศึกษาลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตแล้วให้แต่ละลักษณะเป็นอิสระต่อกัน คือ มีน้ำหนักที่จะนำมาใช้ในการจัดกลุ่มเท่าๆ กัน ในระยะแรกไม่ได้รับความสนใจ เนื่องจากวิธีการยุ่งยากจนกระทั่งโลกมีวิทยาการทางด้านคอมพิวเตอร์ นักวิทยาศาสตร์รุ่นหลังจึงได้นำหลักการนี้กลับมาใช้ใหม่ในงานด้านนี้อีกครั้ง ในระหว่างปี ค.ศ. 1915-1918 Buchanan นักแบคทีเรียชาวอเมริกัน เป็นคนแรกที่เริ่มจัดแบคทีเรียให้เป็นระบบ ได้ตีพิมพ์ผลงานเรื่อง Studies on the nomenclature and classification of the bacteria ลงในวารสาร Journal of Bacteriology โดยได้มีการจัดแบ่งแบคทีเรียออกเป็นวงศ์ (family) เผ่าพันธุ์ (tribe) และสกุล (genus) โดยอาศัยลักษณะหลายๆ อย่าง ทั้งทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และความสามารถในการทำให้เกิดโรค จากผลงานนี้มีส่วนกระตุ้นให้สมาคมนักแบคทีเรียวิทยาของอเมริกา ได้จัดตั้งคณะกรรมการพิจารณาเรื่องราวเกี่ยวกับการจำแนกแบคทีเรีย จนในที่สุดได้เป็นหนังสือที่จัดว่าเป็นคู่มือที่สำคัญที่สุดในการศึกษาเกี่ยวกับอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย คือ หนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พิมพ์ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1923 (วิชัย โฆสิตรัตน. 2549; ดวงพร คันธโชติ. 2537) จนในปัจจุบันการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียมีอยู่หลายวิธี เช่น

2.6.1 การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ

การตรวจสอบโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (Selective medium) เป็นวิธีตรวจสอบที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก โดยจะมีการเติมสารเฉพาะบางอย่าง เช่น การเติมสารอาหารที่เชื้อต้องการ การปรับค่าความเป็นกรด - ด่างให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ต้องการศึกษา การเติมสารปฏิชีวนะเพื่อไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ไม่ต้องการ เช่น การศึกษาของ

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schaad and Forster (1985) ใช้อาหารสูตร XTS ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *translucens* สาเหตุของโรคในข้าวสาลีพบว่าอาหาร XTS สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ 91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร XTS มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีเหลืองเป็นมันวาว

2.6.2 ลักษณะทางสันฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยา (Morphology) เป็นการศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการตรวจดูรูปร่าง ที่จัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างแคปซูล สปอร์ หรือแฟลกเจลลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) เป็นวิธีที่ใช้สำหรับบ่งชี้สภาพการติดเชื้อและรูปร่างลักษณะ ตลอดจนโครงสร้างของเซลล์ การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) สามารถช่วยในการตรวจเกี่ยวกับรูปทรงของเชื้อและสภาพการอยู่อาศัย หรือการเกาะกินเซลล์ และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) สามารถบอกได้ถึงตำแหน่งหรือบริเวณส่วนของเนื้อเยื่อแบคทีเรีย และสามารถบอกการจัดเรียงตัว จำนวน และตำแหน่งแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นคุณสมบัติประการหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการตรวจแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ต้องกระทำควบคู่ไปกับวิธีอื่นๆ ซึ่งจะช่วยให้สามารถพิสูจน์ลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียได้ (ณัฐธิยา เบือนสันเทียะ. 2547)

2.6.3 ส่วนประกอบของผนังเซลล์

เป็นการศึกษาถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Cell-wall composition) ที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ตัวอย่างเช่นการศึกษาในส่วนของ peptidoglycan, lipopolysaccharide, lipoprotein, teichoic acid และ amino acid อีกหลายชนิดที่มีความแตกต่างกันในด้านโครงสร้าง การศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์นี้สามารถทดสอบได้ง่ายด้วยวิธี thin layer chromatography ซึ่งเหมาะที่จะใช้ในกรณีที่แบคทีเรียสกุลนั้นมีสายพันธุ์อยู่เป็นจำนวนมาก (Kandler and Weiss. 1986)

2.6.4 การทดสอบทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี

การจัดจำแนกทางสรีรวิทยา (Physiology) เป็นการจัดจำแนกโดยการศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียภายใต้สภาวะของ อุณหภูมิ สภาพความเป็นกรด-ด่าง สภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศ ความสามารถในการทนเกลือภายใต้สภาวะที่จำเพาะของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Brown. 2005) ซึ่งปัจจุบันมีการคิดค้นกรรมวิธีต่างๆ ออกมาให้ง่ายต่อการทดสอบมากยิ่งขึ้น เช่น การจัดจำแนกด้วยวิธี MicroStation™ System ซึ่งเป็นวิธีการจัดจำแนกโดยอาศัยผลจากกระบวนการหายใจของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการออกซิไดซ์คาร์บอนที่แตกต่างกัน หรือเรียกระบบการจัดจำแนกนี้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

"Biolog" ซึ่งการอ่านและแปลผลจะดูจากการเปลี่ยนสีจากแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 95 แหล่ง (Prathuangwong and Chankhan. 2002)

การทดสอบจากชุดทดสอบ ซึ่งในปัจจุบันชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นมีหลายชนิดทั้งแบบใช้มือและแบบอัตโนมัติ สามารถใช้กับจุลินทรีย์แต่ละประเภท เช่น API, Enterotube หรือ Crystal ผลที่ได้เทียบเคียงได้กับวิธีการดั้งเดิมและประหยัดเวลากว่า (Brown. 2005)

การทดสอบทางชีวเคมี โดยเครื่องจำแนกชนิดจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEK เป็นเครื่องที่เคยใช้ในโครงการอวกาศของนาซ่า ด้วยการออกแบบการ์ดที่มีขนาดเล็กเท่ากับบัตรเครดิต ซึ่งภายในแผ่นการ์ดจะมีช่องบรรจุ biochemical substrate เมื่อเตรียมเชื้อที่ต้องการทดสอบที่อยู่ในรูปสารแขวนลอย (suspension) และใส่ลงในแผ่นการ์ด VITEK หลังจากนั้นจึงนำแผ่นการ์ด VITEK ไปบ่มในตู้บ่มและเครื่องอ่าน (incubator / reader) ของเครื่อง VITEK จะอ่านค่าการดูดกลืนแสง (OD) ทุกๆ ชั่วโมง (kinetic reading) ในช่องบรรจุสับสเตรทซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาหรือการเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละช่องและรายงานผลภายในเวลา 4-12 ชั่วโมงขึ้นกับชนิดของเชื้อ (bioMérieuxSA. 2009)

2.6.5 การทดสอบทางเซรุ่มวิทยา

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยา(Serology) มาใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบและจัดจำแนก เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้รวดเร็ว มีความไว และความแม่นยำในระดับที่น่าเชื่อถือ วิธีการทางเซรุ่มวิทยาที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย (ณัฐธิยา เบือนสันเทียะ. 2547) ได้แก่

2.6.5.1. เทคนิค latex agglutination test (LAT) (Seal and Elphinstine. 1994) เป็นการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรั่มที่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนชนิดนั้นๆ โดยแอนติเจนจะจับด้วยแอนติซีรั่มจนมีขนาดใหญ่ เกิดการรวมกลุ่มและตกตะกอนสีขาวขุ่นขึ้น (agglutination) มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นภายใต้ตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งตัวกลางที่จะนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยาต้องมีลักษณะสำคัญ โดยจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน เช่น parafilm oil, collodion เป็นต้น มีการใช้เทคนิค LAT ในการตรวจหาโรคพืชหลายชนิด เช่น ตรวจหาเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และไฟโตพลาสมา (Omura *et al.* 1984) โดยสามารถตรวจสอบได้ในอาหาร เนื้อเยื่อพืช และแมลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.5.2. เทคนิค Ouchterlony diffusion (Seal and Elphinstine. 1994) เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาการรวมกันระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรั่มที่มีความจำเพาะกับแอนติเจน โดยดูจากการให้แอนติเจนและแอนติซีรั่มซึมเข้าหากันผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้น เมื่อมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นจะเกิดการรวมตัวเห็นเป็นตะกอนขาวขุ่นซึ่งตะกอนแสดงถึงปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรั่มแต่ละคู่

2.6.5.3. เทคนิค Immunofluorescence microscopy เป็นเทคนิคการตรวจแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงเรือง (fluorescence microscope) เป็นวิธีที่ง่ายและสามารถตรวจหาแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืชได้อย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียที่มีในปริมาณที่น้อยในเนื้อเยื่อพืช เช่น มีเชื้อประมาณ 100-200 เซลล์ ซึ่งถ้านำไปตรวจดูด้วย Bright Field นั้นจะมองเห็นตัวอย่างที่ต้องการตรวจดูไม่ชัดเจน วิธีนี้เป็นการตรวจหาแบคทีเรียโดยใช้ปฏิกิริยาการจับยึดกันระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรั่ม ด้วยการใช้สารติดฉลากกับแอนติซีรั่มเข้าร่วมในปฏิกิริยา (ณัฐธิยา เบือนสันเทียะ. 2547; สุรนันท์ ตีระวัฒนพงษ์ และอรทัย กังวาลชิรธาดา. 2539; Malin *et al.* 1983) ซึ่งสามารถติดฉลากสารเรืองแสงเหล่านี้บนแอนติซีรั่มได้โดยไม่ทำให้คุณสมบัติของแอนติซีรั่มสูญเสียไป

2.6.5.4. เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคการทดสอบที่อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรั่ม ให้มีความไว และความจำเพาะสูงขึ้น โดยการนำแอนติเจนหรือแอนติซีรั่มที่ติดฉลาก (label) ไว้ด้วยสารต่างๆ เช่น สารเรืองแสง (fluorescent dye) สารกัมมันตภาพรังสี (radioisotope) มาใช้ในการทดสอบเหล่านั้น ถึงแม้การทดสอบดังกล่าวจะมีความไวสูง แต่ยังมีข้อจำกัดบางประการในการใช้ คือ ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงในการทดสอบ เช่น กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) จึงได้มีการคิดค้นสารอื่นๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นสารติดฉลากได้และมีข้อดีกว่าสารเรืองแสง สารชนิดหนึ่งที่พบว่าสามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดี คือ เอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์หนึ่งโมเลกุล สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น (substrate) ได้หลายโมเลกุล ดังนั้นการใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลากจึงช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรั่มที่เกิดขึ้นในการทดสอบ นอกจากนี้เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดสอบยังมีความคงทน สามารถเก็บไว้ได้นานในสภาวะต่างๆ ปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารตั้งต้นทำให้เกิดผลิตผลที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่ายและชัดเจนโดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และเมื่อต้องการบันทึกผลโดยละเอียด ก็สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือสำหรับวัดความเข้มข้นของสี หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้นจากเครื่อง ELISA reader (สุรนันท์ ตีระวัฒนพงษ์ และอรทัย กังวาลชิรธาดา. 2539) ปริมาณของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยจะเท่ากับปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติซีรั่มที่อยู่ในตัวอย่างที่นำมาตรวจ วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณน้อย (highly sensitive) และยังสามารถใช้ในการตรวจหา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอนติเจนที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เช่น โปรตีนขนาดเล็ก อนุภาค ไวรัส สปอร์ เชื้อรา และเซลล์ของแบคทีเรีย (Clark. 1981)

2.6.5.5. เทคนิค Dot blotting เป็นเทคนิคที่คล้ายกับ ELISA แต่ในการศึกษาใช้ nitrocellulose membrance เป็น solid phase แทนหลุมพลาสติกในการทดสอบสารแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี และพบว่าให้ผลดี และเรียกวิธีการนี้ว่า dot-immunobinding assay (DIA) วิธีการดังกล่าวอาจมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปเช่น membrance immunobinding assay (MIBA) (Abad and Moyer. 1992) หรือ dot blot immunoassay (DBIA) (Hsu and Lawson. 1991) วิธีการนี้ได้มีการพัฒนาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสของพืชและเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิวกระดาษไนโตรเซลลูโลสนั้นดีกว่าบนหลุม microtiter plate มีรายงานว่าวิธีการนี้มีความไวได้ดีกว่าวิธี ELISA 8 เท่า (Hsu and Lawson. 1991)

2.6.6 Chemoxonomic marker

เป็นเทคนิคที่พิจารณาจากการสร้างสารประกอบทางเคมีที่จำเพาะต่อเชื้อได้แก่ การใช้สารประเภท quinone เช่น menaquinones และ ubiquinones ซึ่งสามารถตรวจสอบสารประเภทนี้ได้โดยวิธี high pressure liquid chromatography (HPLC) (Pot *et al.* 1994) หรือการทดสอบการมี fatty acid methyl ester (FAME) ซึ่งทำการวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี gas liquid chromatography (GC) ซึ่งจะสามารถจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกและลบได้ (Moss *et al.* 1994)

2.6.7 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคด้าน nucleic acid (nucleic acid technique)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านกรดนิวคลีอิก มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เทคนิคดังกล่าวอาศัยการจับคู่กันระหว่างนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิกที่เป็นคู่สมกัน มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุของโรคอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคดังกล่าวมีความไว แม่นยำ และความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยา (Seal and Elphinstine. 1994) เทคนิคที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ ดังนี้

2.6.7.1 การศึกษาองค์ประกอบของดีเอ็นเอ เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในระดับโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบเบสที่เป็นองค์ประกอบซึ่งแสดงในรูป mol% G+C (Stiles and Holzapfel. 1997) แต่บางครั้งแบคทีเรียที่ไม่มีความสัมพันธ์กันอาจมี mol% G+C ที่ใกล้เคียงกันได้ (Pot *et al.* 1994)

2.6.7.2 DNA: rRNA Hybridization เป็นเทคนิคที่ใช้ความสัมพันธ์ของลำดับเบสบนสาย DNA และ RNA ในการจัดจำแนกซึ่งมีการนำมาใช้หลายรูปแบบ เช่นการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA และ 23s rRNA โดยการเปรียบเทียบความเหมือน เนื่องจากไรโบโซมมีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิด ที่ทำหน้าที่อย่างแน่นอน คือมีการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ อีกทั้งไรโบโซมมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ ซึ่งมีการอนุรักษ์ในระดับที่เหมาะสม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าโครงสร้างนี้มีหน้าที่แน่นอนและมีความสำคัญต่อเซลล์ และ rRNA ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะแน่นอน จึงสามารถนำมาใช้สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต (Madigan and Martino. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อ *Pythium* spp. จากผักกินใบ

3.1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร

2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์

3) Needle

4) โกร่ง และไม้บด

5) แท่งแก้วรูปตัวแอล

6) ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น ATF 20303H (Clean, USA)

7) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 รุ่น BJ 210C (Precisa, Switzerland)

8) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar: CMA (Himedia, India)

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]

3) Methyl-1 (butylcarbamoyl)-benimidzol-2-ylcarbamate: Benomyl® (Du pont, Thailand)

4) Nystatin (Bristol-Myers Squibb, USA)

5) Pentachloronitrobenzene: PCNB (Sigma, USA)

6) Rifampicin (Olic (Thailand) Limited, Thailand)

7) Ampicillin (Siam, Thailand)

8) Sodium hypochlorite (Clorox®, USA)

3.1.3 ตัวอย่างผักกินใบที่นำมาแยกเชื้อ *Pythium* spp.

ตัวอย่างพืชที่นำมาแยกเชื้อ *Pythium* spp. จะเลือกเก็บพืชที่แสดงอาการรากเน่าทั้งหมด 6 ตัวอย่างที่ได้มาจากผักกินใบที่ปลูกในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ได้แก่ *Lactuca sativa* cv. Red oak และ *L. sativa* cv. Butter head จากกรุงเทพมหานคร *L. sativa* cv. Green oak และ *L. sativa* cv.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cos จากจังหวัดฉะเชิงเทรา และ *L. sativa* cv. Green oak และ *L. sativa* cv. Red oak จากจังหวัดสมุทรปราการ

3.1.3 วิธีการการแยกเชื้อ

การแยกเชื้อ *Pythium* spp. เริ่มจากนำรากพืชตัวอย่างมาล้างผ่านรากของพืชตัวอย่างด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่กับรากออก ตัดรากเป็นท่อนขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร ชั่งรากจำนวน 1 กรัม นำไปแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วย้ายไปแช่ในน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที นำไปบดในโกร่ง ด้วยไม้บดค่อยๆ เติมน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่มีรากอยู่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วบนจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารคัดเลือกจำเพาะ [CMA ที่มีส่วนผสมของสารควบคุมเชื้อราและยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น benomyl 10 ppm, nystatin 25 ppm, PCNB 25 ppm, rifampicin 10 ppm และ ampicillin 500 ppm (CMA+BNPRA)] ด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการย้ายโคโลนีเส้นใยของเชื้อ *Pythium* spp. ที่ปรากฏบนอาหาร CMA+BNPRA ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ และเก็บเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป โดยตัดเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA ลงไปในหลอดอาหาร CMA เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน นำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคจากเชื้อ *Pythium* spp.

3.2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร

2) ฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์นิ้ว

3) ผ้าขาวบาง

4) ภาชนะปลูกพืชขนาด 18 ×45×15 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5) Cork borer No.3 (Mark, China)

6) Haemacytometer 0.1 มิลลิเมตรรุ่น Neabauer (Boeco, Germany)

7) เครื่องปั่นไฟฟ้า blender รุ่น TB 20 (Toyobishi, Taiwan)

8) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)

9) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 g รุ่น BJ 210C (Precisa, Switzerland)

10) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)

11) เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า EC meter รุ่น ECScan high (Eutech, Singapore)

12) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น pHTestr 30 (Eutech, Singapore)

13) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด compound microscope รุ่น Eclipse E200 (Nikon, Japan)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar: CMA (Himedia, India)

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]

3) อาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 broth [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยน้ำผลไม้รวม 8 ชนิด (V8 vegetable juice) 200 มิลลิลิตร และปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ค่าประมาณ 6.8±0.2 (ดัดแปลงจาก Ronald. 1995)]

4) สารละลายธาตุอาหารพืช [จากการเตรียมสารละลายตั้งต้นปริมาตร 10 ลิตร; A: $CaNO_3$ 670 กรัม KNO_3 296 กรัม และ Fe-EDTA 50 กรัม B: KNO_3 296 กรัม KH_2PO_4 177 กรัม $MgSO_4$ 160 กรัม และ Microelements: Nick Spray® 30 กรัม (ดัดแปลงจาก Benoit. 1992)]

5) Nitric acid (Ajax Finechem, New Zealand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การเตรียมพืชทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค

ทำการเพาะเมล็ด *L. sativa* cv. Red oak และ *L. sativa* cv. Butter head โดยทำการหยอดเมล็ดพืชทดสอบลงในฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์นิ้ว นำไปแช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 4 วัน ทำการเติมสารละลายธาตุอาหารโดยปรับปรุงตามสูตรของ Benoit (1992) โดยปรับค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง EC meter ให้อ่านให้ได้ประมาณ EC 0.5 mS/cm และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย nitric acid ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าด้วยเครื่อง pH meter อ่านค่าระหว่าง pH 5.6-6 เมื่อพืชอายุ 10 วัน นำไปอนุบาลต้นกล้าภายในรางปลูกขนาด 18 ×45×15 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยปรับค่า EC เท่ากับ 0.8 mS/cm และ pH ระหว่าง 5.6-6 เมื่อพืชมีอายุ 20 วัน ทำการเพิ่มค่า EC เป็น 1.6 mS/cm และ pH 5.6-6 นำพืชไปทดสอบต่อไป

3.2.4 การเตรียมเชื้อ *Pythium* spp. เพื่อใช้ในการทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค

นำเชื้อ *Pythium* spp. ที่แยกได้จากตามข้อ 3.1.3 ออกจากตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตัดเส้นใยเชื้อย้ายลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ทำการย้ายเชื้อลงอาหาร PDA อีกครั้ง นำเชื้อไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ จากนั้นทำการเลือกเชื้อ *Pythium* spp. ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างพืชตามข้อ 3.1 ทำการย้ายเส้นใยของเชื้อราที่เลือกลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร อยู่ภายใน เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนของเส้นใยด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบดด้วยเครื่อง blender ที่ความแรงเครื่องสูงสุด 20 วินาที นำเส้นใยที่ได้ไปทำการตรวจนับส่วนของเส้นใย (propagules) ด้วย haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด compound microscope ที่กำลังขยาย 40 เท่าปรับความเข้มข้นของ propagules ให้อยู่ระหว่าง 1-5×10^6 propagules นำเชื้อที่ได้ไปปลูกลงพืชทดสอบต่อไป

3.2.5 วิธีการทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค

ทดสอบความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่า โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 3 ซ้ำ แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบกับพืช 2 ชนิด โดยนำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมจาก ข้อ 3.2.4 มาปลูกลงพืชทดสอบโดยนำรากพืชทดสอบไปจุ่มในสารละลายเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ทำการบันทึกค่าความรุนแรงของการเกิดโรค (disease severity) ตามวิธีของ (Brien *et al.*, 1991; Harveson and Rush, 2002) โดยสเกลค่า 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า (ภาพที่ 3.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยบันทึกผลเป็นเวลา 5 วัน นับจากการปลูกเชื้อ นำค่าความรุนแรงการเกิดโรคที่ได้นำมาคำนวนค่าดัชนีความรุนแรงการเกิดโรคตามสมการของ Idris *et al.* (2008) ดังนี้

$$\text{Root rot index} = \frac{\sum(\text{Rating no.} \times \text{No. of plants in the rating})}{\text{Total no. plants} \times \text{Highest rating}} \times 100$$

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีการของ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ทำการคัดเลือกเชื้อ *Pythium* spp. สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าที่มีอัตราความรุนแรงการเกิดโรคสูงสุดใช้ในการศึกษาต่อไป

ภาพที่ 3.1 อาการรากเน่าที่ปรากฏจากระดับความรุนแรงของการเกิดโรค

3.2.6 การจัดจำแนกเชื้อ *Pythium* spp.

นำเชื้อ *Pythium* spp. สายพันธุ์ที่มีอัตราความรุนแรงการเกิดโรคสูงสุดจากข้อ 3.2.5 มาทำการย้ายเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA นำเชื้อไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ cork borer No.3 เจาะส่วนปลายสุดของเส้นใยไปเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA, V-8 agar และ CMA เลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อมีอายุตั้งแต่ 48 ชั่วโมงจนถึง 5 วันทำการเขี่ยนเส้นใยเชื้อไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด compound microscope บันทึกลักษณะของ sporangium, vesicle, oogonium, antheridium และ oospores ที่ปรากฏ และนำไปจัดจำแนกโดยเปรียบเทียบลักษณะที่พบกับลักษณะที่ให้ไว้ใน Plaats-Niterink (1981)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การแยกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช (rhizosphere bacteria)

3.3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์
3) Loop
4) โกร่ง และไม้บด
5) แท่งแก้วรูปตัวแอล
6) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)
7) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 รุ่น BJ 210C (Precisa, Switzerland)
8) Vortex mixer รุ่น MS1 Mini shaker (IKS, Canada)
9) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)
10) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด stereoscopic microscope รุ่น SMZ 645 (Nikon, Japan)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ peptone tryptone yeast glucose agar: PTYGA [จากการเตรียมใน 1 ลิตร ประกอบด้วย peptone 0.25 กรัม tryptone 0.25 กรัม yeast extract 0.5 กรัม น้ำตาลกลูโคส 0.5 กรัม $MgSO_4$ 3 กรัม $CaCl_2$ 3.5 กรัม และวุ้น 18 กรัม (Koohakan *et al.* 2004)]
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (=soybean casein digest agar): TSA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)
3) อาหารเลี้ยงเชื้อ King's medium B [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วย; Proteose peptone No.3 20 กรัม K_2HPO_4 anhydrous 1.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 1.5 กรัม Glycerol 500 มิลลิลิตร และวุ้น 20 กรัม (Ronald. 1995)]
4) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)
5) Sodium hypochlorite (Clorox®, USA)
6) Hydrogen peroxide 35 เปอร์เซ็นต์ (Ajax Finechem, New Zealand)

3.3.3 ตัวอย่างผักกินใบที่นำมาแยกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช

เก็บตัวอย่างพืชที่ปลูกในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทั้งหมด 16 ตัวอย่างในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน 4 แบบคือ nutrient film technique (NFT) 4 ตัวอย่าง, deep flow technique (DFT) 6 ตัวอย่าง, dynamic root floating technique (DRFT) 7 ตัวอย่าง และ substrate culture 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่าง จากสมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา นครราชสีมา และเชียงใหม่ ดังตารางที่ 3.1 และตัวอย่างระบบการปลูกพืชข้างต้นแสดงภาพที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างพืชที่นำมาทำการแยกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชในแบบต่างๆ ของระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

ชนิดพืช	ระบบการปลูกพืช	สถานที่
L. sativa cv. Red coral	NFT	อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา
L. sativa cv. Cos	NFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
L. sativa cv. Red oak	NFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Nutrient solution (Cos and Red oak)	NFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Apium graveolens: Celery	DFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Mental cordifolia: Peppermint	DFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Nasturtium officinale: Water cress	DFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Nutrient solution (Celery)	DFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Nutrient solution (Peppermint)	DFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Nutrient solution (Water cress)	DFT	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
L. sativa cv. Cos	DRFT	กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ
L. sativa cv. Frillice iceberg	DRFT	กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ
L. sativa cv. Green oak	DRFT	กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ
L. sativa cv. Red oak	DRFT	กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ
Nutrient solution (Frillice iceberg)	DRFT	กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ
Nutrient solution (Frillice iceberg and Cos)	DRFT	กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ
Nutrient solution (Green oak)	DRFT	กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ
Nutrient solution (Red oak)	DRFT	กิ่งอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ
Brassica oleracea: Chinese kale	Substrate[1/]	โครงการพื้นฟูสภาพป่าเชียงดาว-
Beta vulgaris: Swiss chard	Substrate	ไชยปราการณ์
Substrate (Chinese kale)	Substrate	อันเนื่องมาจากพระราชดำริ
Substrate (Swiss chard)	Substrate	จังหวัดเชียงใหม่

[1/] Substrate ประกอบไปด้วย ขุยมะพร้าวผสมกับแกลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

ที่มาภาพ : Soilless Culture Forum of Thailand

ซึ่งตัวอย่างที่ได้มานั้นทำการแยกแบคทีเรียจากส่วนต่างๆ ตามข้อ 3.3.4-3.3.7 และบันทึกลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด stereoscopic microscope

3.3.4 วิธีการแยกแบคทีเรียจากบริเวณรอบราก

นำตัวอย่างสารละลายธาตุอาหารจากข้อ 3.3.3 ที่เก็บมาในแต่ละครั้งมาเจือจางด้วยวิธีการ ten-fold serial dilution ตั้งแต่ 10 ถึง 10^{-8} หลังจากนั้นนำสารละลายที่เจือจาง 3 ความเข้มข้นสุดท้าย นำไปเกลี่ย (spread) ให้ทั่วบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PTYGA, TSA และ King's medium B อย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-72 ชั่วโมง และจากนั้นทำการแยกโคโลนีเดี่ยว (single colony) ที่เกิดขึ้นบนอาหารแต่ละชนิดมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร NA แล้วทำการเก็บรักษาเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.5 วิธีการแยกแบคทีเรียครอบครองราก

นำรากมาล้างผ่านน้ำไหลเบาๆ ชั่งน้ำหนักรากในแต่ละซ้ำจำนวน 1 กรัมไปบดด้วยโกร่งอบฆ่าเชื้อ ค่อยๆ เติมน้ำผ่านการฆ่าเชื้อลงไปจนครบ 10 มิลลิลิตรนำสารละลายที่ได้ไปทำการเจือจางด้วยวิธีการ ten-fold serial dilution จากนั้นทำการแยกแบคทีเรียเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.4

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 วิธีการแยกแบคทีเรียจากบริเวณผิวราก

นำรากมาล้างผ่านน้ำไหลเบาๆ ชั่งน้ำหนักรากในแต่ละซ้ำจำนวน 1 กรัมใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แยกรากออกจากสารละลาย นำเชื้อที่ได้ไปทำการเจือจางด้วยวิธีการ ten-fold serial dilution จากนั้นทำการแยกแบคทีเรียเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.4

3.3.7 วิธีการแยกแบคทีเรียที่เจริญอยู่ภายในเซลล์ราก

นำรากที่แยกออกมาจากข้อ 3.3.6 มาแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นแช่ด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 36 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว 3 ครั้ง นำรากที่ได้ไปบดด้วยโกร่งอบฆ่าเชื้อค่อยๆ เติมน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปจนครบ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ทำการเจือจางด้วยวิธีการ ten-fold serial dilution จากนั้นทำการแยกแบคทีเรียเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. ด้วยวิธี bi-culture test

3.4.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์
3) Needle และ Loop
4) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)
5) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Sanyo, Japan)
6) Cork borer No.2 (Mark, China)

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar: CMA (Himedia, India)
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]
3) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)

3.4.3 การเตรียมแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช และเชื้อ *Pythium* spp. ในการทดสอบ

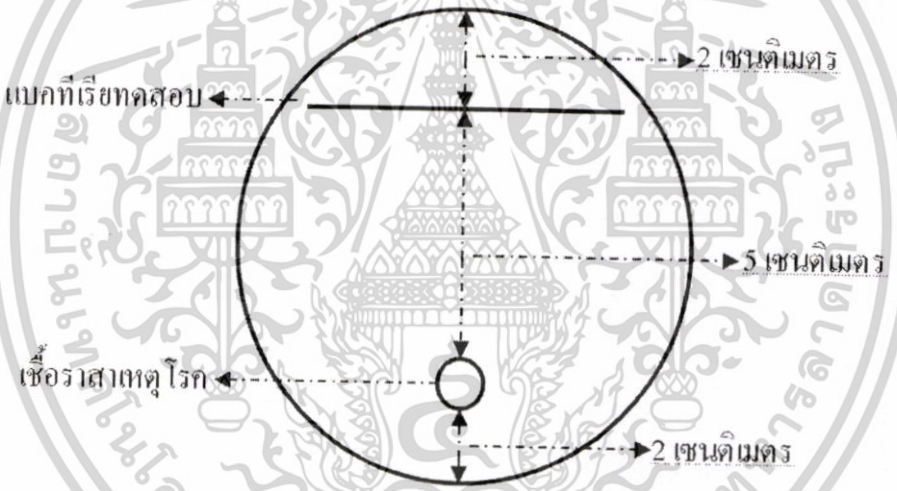
แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากข้อ 3.3.4-3.3.7 ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาขูดเอาเกล็ดน้ำแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่มา streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA นำแบคทีเรียไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการstreakเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA อีกครั้งบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทดสอบต่อไป

เชื้อ *Pythium* spp. ได้จากข้อ 3.2.6 ที่เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ทำย้ายตัดเส้นใยเชื้อ ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร CMA นำเชื้อไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12ชั่วโมง ทำการย้ายเส้นใยเชื้ออีกครั้ง ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปเจาะให้เป็นชิ้นวุ้น (agar plug) ด้วย cork borer No.2 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และนำไปทดสอบต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 วิธีการทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละสายพันธุ์ของเชื้อบริเวณเขตรากพืช ประกอบด้วย 3 ซ้ำ การทดสอบโดยประยุกต์ตามกรรมวิธีของ Morton and Stroube (1955) โดยใช้ loop ที่เผาฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากข้อ 3.4.3 แต่ละ สายพันธุ์ไป streak เป็นทางยาวลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA ให้เป็นเส้นตรงยาว 5 เซนติเมตร โดย streak ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยง 2 เซนติเมตร และวางชิ้นวุ้นของเชื้อ *Pythium* spp. ที่ได้จากข้อ 3.4.3 ที่อีกขอบด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างเชื้อราที่ใช้ทดสอบกับบริเวณเขตรากพืชจะห่างกัน 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.3) ทำการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกผลโดยวัดค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. จากจุดที่วางเชื้อราไปทางแบคทีเรียเขตรากพืชในแนวฉาก ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยการทดลองมีการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ที่เลี้ยงเชื้อ *Pythium* spp. เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 3.3 แผนภาพการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปริเวณเขตรากพืช ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pythium* spp. ด้วยวิธี bi-culture test

การวิเคราะห์ผลโดยนำค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. ที่ได้บันทึกไว้มาคำนวนค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งการเจริญของเส้นใยตามกรรมวิธีของ Mostapha (2004) ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left\{1 - \left(\frac{\text{fungal growth}}{\text{Control growth}}\right)\right\} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดสอบ 2 ครั้งโดยครั้งแรกทำการทดสอบกับเชื้อ *Py. aphanidermatum* (เนื่องจากเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากให้กับพืชปลูกในประเทศไทย) จากนั้นนำ

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยมากกว่า หรือเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบ ครั้งที่ 2 โดยทดสอบกับเชื้อ *Pythium* spp. 2 สายพันธุ์ (มีความรุนแรงการเกิดโรคสูงสุดในข้อ 3.2.6) จากนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ยังคงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยไม่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ในทุกครั้งที่ทดสอบไปใช้ในการคัดเลือกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรียเขตรากพืชต่อพืชด้วยวิธี seedling bioassay

3.5.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร

2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์

3) Cotton swab

4) กระดาษเพาะกล้า

5) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)

3.5.2 วิธีการทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีเมล็ดในการการทดสอบจำนวน 10 เมล็ด การทดสอบทำได้โดยนำแบคทีเรียที่มีค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Pythium* spp. อายุ 48 ชั่วโมงจากข้อ 3.4.4 แต่ละสายพันธุ์จำนวน 1 cotton swab ละลาย ลงในน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำเมล็ดของผักสลัด (*L. sativa* L.) ลงไปคลุกกับสารละลายแบคทีเรียทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นนำไปเพาะบนกระดาษเพาะกล้า ในขั้นตอนนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่แสดงผลกระทบทางลบกับพืชทดสอบ (detrimental strain) เช่น ทำให้เมล็ดเน่า เปอร์เซ็นต์การงอกลดลง ตลอดจนมีผลต่อความยาวราก จะถูกคัดออก และหลังจากเพาะกล้าเป็นเวลา 7 วัน ทำการประเมินค่าความแข็งแรงของต้นกล้าโดยใช้ค่าเฉลี่ยความยาวลำต้น ความยาวราก ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอก ไปคำนวนค่าเฉลี่ยดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า (vigor index) ตามวิธีของ Saravanakumar *et al.* (2007) ดังนี้

$$\text{Vigor index} = (\text{Mean root length} + \text{Mean shoot length}) \times (\%\text{Germination})$$

นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป ทำการเลือกแบคทีเรียที่ไม่แสดงผลกระทบกับพืช (neutral strain) หรือสายพันธุ์ที่มีผลทางบวกกับพืชทดสอบ (beneficial strain) เพื่อศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การทดสอบยืนยันความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกในเบื้องต้นแล้วจากข้อ 3.4 และ 3.5 ทั้งหมดมาทำทดสอบยืนยันซ้ำอีกครั้ง ด้วยวิธี bi-culture tests ตามข้อ 3.4 แต่ครั้งนี้จะใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เก็บไว้ภายในอาหาร LB ที่มีส่วนผสมของ glycerol 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ปี กับเชื้อ *Pythium* spp. ซึ่งแบคทีเรียที่ยังคงศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยจะถูกนำไปทำการทดสอบต่อไป

3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ (Lab scale hydroponics)

3.7.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์
3) Needle
4) ฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์นิ้ว
5) ผ้าขาวบาง
6) ถ้วยปลูกพืชขนาด 22 ออนซ์
7) Cotton swab
8) Cork borer No.2 (Mark, China)
9) Haemacytometer 0.1 มิลลิเมตรรุ่น Neabauer (Boeco, Germany)
10) เครื่องปั่นไฟฟ้า blender รุ่น TB 20 (Toyobishi, Taiwan)
11) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)
12) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 g รุ่น BJ 210C (Precisa, Switzerland)
13) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.0001 รุ่น HR 60 (AND, Japan)
14) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)
15) EC meter รุ่น ECScan high (Eutech, Singapore)
16) pH meter รุ่น pHTestr 30 (Eutech, Singapore)

3.7.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar: CMA (Himedia, India)
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) อาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 broth [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยน้ำผลไม้รวม 8 ชนิด (V8 vegetable juice) 200 มิลลิลิตร และปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ค่าประมาณ 6.8±0.2 (ดัดแปลงจาก Ronald. 1995)]

4) สารละลายธาตุอาหารพืช [จากการเตรียมสารละลายตั้งต้นปริมาตร 10 ลิตร; A: $CaNO_3$ 670 กรัม KNO_3 296 กรัม และ Fe-EDTA 50 กรัม B: KNO_3 296 กรัม KH_2PO_4 177 กรัม $MgSO_4$ 160 กรัม และ Microelements: Nick Spray® 30 กรัม (ดัดแปลงจาก Benoit. 1992)]

5) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)

6) Nitric acid (Merck, Germany)

3.7.3 การเตรียมแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช และเชื้อ *Pythium* spp. ในการทดสอบ

นำแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากข้อ 3.6 ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาขูดเอาเกล็ดน้ำแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่มา streak เป็นทางยาวลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ streak เชื้อซ้ำลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA อีกครั้งบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปทดสอบต่อไป

เชื้อ *Pythium* sp. จากข้อ 3.2.6 ที่เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณภูมิ 20 องศาเซลเซียสนำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ทำการย้ายเส้นใยเชื้อ ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร CMA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ย้ายเส้นใยเชื้ออีกครั้ง ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเจาะให้เป็นชิ้นวุ้นด้วย cock borror No.2 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ทำการย้ายลงบนอาหาร V8 broth ทำการเลี้ยงเชื้อบนอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน ทำการกรองเฉพาะเส้นใยเชื้อแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง blender ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 15 วินาที ทำการตรวจนับด้วย haemacytometer และปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 ส่วนของเส้นใย ต่อมิลลิลิตรนำสารละลายเชื้อ *Pythium* sp. ที่ได้ไปทำการทดสอบต่อไป

3.7.4 วิธีการทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 4 ซ้ำ การทดสอบโดยทำการเพาะเมล็ด *L. sativa* L. โดยทำการหยอดเมล็ดพืชทดสอบลงในฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำเมล็ดพืชที่อยู่ในฟองน้ำ ไปแช่ในสารละลายแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ปริมาณ 1 cotton swab ต่อน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน ทำการอนุบาลต้นกล้าภายในถ้วยปลูกพืชขนาด 22 oz โดยปรับสารละลายธาตุอาหารโดยปรับปรุงตามสูตรของ Benoit (1992) โดยปรับค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง EC meter ให้อ่านให้ได้ EC 0.8 mS/cm^2 และปรับค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นกรด-ด่างด้วย nitric acid ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าด้วยเครื่อง pH meter อ่านค่าระหว่าง pH 5.6-6 เติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลงในสารละลายอีก 1 cotton swab ต่อน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร อีก 7 วันทำการปรับสารละลายธาตุอาหารให้มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น EC 1.6 mS/cm^2 และเติมสารละลายแบคทีเรียลงไปอีกครั้งในปริมาณเท่าเดิม หลังจากนั้น 3 วันทำการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. ที่เตรียมไว้ตาม 3.7.3 ลงในสารละลาย บันทึกผลระดับค่าความรุนแรงของการเกิดโรคตามข้อ 3.2.5 ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน จนถึงวันเก็บเกี่ยว โดยในวันเก็บเกี่ยวทำการบันทึก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นพืช ในการทดสอบจะมีกลุ่มการทดลองควบคุมคือ กลุ่มการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ *Pythium* sp. กับ แบคทีเรียเขตรากพืช (healthy control) และ กลุ่มการทดลองที่ปลูกเชื้อ *Pythium* sp. เพียงอย่างเดียว (inoculation control)

นำระดับค่าความรุนแรงของการเกิดโรค มาหาค่าดัชนีการเกิดโรคตามข้อ 3.2.5 นำค่าดัชนีการเกิดโรคที่ได้ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นพืชที่บันทึก มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ และ/หรือ ให้ผลแตกต่างทางสถิติในทางบวกกับกลุ่มการทดลอง healthy control รวมไปถึงแบคทีเรียที่ให้ผลแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มการทดลอง inoculation control จะถูกนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ solution culture

3.8.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์
3) Needle
4) ฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์นิ้ว
5) ผ้าขาวบาง
6) ภาชนะปลูกพืชขนาด 18 ×45×15 ลูกบาศก์เซนติเมตร
7) Cork borer No.2 (Mark, China)
8) Spectrophotometer รุ่น ultraspec 1100 pro (Biochrom, England)
9) Haemacytometer 0.1 มิลลิเมตร รุ่น Neabauer (Boeco, Germany)
10) เครื่องปั่นไฟฟ้า Blender รุ่น TB 20 (Toyobishi, Taiwan)
11) ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น ATF 20303H (Clean, USA)
12) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 g รุ่น BJ 210C (Precisa, Switzerland)
13) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.0001 รุ่น HR 60 (AND, Japan)
14) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)
15) EC meter รุ่น ECScan high (Eutech, Singapore)
16) pH meter รุ่น pHTestr 30 (Eutech, Singapore)
17) เครื่องเขย่าควบอุณหภูมิ รุ่น VS 840SFN (Vision, Korea)
18) Vortex mixer รุ่น MS1 Mini shaker (IKS, Canada)

3.8.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar: CMA (Himedia, India)
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]
3) อาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 broth [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยน้ำผลไม้รวม 8 ชนิด (V8 vegetable juice) 200 มิลลิลิตร และปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ค่าประมาณ 6.8±0.2 (ดัดแปลงจาก Ronald. 1995)]
4) สารละลายธาตุอาหารพืช [จากการเตรียมสารละลายตั้งต้นปริมาตร 10 ลิตร; A: $CaNO_3$ 670 กรัม KNO_3 296 กรัม และ Fe-EDTA 50 กรัม B: KNO_3 296 กรัม KH_2PO_4 177 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$MgSO_4$ 160 กรัม และ Microelements: Nick Spray® 30 กรัม (ดัดแปลงจาก Benoit. 1992)]

5) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)

6) Nitric acid (Merck, Germany)

3.8.3 การเตรียมแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช และเชื้อ *Pythium* spp. ในการทดสอบ

นำแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากข้อ 3.7 ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซลียสมาขูดเอาเกล็ดน้ำแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่มา streak เป็นทางยาวลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการ streak เชื้อซ้ำลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA อีกครั้งบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่ปรากฏย้ายลงขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตรที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร อยู่ภายในจากนั้นนำเชื้อไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาเทใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร เหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสที่อยู่ด้านบนทิ้ง เติมแบคทีเรียและทำซ้ำ 2-3 ครั้ง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรแล้วนำมาเขย่าให้ผสมกับเซลล์ของแบคทีเรียที่ตกตะกอนด้วย vortex mixer นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้งหนึ่ง นำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับค่าโดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในการวัดค่าจะปรับความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ $1.0\text{-}1.5\times10^8$ cfu ต่อ มิลลิลิตร

เชื้อ *Pythium* sp. ได้จากข้อ 3.2.6 ที่เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ทำการย้ายเส้นใยเชื้อ ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร CMA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการย้ายเส้นใยเชื้ออีกครั้ง ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเจาะให้เป็นชิ้นวุ้น (agar plug) ด้วย cock borer No.2 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ทำการย้ายลงบนอาหาร V8 broth ทำการเลี้ยงเชื้อบนอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน ทำการกรองเฉพาะเส้นใยเชื้อแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง blender ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 15 วินาที ทำการตรวจนับด้วย haemacytometer และปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^6 ส่วนของเส้นใยต่อมิลลิลิตรนำสารละลายเชื้อ *Pythium* sp. ที่ได้ไปทำการทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.4 วิธีการทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 5 ซ้ำ โดยทำการทดสอบกับพืช *L. sativa* cv. Butter head การทดสอบจะทำการเพาะเมล็ด *L. sativa* โดยทำการ

หยอดเมล็ดพืชทดสอบลงในฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำเมล็ดพืชที่อยู่ในฟองน้ำไปแช่ในสารละลายแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.3 เป็นเวลา 7 วัน ทำการอนุบาลต้นกล้าภายในภาชนะปลูกพืชขนาด 18 ×45×15 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายธาตุอาหารที่ปรับปรุงตามสูตรของ Benoit (1992) ปรับค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง EC meter ให้อ่านให้ได้ EC 0.8 mS/cm^2 และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย nitric acid ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าด้วยเครื่อง pH meter อ่านค่าระหว่าง pH 5.6-6 ใส่แบคทีเรียลงในสารละลายตามข้อ 3.8.3 อีกครั้ง อีก 7 วัน ทำการปรับสารละลายธาตุอาหารให้มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น EC 1.6 mS/cm^2 และเติมสารละลายแบคทีเรียลงไปอีกครั้งในปริมาณเท่าเดิม ให้พืชเจริญในระบบการปลูกพืชเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น 3 วัน ทำการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. ที่เตรียมไว้ตาม 3.8.3 ลงในสารละลาย ทำการบันทึกผลความรุนแรงของการเกิดโรค และหลังจากปลูกเชื้อ *Pythium* sp. เป็นเวลา 5 วัน ทำการบันทึกผลน้ำหนักสด-แห้งของรากและลำต้น ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบพืช และ ความยาวราก ของพืชทดสอบ นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติจากการทดลองพบว่าเมื่อบันทึกค่าระดับความรุนแรงในการเกิดโรคทางรากตามข้อ 3.2.5 ตั้งแต่ 1 ถึง 5 วัน หลังทำการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. และนำมาหาค่าดัชนีการเกิดโรคตามข้อ 3.2.5 และเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่าตาม Idris *et al.* (2008) ดังนี้

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

A = ค่าดัชนีการเกิดโรคในกลุ่มการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. เพียงอย่างเดียว

B = ค่าดัชนีการเกิดโรคในกลุ่มการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. และแบคทีเรียเขตรากพืช

นำค่าดัชนีการเกิดโรค เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่า ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสด-แห้งของรากและลำต้น ที่ทำการบันทึกไว้ข้างต้นมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test (DMRT) แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ หรือ ให้ค่าพารามิเตอร์สูงกว่า healthy control และทั้งนี้จะต้องให้ผลแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มการทดลอง inoculation control ด้วยจำนวน 10 อันดับแรกจะถูกนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ Nutrient Film Technique

3.9.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์
3) Needle
4) ฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์นิ้ว
5) ผ้าขาวบาง
6) ภาชนะปลูกพืชขนาด 18 ×45×15 ลูกบาศก์เซนติเมตร
7) ระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ NFT จำนวน 22 ราง พร้อมอุปกรณ์
8) Cork borer No.3 (Mark, China)
9) Spectrophotometer รุ่น ultraspec 1100 pro (Biochrom, England)
10) Haemacytometer 0.1 มิลลิเมตร รุ่น Neabauer (Boeco, Germany)
11) เครื่องปั่นไฟฟ้า blender รุ่น TB 20 (Toyobishi, Taiwan)
12) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)
13) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 g รุ่น BJ 210C (Precisa, Switzerland)
14) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.0001 รุ่น HR 60 (AND, Japan)
15) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)
16) EC meter รุ่น ECScan high (Eutech, Singapore)
17) pH meter รุ่น pHTestr 30 (Eutech, Singapore)
18) เครื่องเขย่าควบอุณหภูมิ รุ่น VS 840SFN (Vision, Korea)

3.8.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar: CMA (Himedia, India)
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]
3) อาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 broth [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยน้ำผลไม้รวม 8 ชนิด (V8 vegetable juice) 200 มิลลิลิตร และปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ค่าประมาณ 6.8±0.2 (ดัดแปลงจาก Ronald. 1995)]
4) สารละลายธาตุอาหารพืช [จากการเตรียมสารละลายตั้งต้นปริมาตร 10 ลิตร; A: $CaNO_3$ 670 กรัม KNO_3 296 กรัม และ Fe-EDTA 50 กรัม B: KNO_3 296 กรัม KH_2PO_4 177

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัม $MgSO_4$ 160 กรัม และ Microelements: Nick Spray® 30 กรัม (ดัดแปลงจาก Benoit. 1992)]

5) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)

6) Nitric acid (Merck, Germany)

7) McFarland standard

3.9.3 การเตรียมแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช และเชื้อ *Pythium* spp. ในการทดสอบ

นำแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากข้อ 3.8 ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาขูดเอาเกล็ดน้ำแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่มา streak เป็นทางยาวลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการstreakเชื้อซ้ำลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA อีกครั้งบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่ปรากฏย้ายลงขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร อยู่ภายในนำเชื้อไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสที่อยู่ด้านบนทิ้ง เติมแบคทีเรียและเหวี่ยงตกตะกอนอีก 2-3 ครั้ง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมกับเซลล์ของแบคทีเรียที่ตกตะกอนด้วย vortex mixer นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อีกครั้งหนึ่ง ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปเทียบความเข้มข้นเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 0.5 McFarland standard และนำเชื้อที่ได้ไปใช้ต่อไป

เชื้อ *Pythium* sp. ได้จากข้อ 3.2.6 ที่เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณภูมิ 20 องศาเซลเซียสนำออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ทำการย้ายเส้นใยเชื้อ ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร CMA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ย้ายเส้นใยเชื้ออีกครั้ง ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเจาะให้เป็น mycelia disc ด้วย cork borer No.2 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ทำการย้ายลงบนอาหาร V8 broth ทำการเลี้ยงเชื้อบนอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน ทำการกรองเฉพาะเส้นใยเชื้อแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง blender ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 15 วินาที ทำการตรวจนับด้วย haemacytometer และปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกรองฆ่าเชื้อได้ได้ความเข้มข้น 10^6 ส่วนของเส้นใยต่อมิลลิลิตรนำสารละลายเชื้อ *Pythium* sp. ที่ได้ไปทำการทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.4 วิธีการทดสอบ

ทำการเพาะเมล็ด *L. sativa* L. cv. Red coral และ *L. sativa* L. cv. Butter head โดยทำการหยอดเมล็ดพืชทดสอบลงในฟองน้ำขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำเมล็ดพืชที่อยู่ในฟองน้ำไปแช่ในสารละลายแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.9.3 เป็นเวลา 7 วัน ทำการอนุบาลต้นกล้าภายในภาชนะปลูกพืชขนาด 18×45×15 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยปรับสารละลายธาตุอาหารโดยปรับปรุงตามสูตรของ Benoit (1992) โดยปรับค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง EC meter ให้อ่านให้ได้ EC 0.8 mS/cm^2 และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย nitric acid ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าด้วยเครื่อง pH meter อ่านค่าระหว่าง pH 5.6-6 เติมแบคทีเรียลงในสารละลายตามข้อ 3.9.3 อีกครั้งหลังจากนั้น 7 วัน ทำการย้ายต้นกล้าที่อนุบาลไว้ลงระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ Nutrient Film Technique โดยปรับค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ EC 1.8 mS/cm^2 และ pH 5.6-6 จุ่มรากพืชขณะย้ายด้วยสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 3.9.3 ให้พืชเจริญในระบบดังกล่าวเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นอีก 3 วัน ทำการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. ที่เตรียมไว้ตาม 3.9.3 ลงในสารละลาย บันทึกค่าระดับความรุนแรงในการเกิดโรคทางรากตามข้อ 3.2.5 ตั้งแต่ 1 ถึง 5 วันหลังทำการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. และนำมาหาค่าดัชนีการเกิดโรคตามข้อ 3.2.5 และเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่าตามข้อ 3.8.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 การศึกษากลไกในการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพด้วยวิธี agar disk diffusion

3.10.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์
3) Needle และLoop
4) ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น ATF 20303H (Clean, USA)
5) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)
6) Cork borer No.3 (Mark, China)
7) Centrifuge รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany)
8) หม้อนึ่งความดัน (auto clave) รุ่น ES315 (TOMY, Japan)

3.10.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)
3) McFarland standard
4) Methy-N-(2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate: Metalaxyl® (Euro Phoenix co., LTR, Thailand)

3.10.3 การเตรียมแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช และเชื้อ *Pythium* spp. ในการทดสอบ

นำแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากข้อ 3.9 ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาขูดเอาเกล็ดน้ำแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่มา streak เป็นทางยาวลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการไป streak เชื้อซ้ำลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA อีกครั้งบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำ

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชแต่ละสายพันธุ์ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรอยู่ภายใน นำเชื้อไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่อยู่ด้านบนทิ้ง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตรผสมกับเซลล์ของแบคทีเรียที่ตกกอนกอนด้วยเครื่อง vortex mixer นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้งหนึ่งทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปเทียบความเข้มข้นเชื้อกับ 0.5 McFarland standard นำไปทดสอบต่อไป

เชื้อ *Pythium* sp. จากข้อ 3.2.6 ที่เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณภูมิ 20 องศาเซลเซียสนำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ทำการย้ายเส้นใยเชื้อ ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร CMA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ย้ายเส้นใยเชื้ออีกครั้ง ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเจาะให้เป็นชิ้นวุ้น (agar plug) ด้วย cock borror No.2 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ได้ไปทำการทดสอบต่อไป

3.10.4 วิธีการทดลอง

นำเชื้อที่ได้ในแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรทำการย้ายลงขวดลูกชมพู่ใหม่ที่มีอาหาร NB และ PDA ปริมาตร 50 มิลลิลิตรนำเชื้อไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้ไปทดสอบต่อไป โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) ในแต่ละกลุ่มการทดลองทำ 5 ซ้ำ แบ่งออกเป็น 6 กรรมวิธีดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (control)

กรรมวิธีที่ 2 purified cell ได้แก่แบคทีเรียที่มีศักยภาพนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาตกตะกอนเซลล์ เทส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบนออกนำเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่มาล้างซ้ำด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 3 purified sterile cell ได้แก่ purified cell จากกรรมวิธีที่ 2 ไปทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง auto clave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที

กรรมวิธีที่ 4 สารเคมีกำจัดเชื้อ *Pythium* sp. ได้แก่ metalaxyl

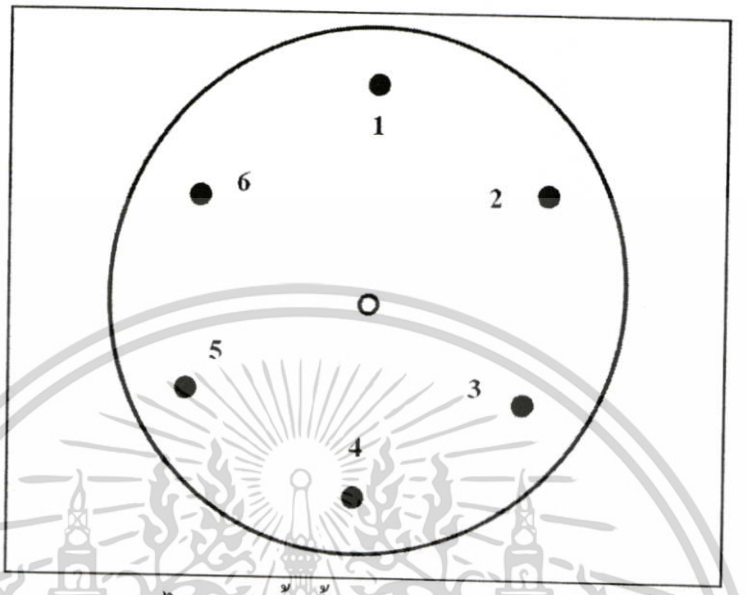
กรรมวิธีที่ 5 cell–free culture filtrate ได้แก่ แบคทีเรียที่มีศักยภาพนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย แยกเก็บส่วนของเหลว (supernatant) มากรองเซลล์แบคทีเรียอีกครั้งด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน

กรรมวิธีที่ 6 cell culture ได้แก่สารแขวนลอยแบคทีเรีย

โดยการทดสอบจะเทอาหารทดสอบปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้แห้งจากนั้นตัดชิ้นวุ้นออกจากจานเป็นวงกลม จำนวน 6 จุด ซึ่งแต่ละจุดจะหยอดสารละลายจากกลุ่มการทดลองต่างๆ จาก 6 กรรมวิธีปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วนำชิ้นวุ้น (agar plug) ของเชื้อ *Pythium* sp. วางตรงจุดกึ่งกลางให้ห่างจากแต่ละจุดเท่าๆกัน (ภาพที่ 3.4) สังเกตผลการยับยั้งจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มการทดลองต่างๆ จากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 48 96 และ 192 ชั่วโมง มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test (DMRT)



ภาพที่ 3.4 แผนภาพการทดสอบกลไกการยับยั้งเชื้อราโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพด้วยวิธี agar disk diffusion โดยตำแหน่งที่ 1 = control, 2 = purified cell, 3 = purified sterile cell, 4 = สารเคมี metalaxyl, 5 = cell–free culture filtrate, 6 = cell culture และ O = agar plug

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 การศึกษากลไกในการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์

3.11.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์
3) Needle และLoop
4) แผ่นกระจกสไลด์
5) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)
6) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)
7) Cork borer No.3 (Mark, China)
8) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด compound microscope รุ่น Eclipse E 200 (Nikon, Japan)

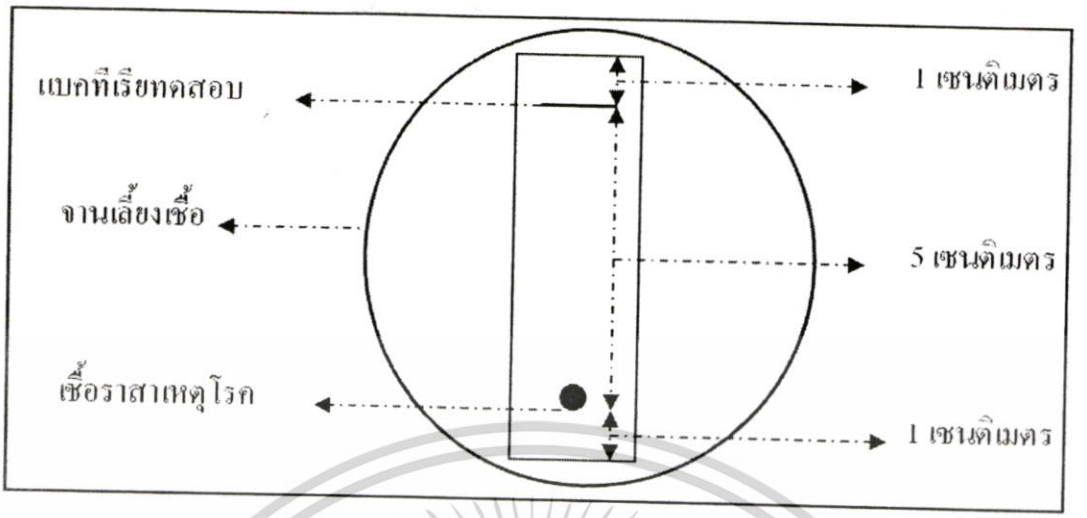
3.11.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)

3.11.3 วิธีการทดสอบ

ใช้ loop ที่เผาฆ่าเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ไป streak เป็นเส้นตรงยาว 1.5 เซนติเมตร บนแผ่น slide ที่เทด้วยอาหาร PDA หนาประมาณ 0.2 มิลลิเมตรโดย streak ห่างจากขอบแผ่น slide ประมาณ 1.5 เซนติเมตร และวางชิ้นวุ้น (agar plug) ของเชื้อ *Pythium* sp. เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่อีกขอบด้านหนึ่งของแผ่น slide ห่างจากขอบประมาณ 1.5 เซนติเมตร ระหว่างเชื้อราและแบคทีเรียห่างกัน 4.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.5) บ่มเชื้อไว้ภายในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อเก็บไว้อุณหภูมิห้อง แต่ละสายพันธุ์ทำ 5 ซ้ำ บันทึกผลโดยการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของเชื้อ *Pythium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด compound microscope หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่ 12 ชั่วโมง โดยการทดลองมีการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ที่เลี้ยงเชื้อ *Pythium* sp. อย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.5 แผนภาพการทดสอบกลไกของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ด้วยวิธี dual culture technique on slide

3.12 การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในระบบปลูก

การทดสอบความสามาถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจะทำการทดสอบตามข้อ 3.9 แต่จะไม่ทำการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. ลงพืชทดสอบ และการบันทึกผลจะทำการบันทึกผลน้ำหนักสด-แห้งของรากและลำต้น ความกว้างทรงพุ่ม และจำนวนใบพืชทดสอบนำที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ย แล้วเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของผลผลิตกับพืชที่ไม่ได้ใส่แบคทีเรียลงไป โดยผลผลิตที่ได้จากพืชที่ไม่ได้ใส่แบคทีเรียลงไปให้คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์จึงทำให้ผลได้การเปรียบเทียบดังนี้

ผลผลิตที่ได้จากพืชที่ไม่ได้ใส่แบคทีเรียลงไปเท่ากับ x คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากพืชที่ใส่แบคทีเรียลงไปเท่ากับ y จึงมีค่าเท่ากับ $\frac{y \times 100}{x}$ เปอร์เซ็นต์

จากนั้นเมื่อพืชที่ไม่ได้ใส่แบคทีเรียลงไปให้คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อนำมาลบกับค่าที่คิดได้ก็จะได้ค่าของการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของผลผลิตจากการใส่แบคทีเรียเขตรากพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.13 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งโรคด้วยวิธี split root technique

3.13.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร

2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์

3) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)

4) กล่องสี่เหลี่ยมมีแผ่นกลั้นกลาง

5) Cock borror No.2 (Mark, China)

3.13.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar: CMA (Himedia, India)

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar: PDA [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และ วุ้น 17 กรัม (Ronald. 1995)]

3) อาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 broth [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยน้ำผลไม้รวม 8 ชนิด (V8 vegetable juice) 200 มิลลิลิตร และปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ค่าประมาณ 6.8±0.2 (ดัดแปลงจาก Ronald. 1995)]

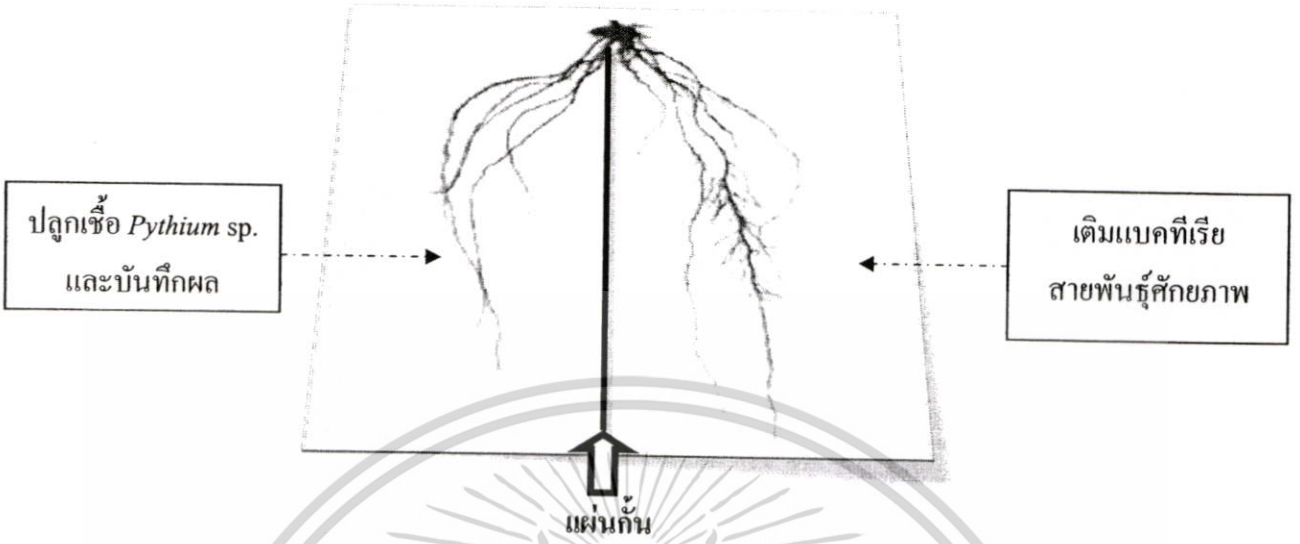
4) สารละลายธาตุอาหารพืช [จากการเตรียมสารละลายตั้งต้นปริมาตร 10 ลิตร; A: $CaNO_3$ 670 กรัม KNO_3 296 กรัม และ Fe-EDTA 50 กรัม B: KNO_3 296 กรัม KH_2PO_4 177 กรัม $MgSO_4$ 160 กรัม และ Microelements: Nick Spray® 30 กรัม (ดัดแปลงจาก Benoit. 1992)]

5) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)

3.13.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) จำนวน 5 ซ้ำ พืชทดสอบ *L. sativa* cv. Butter head ทำการทดสอบด้วยวิธี split-root technique โดยประยุกต์ตามกรรมวิธีของ Wang *et al.* (2002) โดยทำการเพาะกล้าพืชทดสอบ พืชอายุ 21 วัน ทำการย้ายปลูกและแยกรากออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่ง จะทำการใส่เชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่จะนำมาทดสอบตามข้อ 3.9.3 และส่วนที่สอง จะทำการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าตามข้อ 3.9.3 และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นกลุ่มการทดลองควบคุมบันทึกค่าความรุนแรงตามข้อ 3.2.5 ในรากส่วนที่ 2 (ภาพที่ 3.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.6 แผนภาพการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งโรครากเน่าด้วยเทคนิค split-root technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.14 การศึกษาลักษณะโคโลนี และคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพบนอาหารทดสอบ

3.14.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) Loop
3) ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น ATF 20303H (Clean, USA)
4) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด stereoscopic microscope รุ่น SMZ 645 (Nikon, Japan)

3.14.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar: NGA (อาหาร NA ที่มี Glucose 0.25 เปอร์เซ็นต์) (ประยุกต์ใช้จากอาหาร NA ของ Criterion™ dehydrated culture media, USA)
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (=soybean casein digest agar): TSA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)
3) อาหารเลี้ยงเชื้อ luria bertani broth (Biomark, India)
4) อาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วย blood agar base (Difco, USA) 40 กรัม และ defibrinated sheep blood 50 มิลลิลิตร]
5) อาหารเลี้ยงเชื้อ Mac conkey (Difco, USA)
6) หลอดอาหารเอียงเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas agar F (Difco, USA)
7) หลอดอาหารเอียงเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas agar P (Difco, USA)

3.14.3 การทดสอบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนเชื้อเจริญบนผิวหน้าอาหารเป็นลักษณะโคโลนีเดี่ยว จากนั้นทำการ cross streak ลงบนอาหาร NGA, sheep blood agar และ mac Conkey บันทึกข้อมูลลักษณะโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดอีกครั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereoscopic microscope ยกเว้นการเจริญบนอาหาร sheep blood agar และ mac Conkey บันทึกการเปลี่ยนแปลงของโคโลนีบนอาหาร นำแบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหาร mac Conkey ไปลากเป็นทางยาวลงบนอาหาร Pseudomonas agar F และ Pseudomonas agar P จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารโดย Pseudomonas agar F ให้สังเกตภายใต้แสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.15 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางสัณฐาน

3.15.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร
2) ชุดตะเกียงแอลกอฮอล์
3) Loop
4) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด Stereoscopic microscope รุ่น SMZ 645 (Nikon, Japan)
5) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด Compound microscope รุ่น Eclipse E 200 (Nikon, Japan)
6) ตู้ควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)
7) Anaerobic jar รุ่น Anaerocult® (Becton, Dickinson and Company, USA)

3.15.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วย blood agar base (Difco, USA) 40 กรัม และ defibrinated sheep blood 50 มิลลิลิตร]
3) Crystal violet (ละลาย crystal violet 2 เปอร์เซ็นต์ และammoniumoxalate 1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ)
4) Safranin O (ละลาย Safranin O 0.25 เปอร์เซ็นต์ใน ethanol 95 เปอร์เซ็นต์)
5) Iodine solution
6) Ethanol
7) Flagella stain
8) Aqueous malachite green
9) Chemical packet (BD BLL™ Gaspak™) (Becton, Dickinson and Company, USA)

3.15.3 การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแบคทีเรียแบบ Gram's staining

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่เจริญบนอาหาร NGA ที่เลี้ยงไว้นาน 18-24 ชั่วโมง มาเกลี่ยบนสไลด์บาง ๆ รอให้แห้ง แล้วนำไป fixed ด้วยการผ่านสไลด์บนเปลวไฟเร็วๆ 2-3 ครั้ง จากนั้น หยดสารละลาย crystal violet ลงบนเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำไหล จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีน ให้ท่วมบริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทและล้างสารละลายไอโอดีนออกด้วยน้ำ จากนั้นจึงหยด ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ลงไปอย่างรวดเร็ว (ไม่เกิน 15-25 วินาที) อาจใช้วิธีเอียงสไลด์ช่วย แล้วล้างแอลกอฮอล์ออกด้วยน้ำ เพื่อหยุดปฏิกิริยาชะล้างสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยด Safranin O ลงไปให้ท่วม ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ รอจนแห้งจากนั้นทำการบันทึกรูปร่าง ภายใต้กล้องแบบใช้แสงชนิด compound microscope (Brown. 2005)

3.15.4 การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแบบ flagella stain

ทำความสะอาดกระจกสไลด์ให้สะอาดโดยจุ่มแผ่นกระจกสไลด์ลงในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์แล้วเผาด้วยไฟจากนั้นใช้ปากกาชนิดกันน้ำลากเป็นวงรีประมาณ 3 ส่วน 4 ของแผ่นสไลด์จากนั้นหยดน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้กระจายทั่วภายในวงรี นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่เจริญบนอาหาร NGA ที่เลี้ยงไว้นาน 12 ชั่วโมงมาเตะลงเบาๆ ทั้งสี่มุมของวงรี จากนั้นทิ้งไว้ให้น้ำบนแผ่นกระจกระเหยออกไปหมด จากนั้นทำการหยด flagella stain ให้ทั่ว แช่นาน 10 นาที ล้างสีที่เกินออกด้วยน้ำ ทำการย้อมสีด้วย crystal violet ล้างสีที่เกินออกด้วยน้ำ จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องแบบใช้แสงชนิด compound microscope (ประยุกต์ตามกรรมวิธีของ Brown. 2005)

3.15.5 การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแบบ malachite green

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่เจริญบนอาหาร NGA ที่เลี้ยงไว้นาน 48-56 ชั่วโมง มาเกลี่ย บนสไลด์บาง ๆ รอให้แห้ง แล้วนำไป fixed ด้วยการผ่านสไลด์บนเปลวไฟเร็วๆ 2-3 ครั้ง หยด 5% aqueous malachite green และใช้ตะเกียงให้เปลวไฟอ่อนๆ ลนใต้สไลด์ จนมีไอความร้อนระเหยขึ้น โดยไม่ให้เดือด นาน 1 นาที ล้างโดยการให้น้ำผ่านเบา ๆ ย้อมทับด้วย safranin O นาน 15 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำ นำไปส่องภายใต้กล้องแบบใช้แสงชนิด compound microscope (Barrow and Feltham. 2004)

3.15.6 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพโดยศึกษาการเจริญในสภาพ anaerobes

นำแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ในอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล 25 เปอร์เซ็นต์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาทำการ simple streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA อยู่นำเชื้อไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการ cross streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี อาหาร sheep blood agar จากนั้นนำไปใส่ใน anaerobic jar ที่ภายในบรรจุ Chemical packet (BD BLL™ Gaspak™) ปิดฝาให้แน่น นำเชื้อไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงบันทึกการเจริญที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.15.7 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพโดยการเจริญภายใต้อุณหภูมิ 4 และ 42 องศาเซลเซียส

นำแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ในอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล 25 เปอร์เซ็นต์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาทำการ simple streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA อยู่นำเชื้อไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการ cross streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี อาหาร sheep blood agar นำเชื้อไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 4 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงบันทึกการเจริญที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.16 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยา

3.16.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) ห้องควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2) หลอดทดลองขนาดเล็ก
3) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
4) Platinum loops
5) Aluminium loops

3.16.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar: NA (Criterion™ dehydrated culture media, USA)
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar [จากการเตรียมใน 1 ลิตรประกอบด้วยblood agar base (Difco, USA) 40 กรัม และ defibrinated sheep blood 50 มิลลิลิตร]
3) อาหารทดสอบ triple sugar iron agar (Difco, USA)
4) อาหารทดสอบ tryptone yeast extracts broth (Difco, USA)
5) อาหารทดสอบ Simon's citrate agar (Difco, USA)
6) อาหารทดสอบ Christensen's urea agar (Difco, USA)
7) อาหารทดสอบ starch agar (Difco, USA)
8) อาหารทดสอบ nitrate semi-solid medium (Difco, USA)
9) อาหารทดสอบ esculin broth (Difco, USA)
10) อาหารทดสอบ acetate agar (Difco, USA)
11) อาหารทดสอบ egg yolk agar (Difco, USA)
12) อาหารทดสอบ OF basal medium (Difco, USA)
13) อาหารทดสอบ ammonium salt sugar base medium (Difco, USA)
14) Decarboxylase Base (Moeller) medium (Difco, USA)
15) Tetra methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride
16) Hydrogen peroxide
17) Kovac's reagent
18) Iodine Solution
19) Sulfanilic acid
20) Dimethyl alpha napthylamine
21) Zinc powder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.16.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ในอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล 25 เปอร์เซ็นต์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาทำการ simple streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA อยู่นำเชื้อไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการ cross streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Sheep blood agar นำเชื้อไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบต่อไป

3.16.4 การทดสอบ Triple sugar iron

นำแบคทีเรียที่เตรียมไว้จากข้อ 3.16.3 มาstreakบนหน้าวุ้นของอาหาร TSI agar ให้ทั่ว จากนั้นให้แทงปลาย needleในตอนแรกลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของในอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้อนหลอด นำเชื้อไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงทำการบันทึกผลที่ได้โดยถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวบนผิววุ้น (slant) จะมีสีแดงส้มซึ่งเป็นสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนก้นหลอด (butt) ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) ให้อ่านผล K/A ส่วนแบคทีเรียใช้น้ำตาล glucose ร่วมกับ lactose และหรือ sucrose ทั้ง slant และ Butt จะเปลี่ยนจากสีส้มไปเป็นสีเหลือง ให้อ่านผล A/A ถ้าแบคทีเรียไม่ใช้น้ำตาล อาจมีปฏิกิริยาหลายชนิดคือส่วน slant อาจไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดเลย (N) หรือเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม (K) และ butt ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (N) หรือเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม นั่นคือปฏิกิริยาของ TSI ให้อ่านผลเป็น K/N , K/K หรือ N/N ก็ได้

การเกิดก๊าซในอาหารโดยอาจมีมากหรือน้อยก็ได้ ก๊าซอาจดันให้อาหารในหลอดลอยสูงขึ้นมากจากก้นหลอด หรือเพียงทำให้อาหารมีรอยแตกก็ได้ (หากไม่แน่ใจควรตรวจสอบซ้ำโดยใช้ glucose broth ที่มี Durham tube) ให้อ่านผล gas ถ้าเกิด hydrogen sulfide (H_2S) โดยจะเกิดสีดำขึ้นใน TSI ให้อ่านผล H_2S

3.16.5 การทดสอบ Oxidase test

ใช้ platinum loops ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 มาทาลากบนกระดาษกรองที่อิ่มด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ของ tetra methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride สังเกตการเปลี่ยนสีของกระดาษกรองทันที โดยถ้าเชื้อผลิตเอนไซม์ oxidase จะเกิดสีม่วงบนกระดาษกรอง ภายใน 10 วินาที ถ้าสร้างเอนไซม์นี้น้อยการเกิดสีจะช้า (เกิดภายใน 1 นาที) ถ้าไม่มีสีเกิดขึ้นภายใน 1 นาที ถือว่าไม่มีการสร้างเอนไซม์

3.16.6 การทดสอบ Catalase production

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาทำการ streak บนอาหารเอียงเชื้อ NGA ทำหลอดเปรียบเทียบ 1 หลอด นำเชื้อไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48

ชั่วโมงจากนั้นนำหลอดเลี้ยงเชื้อมาเติมด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ของ hydrogen peroxide ให้ท่วมอาหาร สังเกตการสร้างฟองอากาศถ้าเชื้อผลิตเอนไซม์ catalase จะเกิดฟองอากาศขึ้นมาที่ผิวทันที เนื่องจากเอนไซม์ catalase จะย่อยสลาย hydrogen peroxide ไปเป็นก๊าซออกซิเจนและน้ำ

3.16.7 การทดสอบ Indole production

นำแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop ใส่ลงในอาหารเชื้อ Tryptone yeast extract broth ทำหลอดเปรียบเทียบ 1 หลอด นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นนำมาเติมสาร Kovac's reagent (ประมาณ 1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร) สังเกตการเกิดสีในอาหารถ้าแบคทีเรียสร้าง indole จะทำปฏิกิริยากับ aldehyde ที่อยู่ในสารทดสอบให้ผลเป็นสีแดงในชั้นของ butanol และหายไปใน 15 นาที

3.16.8 การทดสอบ Citrate utilization

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาทำการ streak บนอาหารเอียงเชื้อ Simon's citrate agar ทำหลอดเปรียบเทียบ 1 หลอด นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าเชื้อสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน จะเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากหลังปฏิกิริยาการใช้ citrate จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะไปรวมกับโซเดียมและน้ำ เกิดสารประกอบที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ทำให้อาหารมี pH สูงขึ้น จึงทำให้สีของ indicator ในอาหารเปลี่ยนไป

3.16.9 การทดสอบ Urease test

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาทำการ streak บนอาหารเอียงเชื้อ Christensen's urea agar ทำหลอดเปรียบเทียบ 1 หลอด นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าเชื้อผลิตเอนไซม์ urease จะเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองเป็นสีม่วงแดงหรือสีบานเย็น โดยที่เอนไซม์ urease จะเปลี่ยน urea เป็น ammonia ซึ่งทำให้อาหารกลายเป็นด่าง และไปเปลี่ยนสีของ indicator (phenol red)

3.16.10 การทดสอบ Starch hydrolysis

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 มาทำการ streak เป็นเส้นตรงยาวประมาณ 1 เซนติเมตรบนอาหาร starch agar นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจากนั้นนำ gram's iodine solution เทให้ท่วมอาหาร สังเกตดูการเกิดสี ถ้าเกิดบริเวณใส (clear zone) บริเวณรอบเชื้อและบริเวณอื่นสีดำ แสดงว่าเชื้อใช้แป้งได้ ถ้าไม่มีบริเวณใสแสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้แป้งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.16.11 การทดสอบ Nitrite production

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาทำการ stap ในอาหาร Nitrate semi-solid medium เอามือหมุนหลอดให้เชื้อผสมกับอาหารโดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เมื่ออาหารแข็งให้นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นจึงนำมาเติมสารทดสอบ sulfanilic acid / dimethyl alpha napthylamine / zinc powder ตามลำดับ (สารอย่างละ 1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร) เขย่าสารให้เข้ากับอาหารเป็นเนื้อเดียวกัน สังเกตดูการเกิดสีในอาหารถ้าเกิดสีแดงอิฐแสดงว่ามีการรีดิวซ์ไนเตรด (NO_3) ให้เป็นไนไตรต์

3.16.12 การทดสอบ Esculin test

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 มาทำการ streak เป็นเส้นตรงยาวประมาณ 1 เซนติเมตรบนอาหาร esculin broth นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นสังเกตดูสีในอาหาร ถ้ามีการย่อยสลาย esculin เป็น esculetin จะเกิดตะกอนสีดำภายในหลอด

3.16.13 การทดสอบ Acetate utilization

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 มาทำการ streak เป็นเส้นตรงยาวประมาณ 1 เซนติเมตรบนอาหาร acetate agar นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นสังเกตดูสีในอาหาร ถ้ามีการใช้ acetate จะเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินเนื่องจาก pH สูงขึ้น

3.16.14 การทดสอบ Gelatin hydrolysis

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาทำการ stap inoculate ในอาหาร NGA ใน gelatin 12 เปอร์เซ็นต์ ทำหลอดเปรียบเทียบ 1 หลอด นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้น แล้วนำหลอดเลี้ยงเชื้อมาตรวจผลโดยนำมาแช่ในน้ำแข็ง หรือแช่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตการย่อย gelatin ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถย่อย gelatin ได้นั้น จะทำให้ gelatin ไม่แข็งตัวเมื่อนำไปแช่เย็น แสดงว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ gelatinse

3.16.15 การทดสอบความสามารถในการผลิต Lecithinase

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาทำการวนลงบน Egg yolk agar ให้เป็นวงกลมจากนั้นนำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นแล้วสังเกตผล ถ้าแบคทีเรียสามารถผลิต lecithinase จะมีบริเวณขาวขุ่นรอบๆ โคโลนี และถ้าแบคทีเรียสามารถผลิต lipase ผิวของโคโลนีจะวาวคล้ายไข่มุก และใต้โคโลนีจะมีตะกอนขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.16.16 การทดสอบการใช้ Carbohydrates

สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ ทำการทดสอบโดยนำนำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาทำการ stap ในอาหาร OF basal medium ที่มีส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดคือ glucose, sucrose, lactose, mannitol, maltose, D-xylose, adonitol และ fructose ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงสี ถ้าแบคทีเรียสามารถ fermentative และ oxidative metabolism ของ carbohydrate ได้ จะเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวให้เป็นสีเหลือง แต่ถ้าไม่สามารถ fermentative และ oxidative metabolism ของ carbohydrate ได้ สีอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวให้เป็นสีน้ำเงิน

สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก ทำการทดสอบโดยนำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาทำการ stap ในอาหาร ammonium salt sugar base medium ที่มีส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดคือ glucose, mannitol, D-xylose, L-arabinose, trehalose, fructose และ propionate ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงจากนั้นแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีถ้าแบคทีเรียสามารถย่อย carbohydrate แต่ละชนิด ได้จะเปลี่ยนสีอาหารจากสีม่วงให้เป็นสีเหลือง แต่ถ้าไม่สามารถย่อย carbohydrate แต่ละชนิดได้อาหารสีเหลืองจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง

3.16.17 การทดสอบ Dihydrolyse arginine, Decarboxylate lysine และ Ornithine

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.16.3 จำนวน 1 loop มาใส่ลงใน Decarboxylase Base (Moeller) medium ของ กรดอะมิโนแต่ละชนิดคือ arginine, lysine และ ornithine ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำแบคทีเรียไปเลี้ยงให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงสี ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาล dextrose ที่ผสมอยู่ใน Decarboxylase Base (Moeller) medium จะสร้างกรดขึ้น และเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง ในสภาวะเป็นกรดจะกระตุ้นการทำงานของ enzyme decarboxylase ให้ amino acid ย่อยสลายเป็น amine (arginine ถูก hydrolyse เป็น ornithine จากนั้นจะถูก decarboxylation เป็น putrescine, lysine ถูก decarboxylation เป็น cadaverine และ ornithine ถูก decarboxylation เป็น Putrescine) ซึ่งผลจากการสร้าง amine จะทำให้ pH สูงขึ้นทำให้เปลี่ยน indicator จากสีเหลืองในข้างต้นเป็นสีม่วง หรือม่วงแดง

นำข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการทดสอบ ในข้อ 3.14 -3.16 มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นชนิดเดียวกับเชื้อดังกล่าว และมีการบรรยายลักษณะต่างๆ ไว้ในหนังสือ เพื่อใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียในขั้นต้นต่อไปดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารก่อนเท่านั้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner *et al.* 2005)
- Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (Barrow and Feltham. 2004)
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition (Holt *et al.* 1994)
- A Colour Atlas of Bacillus species (Parry *et al.* 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.17 การจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ด้วยวิธี 16s rRNA

3.17.1 เครื่องมือ และ อุปกรณ์

1) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.0001 g รุ่น HR 60 (AND, Japan)
2) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 g รุ่น BJ 210C (Precisa, Switzerland)
2) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, Germany)
3) ตู้ควบควบคุมอุณหภูมิรุ่น MRI 253 (Sanyo, Japan)
4) ตู้ควบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น MIR 553 (Sanyo, Japan)
5) ตู้ควบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น VX380 E (Jouan, France)
6) เครื่องเขย่าควบอุณหภูมิรุ่น VS 840SFN (Vision, Korea)
7) เครื่อง gel electrophoresisรุ่น GelMate 2000 (TOYOBO, Japan)
8) ถาดต้นแบบเตรียมเจล
9) เครื่องถ่ายรูปเจลรุ่น GeneGenius (SynGene, UK)
10) Microwave (Shap, Taiwan)
11) Vortex mixer รุ่น MSI mini shaker (IKS, Canada)
12) Dry dath รุ่น JN 07095 (Labnet, USA)
13) Spectophotometer รุ่น ultraspec 110 pro (Biochrom, England)
14) Micropipette
15) Centrifuge tube
16) Micro tube 1.5 มิลลิลิตร

3.17.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ และ สารเคมี

1) Luria bertani broth (Biomark, India)
2) Buffer A [6.7 % of sucrose, 100 ml TE buffer]
3) Lysozyme (Sigma, USA)
4) RNase (Fermentus, USA)
5) Proteinase K (Sigma, U.S.A)
6) Phenol (Merk, Germany)
7) Chloroform (Merk, Germany)
8) Isoamyl (Merk, Germany)
9) Isopopanol (Merk, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10) Ethanol (Merk, Germany)

11) NaCl (Ajax Finechem, Australia)

12) Agarose gel (Vivantis, Malaysia)

13) 10X TBE buffer, pH 8.3 [Tris base 107.8 g, Boric acid 55 g, disodium EDTA 7.44 g]

14) Gel loading buffer [6X Gel loading buffer 1 ml , Ethidium bromide 100 µl]

15) Standard DNA 1 Kb DNA ladder (Vivantis, Malaysia)

16) Standard DNA 100 bp plus (Vivantis, Malaysia)

17) Primer BSF 8/20 (Fermentus, USA)

18) Primer REVB (Fermentus, USA)

19) 1x Tag Buffer (Fermentas, U.S.A)

20) dNTP (Fermentas, U.S.A)

21) $MgCl_2$ (Fermentas, U.S.A)

22) Tag DNA polymerase (Fermentas, U.S.A)

23) DMSO (Merk, Germany)

24) Ampicillin (Sigma, USA)

25) Isopropyl-B-D thiogalactoside : IPTG (Invitrogen, USA)

26) 5-bromo-4- chloro-3-indolyl-B-D-galactoside :X-gal (Vivantis, Malaysia)

3.17.3 ชุดทดสอบ

1) FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)

2) FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan)

3) InsTAclone™PCR Cloning Kit (Fermentas, U.S.A)

3.17.4 การสกัด Chromosomal DNA จากแบคทีเรียแกรมลบ

ทำการสกัด choromosomal DNA จากแบคทีเรียแกรมลบโดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ An *et al.* (2005) โดยนำแบคทีเรียแกรมลบ 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในหลอด micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรนำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บตะกอนซ้ำ 2-3 รอบ เติม Buffer A ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เติมสารละลาย lysozyme ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer ที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที นำไปบ่มด้วยเครื่อง dry bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย SDS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับโดยการกลับหลอด microtube ไปมาประมาณ 15-20 ครั้ง นำไปบ่มด้วยเครื่อง dry bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม RNase 4 ไมโครลิตร และ proteinase K 15 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากับโดยการกลับหลอด microtube ไปมาบ่มด้วยเครื่อง dry bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำเติม phenol:chloroform:isoamyl (25: 24:1โดยปริมาตร) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอด microtube ไปมาประมาณ 15 นาที นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ทางด้านบนใส่หลอด microtube ใหม่ เติม isopopanol (1 เท่าของปริมาณชั้นส่วนใสที่เก็บได้) และทำการกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใสด้านบนและล้างตะกอนด้วย ethanol เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใสด้านบนและเก็บตะกอนดีเอ็นเอ รอให้ตะกอนแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรนำไปเก็บไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการศึกษาต่อไป

3. 17.5 การสกัด Chromosomal DNA จากแบคทีเรียแกรมบวกด้วยวิธี Freeze-thaw

ทำการสกัด choromosomal DNA จากแบคทีเรียแกรมบวกโดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Tajima *et al.* (1999) โดยนำแบคทีเรียแกรมลบ 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตรบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บตะกอนซ้ำ 2-3 รอบ จากนั้นทำการเติม 2X TBE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตรกับ proteinase K ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปบ่มด้วยเครื่อง dry bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และให้รีบนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำตั้งแต่ตอนบ่มด้วยเครื่อง dry bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนถึงบ่มในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 3 รอบ จากนั้นนำไปบ่มด้วยเครื่อง dry bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ทางด้านบนใส่หลอด microtube ใหม่ จากนั้นทำเติม phenol:chloroform:isoamyl (25: 24:1โดยปริมาตร) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอด microtube ไปมาประมาณ 15 นาที นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ทางด้านบนใส่หลอด microtube ใหม่ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 5.3M NaCl ปริมาตร 120 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ทางด้านบนใส่หลอด microtube ใหม่ เติม isopopanol ในปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอด microtube ไปมานำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส่ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เติม ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตรนำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใส่ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เติม ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำซ้ำอีกครั้ง นำ DNA ที่ได้ไปผึ่งให้แห้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลายตะกอน DNA ให้เข้ากันนำไปเก็บไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการศึกษาต่อไป

3.17.6 การตรวจวิเคราะห์ DNA ด้วยด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

3.17.6.1 วิธีการเตรียม agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง agarose gel ปริมาตร 2 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม 1X TBE buffer ให้ครบ 200 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Microwave จนกว่า agarose gel จะละลายจนใส จากนั้นเทใส่ชุดถาดพลาสติกต้นแบบสำหรับเตรียมเจล รอจนเจลแข็งตัว ถอดหวีออก จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง gel electrophoresis

3.17.6.2 การรันเจลวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel electrophoresis

วาง agarose gel ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.17.6.2 ลงบนแท่นรองในเครื่อง gel electrophoresis เทสารผสม 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่น agarose gel จากนั้นผสม gel loading buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตรกับ ดีเอ็นเอจากข้อ 3.15.3 และ 3.15.4 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการดูดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมที่อยู่ด้านบนของ agarose gel ใช้ 1 kb DNA ladder เป็นตัวเปรียบเทียบ ปิดฝาเครื่องให้สนิดจากนั้นทำการรันเจลที่ค่าความต่างศักดิ์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 50 นาที หรือที่ 50 โวลต์ นาน 90 นาที ทำการถ่ายรูปเจล และวิเคราะห์แถบ DNA ที่ปรากฏ

3.17.7 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA gene จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') และ REVB (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') (Kanokratana *et al.* 2004) เทคนิคพีซีอาร์ 1 ปฏิกิริยา มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัม สารละลาย 1X Taq Buffer (75mM Tris-HCl, 20mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% Tween 20) dNTP ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ในส่วนของ Forward (BSF8/20) และ Reverse (REVB) ความเข้มข้นอย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) ความเข้มข้น 0.05 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ก่อนการทำงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียม ดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กันคืออุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์อย่างเหมาะสม และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

3.17.8 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์ตามข้อ 3.17.6 แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ผ่านเครื่อง Gel documenter จากนั้นเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ FADF Buffer 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด จากนั้นกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ FADF Column ที่วางอยู่ในหลอด collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติม Wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที ต่อมาย้าย FADF Column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม Elution Buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.15.5 โดยใช้ 100 bp plus DNA Ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.17.9 การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ (Ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.17.8 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิตเวคเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Ligation buffer [40 mM Tris-Hcl, 10 mM $MgCl_2$,10 mM DTT, 0.5 mATP (pH 7.8 at 25°C)] พลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T ความเข้มข้น 55 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร T4 DNA Ligase ความเข้มข้น 5 ยูนิต ผลผลิตพีซีอาร์และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.17.10 การเตรียมเชื้อ *Escherichia coli* DH5α ให้เป็น competent cell

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* DH5α บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเข็ง LB (Luria-Bertani) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีที่ได้มา 1 โคโลนี ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 300 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.6 (Sambrook *et al.* 1989) จากนั้นถ่ายเชื้อลง centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น (ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม DMSO 0.7 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ใน micro tube แล้วเก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.17.11 การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock

ทำการประยุกต์ตามกรรมวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) นำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นปิเปตสารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ในข้อที่ 3.15.9 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-3 นาที ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งสารละลายไปเกลี่ย (spread) บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิโมลาร์ และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.17.12 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, X-gal และ IPTG เนื่องจาก pTZ57R/T (Fermentas) มีบริเวณ *lacZ* gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase โดยจะทำการย่อย X-Gal ให้ได้โคโลนีสีฟ้า แต่พลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene ที่บริเวณ *lacZ* gene จะทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้และได้โคโลนีสีขาวแทน

3.17.13 การสกัดพลาสมิดจากพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene

การสกัดพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene โดยใช้ชุดสกัด FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit ซึ่งกรรมวิธีการสกัดเริ่มจากนำโคโลนีของเชื้อที่ได้รับการทรานส์ฟอร์มด้วย 16S rRNA gene มาเลี้ยงในขวดลูกชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ภายในมีอาหาร LB อยู่ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้ายสารละลายแบคทีเรียจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาทีเทส่วนใส่ภายนอกทิ้งจากนั้นทำการเติมสารละลายแบคทีเรียใหม่ ทำซ้ำอีก 2 – 3 ครั้งเพื่อให้ได้ตะตอนแบคทีเรียที่มากพอจากนั้นเติม FAPD1 Buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม FAPD2 Buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 นาที และเติม FAPD3 Buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้งทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูส่วนใสที่ไม่ตกตะกอนใส่ลงใน FAPD Column ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน FAPD Column ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงใน FAPD Column ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใส่ทิ้งและปั่นตกตะกอนซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาทีจากนั้นทำการย้าย FAPD Column ใส่ในหลอด Micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่ และทำการเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นจะได้ส่วนของสกัดพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene อยู่ใน Elution Buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.17.14 การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I และ *Bam* HI

นำผลจากการสกัดพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene จากข้อ 3.15.12 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I และ *Bam* HI (Fermentas) โดยปฏิกิริยาของการตัดมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยตรงจากโคโลนี 3 ไมโครลิตร 1X Buffer Tango™ with BSA (Tris-acetate (pH 7.9 at 37° C) ความเข้มข้น 3.3 มิลลิโมลาร์, Magnesium acetate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, Potassium acetate ความเข้มข้น 6.6 มิลลิโมลาร์, BSA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I และ *Bam* HI ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซีสด้วย อะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ตามวิธีในข้อ 3.15.5 โดยใช้ 100 bp plus DNA Ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.17.15 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท First BASE Laboratories Sdn. Bhd. ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ M13F (-29) (5' CACGACGTTGTAAAACGAC 3') ในด้าน Forward และใช้ไพรเมอร์ M13R (-20) (5' GCGGATAACAATTTCACACAGG 3') ในด้าน Reverse ข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยทำการนำส่วนของไพรเมอร์ออกจากนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ หลังจากนั้นทำการต่อสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ด้าน Forward และ Reverse เข้าด้วยกันโดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Version 7.0.9.0 (Hall. 1999)

3.17.16 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence)

จากนั้นวิเคราะห์โคลนที่ได้ว่ามีค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเตอร์เน็ตที่ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% indentity) และรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN

การจำแนกโคลนออกเป็นหมวดหมู่โดยโปรแกรม Classifer ในอินเตอร์เน็ตที่ Ribosomal Database Project (http://rdp.cme.msu.edu/doc.; Cole *et al.* 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.17.17 การขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Database submission)

ทำการขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของประชากรแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษา (Accession number) กับฐานข้อมูล NCBI ในอินเตอร์เน็ตที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bankit.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อ *Pythium* spp. จากผักกินใบ

เชื้อ *Pythium* spp. แยกได้จากผักสลัดที่แสดงอาการโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ด้วยกรรมวิธี pour plate บนอาหาร CMA+BNPRA ภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกเชื้อดังกล่าวได้ทั้งสิ้น 82 สายพันธุ์ ซึ่งมาจากรากสลัด *L. sativa* cv. Red oak และ *L. sativa* cv. Butter head ในกรุงเทพมหานคร จำนวน 19 และ 14 สายพันธุ์ตามลำดับ จากรากสลัด *L. sativa* cv. Green oak และ *L. sativa* cv. Cos ในจังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 12 และ 10 สายพันธุ์ตามลำดับ และแยกได้จากรากสลัด *L. sativa* cv. Green oak และ *L. sativa* cv. Red oak ในจังหวัด สมุทรปราการ จำนวน 23 และ 4 สายพันธุ์ตามลำดับ และเมื่อย้ายเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA ที่เจริญภายใต้ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร PDA ได้ดังนี้ การเจริญในรูปแบบ cottony pattern (โคโลนีที่มีการเจริญของเส้นใยรวมตัวกันและเจริญฟูเหมือนปุยฝ้ายอยู่บนหน้าอาหาร จำนวน 63 สายพันธุ์) การเจริญในรูปแบบ chrysanthemum pattern (โคโลนีที่มีการเจริญของเส้นใยคล้ายกับดอกเบญจมาศ: ซึ่งจากการแยกพบลักษณะคล้ายกับดอกที่เจริญกันอย่างหลวมๆจำนวน 5 สายพันธุ์ และแบบที่คล้ายกับกลีบดอกที่เจริญกันแน่นจำนวน 8 สายพันธุ์) การเจริญในรูปแบบ rosette pattern (โคโลนีที่มีการเจริญของเส้นใยคล้ายกับดอกกุหลาบ: ซึ่งจากการแยกพบลักษณะคล้ายกับกลีบดอกเจริญซ้อนกันแน่นอัตราการเจริญเป็นไปอย่างรวดเร็วจำนวน 1 สายพันธุ์ แบบที่มีลักษณะคล้ายกับกลีบดอกที่เจริญกันอย่างหลวมอัตราการเจริญช้าจำนวน 1 สายพันธุ์ และแบบที่มีลักษณะคล้ายกับกลีบดอกเจริญซ้อนกันแน่นอัตราการเจริญช้าจำนวน 3 สายพันธุ์) และ การเจริญในรูปแบบ radiate (โคโลนีที่มีการเจริญของเส้นใยแผ่ออกเป็นรัศมีจำนวน 1 สายพันธุ์) ดังตารางที่ 4.1

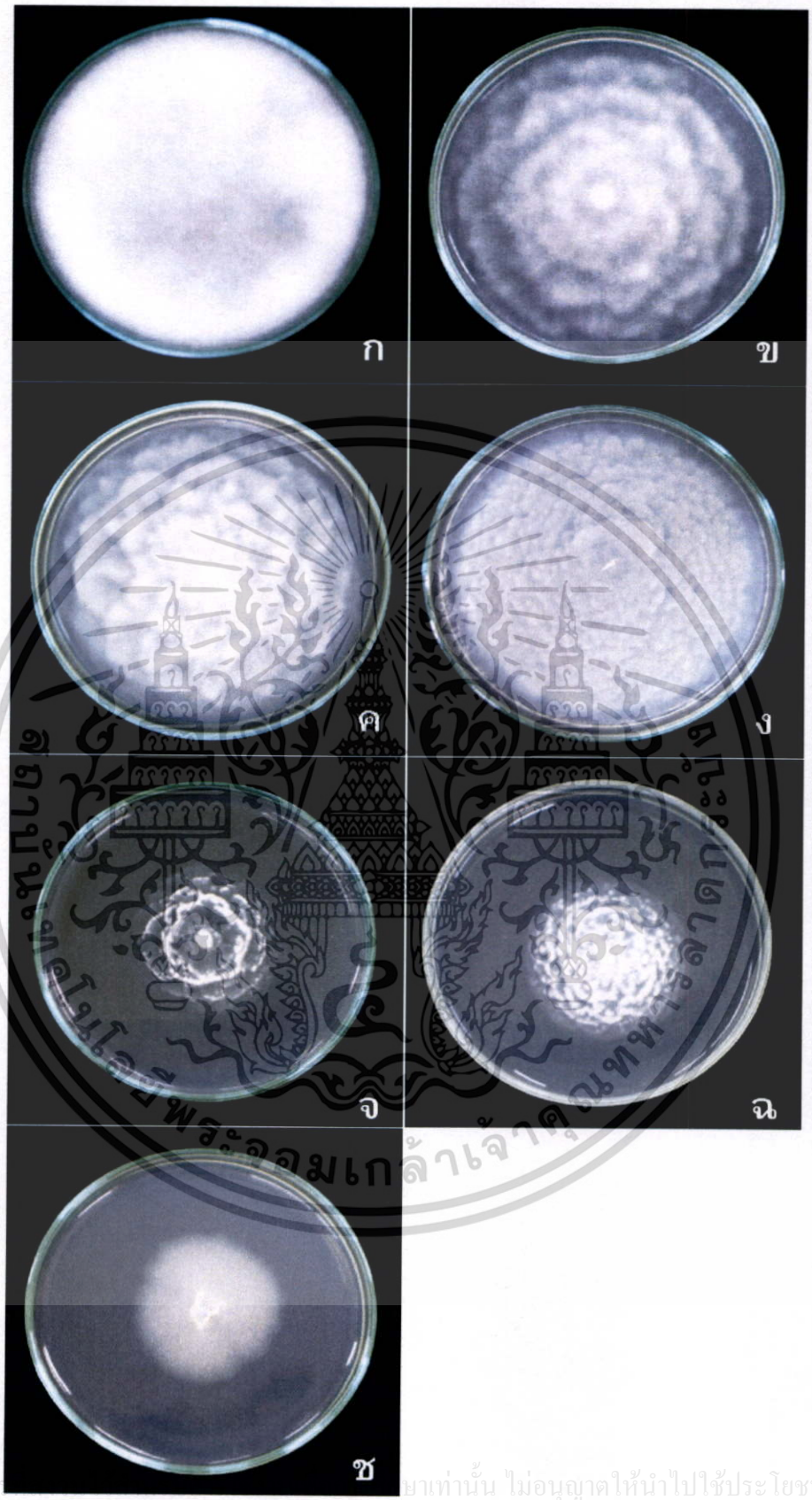
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความแตกต่างของเชื้อ *Pythium* spp. ตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA

แหล่งตัวอย่าง	ชื่อสายพันธุ์	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA [1]	หมายเหตุ
Red oak (กรุงเทพฯ)	PRO 001 ถึง PRO 019	Cottony pattern	ภาพที่ 4.1ก
Butter head (กรุงเทพฯ)	PBT 001 ถึง PBT 014	Cottony pattern	ภาพที่ 4.1ก
Green oak (ฉะเชิงเทรา)	PGO 001, PGO 007 และ PGO 008	Chrysanthemum pattern	ภาพที่ 4.1ข
	PGO 002, PGO 003 และ PGO 009	Cottony pattern	ภาพที่ 4.1ก
	PGO 004, PGO 005, PGO 006, PGO 010, PGO 011 และ PGO 012	Chrysanthemum pattern	ภาพที่ 4.1ค
Cos (ฉะเชิงเทรา)	PCO 001	Rosette pattern	ภาพที่ 4.1ง
	PCO 002 ถึง PCO 006, PCO 008 และ PCO 009	Cottony pattern	ภาพที่ 4.1ก
	PCO 007	Chrysanthemum pattern	ภาพที่ 4.1ค
	PCO 010	Chrysanthemum pattern	ภาพที่ 4.1ข
Green oak (สมุทปราการ)	PGO 013	Chrysanthemum pattern	ภาพที่ 4.1ข
	PGO 014, PGO 016 ถึง PGO 018, PGO 020 ถึง PGO 024, PGO 026, PGO 028 ถึง PGO 032, PGO034 และ PGO 035	Cottony pattern	ภาพที่ 4.1ก
	PGO 015	Rosette pattern	ภาพที่ 4.1จ
	PGO 019	Chrysanthemum pattern	ภาพที่ 4.1ค
	PGO 025 และ PGO 027	Rosette pattern	ภาพที่ 4.1ฉ
	PGO 033	Radiate	ภาพที่ 4.1ช
Red oak (สมุทรปราการ)	PRO 020 ถึง PRO 023	Cottony pattern	ภาพที่ 4.1ก

[1] Based on Colony characteristics by Plaats-Niterink (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]ษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีเชื้อ *Pythium* spp. ที่เจริญบนอาหาร potato dextrose agar จาก ก ถึง ช ตามตารางที่ 4.1

4.2 การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคจากเชื้อ *Pythium* spp.

เชื้อ *Pythium* spp. ที่แยกได้ทั้งหมด 82 สายพันธุ์ ทำการสุ่มเลือกทั้งหมด 20 สายพันธุ์โดยคิดจาก 20 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันภายในกลุ่ม ซึ่งเศษที่ได้จะถือว่าเป็น 1สายพันธุ์ จึงทำให้ได้เชื้อที่แยกได้มาทำการทดสอบความรุนแรงของการเกิดโรครวม 20 สายพันธุ์โดยทดสอบกับพืช 2 ชนิดคือ *L. sativa* cv. Butter head และ *L. sativa* cv. Red oak ที่มีอายุ 3 สัปดาห์ที่ปลูกในระบบ solution culture หลังจากปลูกเชื้อ 5 วันพบว่าในพืช *L. sativa* cv. Butter head เชื้อกลุ่มที่ทำให้เกิดโรครากเน่าความรุนแรงสูงสุดคือเชื้อสายพันธุ์ PGO011, PGO 014 และ PGO 016 โดยมีค่าเฉลี่ยของดัชนีการเกิดโรคเท่ากันคือ 75 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.2) ส่วนในพืช *L. sativa* cv. Red coral เชื้อกลุ่มที่ทำให้เกิดโรครากเน่าความรุนแรงสูงสุดคือ PGO 016 โดยมีค่าเฉลี่ยดัชนีการเกิดโรคเท่ากับคือ 91.67 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือ สายพันธุ์ PGO 014 โดยมีค่าเฉลี่ยของดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 83.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.3)

ภาพที่ 4.2 อาการโรครากเน่าใน *L. sativa* cv. Butter head หลังจากปลูกเชื้อสายพันธุ์ PGO 011, PGO 014 และ PGO 016 เป็นเวลา 5 วันเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

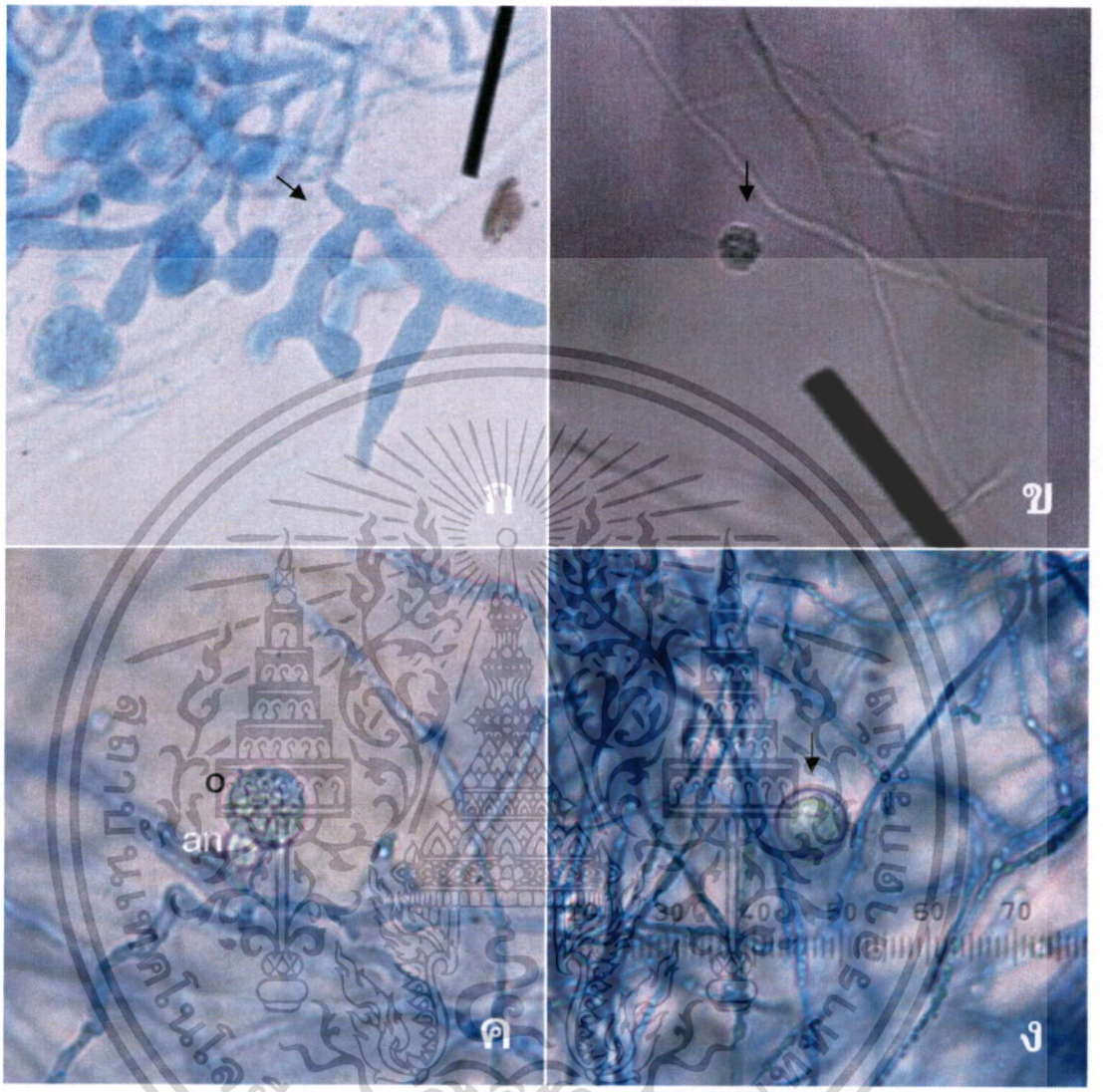
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.3 อาการโรครากเน่าใน *L. sativa* cv. Red oak หลังจากปลูกเชื้อสายพันธุ์ PGO 014 และ PGO 016 เป็นเวลา 5 วันเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

จากนั้นนำเชื้อ *Pythium* spp.ที่ทำให้เกิดโรครากเน่ารุนแรงไปทำการจัดจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด compound พบว่าเชื้อ *Pythium* sp. สายพันธุ์ PGO 016 เป็นเชื้อราที่มีเส้นใยสีใส ไม่มีผนังกั้น จะสร้าง sporangia ได้ทั้งที่ปลายเส้นใย และระหว่างเส้นใยที่มีลักษณะโป่งแบบ lobate (inflated) ส่วน sporangia ของสายพันธุ์ PGO 016 จะให้กำเนิดเส้นใยสั้นๆ ตอนปลายโป่งออกเป็น vesicle ที่จะพัฒนากลายเป็น zoospores (indirect germination) มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว เชื้อสามารถสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (oogonium) ซึ่งมีรูปร่างกลม และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium) มีรูปร่างทรงกระบอกขึ้นที่ปลายของเส้นใย ซึ่งอาจเกิดจากเส้นใยเดียวกัน หรือคนละเส้นก็ได้ ซึ่ง 1 oogonium กับ 1 antheridium มาสัมผัสกัน กลายเป็น oospores ซึ่งจากการเปรียบเทียบลักษณะที่พบกับลักษณะที่ให้ไว้ใน Plaats-Niterink (1981) สามารถจัดจำแนกได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ PGO 016 เป็นเชื้อ *Py. aphanidermatum* (ภาพที่ 4.4)

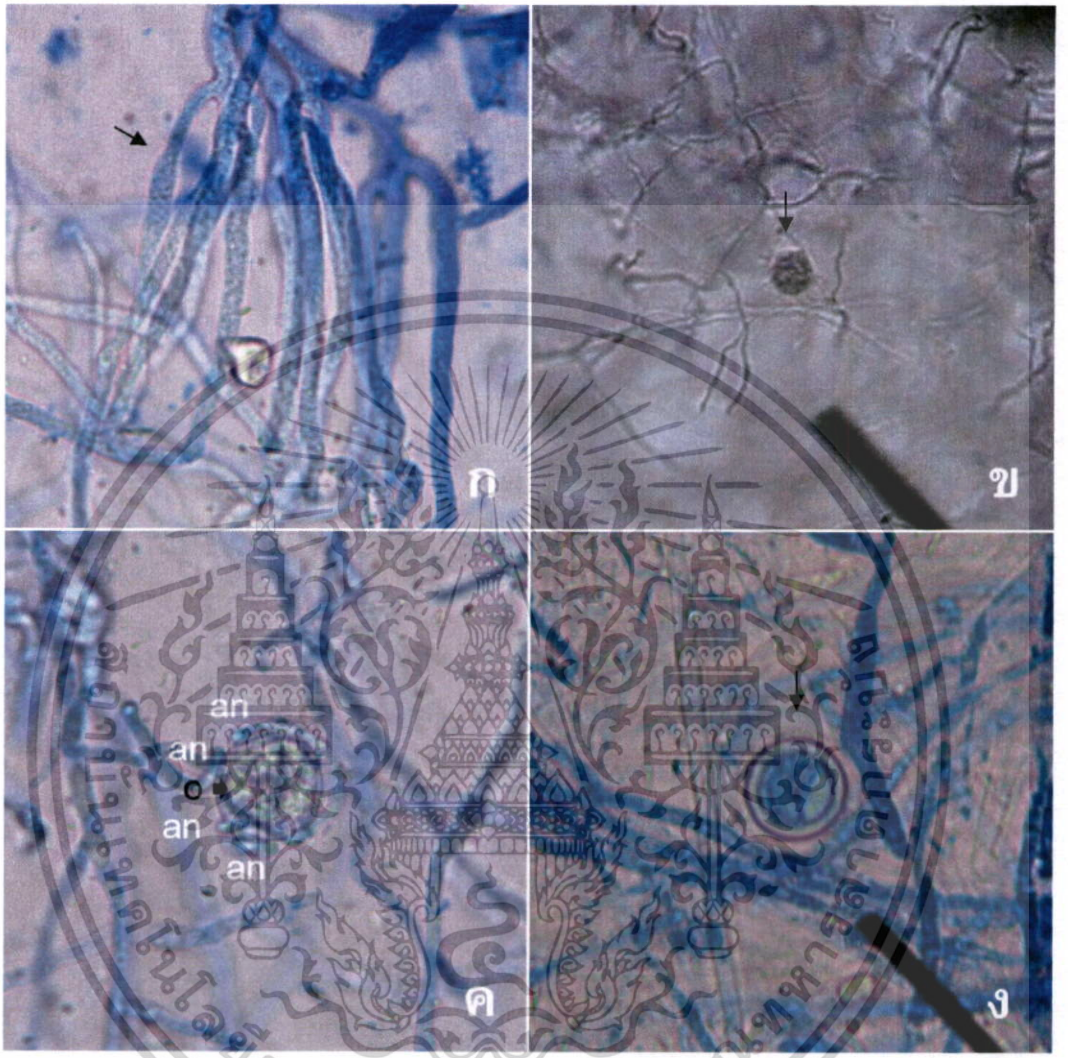
ส่วนเชื้อสายพันธุ์ PGO011 และ PGO 014 เป็นเชื้อราที่มีเส้นใยที่มีสีใส ไม่มีผนังกั้น สร้าง sporangia ได้ทั้งที่ปลายเส้นใยและระหว่างเส้นใย ที่มีลักษณะโป่งแบบ spherical หรือ filamentous ส่วน sporangia ของเชื้อสายพันธุ์ PGO011 และ PGO 014 จะให้กำเนิดเส้นใยสั้นๆ ตอนปลายโป่งออกเป็น vesicle ที่จะพัฒนากลายเป็น zoospores มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว เชื้อสามารถสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียซึ่งมีรูปร่างกลม และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีรูปร่างทรงกระบอกขึ้นที่ปลายของเส้นใย ซึ่งอาจเกิดจากเส้ใยจากคนละเส้น จากนั้น 1 oogonium กับ 3-6 antheridia มาสัมผัสกัน กลายเป็น oospores ซึ่งจากการเปรียบเทียบลักษณะที่พบกับลักษณะที่ให้ไว้ใน Plaats-Niterink (1981) สามารถจัดจำแนกได้ว่าเชื้อ สายพันธุ์ PGO011 และ PGO 014 เป็นเชื้อ *Py. myriotylum* (ภาพที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ส่วนประกอบของเชื้อ *Pythium aphanidermatum* โดยที่ ก = sporangium, ข = vesicle ที่ภายในบรรจุ zoospores, ค = 1 oogonium (o) กับ 1 antheridium (an) มาสัมผัสกัน และ ง = oospores

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ส่วนประกอบของเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยที่ ก = sporangium, ข = vesicle ที่ภายในบรรจุ zoospores, ค = 1 oogonium (o) กับ 4 antheridia (an) มาสัมผัสกัน และ ง = oospores

เมื่อทำการแยกและจัดจำแนกเชื้อสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าอย่างรุนแรงแล้วทำการเก็บเชื้อ *Py. myriotylum* และ *Py. aphanidermatum* โดยทำการเลี้ยงเชื้อไว้ใน CMA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันหลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การแยกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช (rhizosphere bacteria)

การแยกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช ที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทั้งหมด 16 ตัวอย่างในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน 4 แบบคือ nutrient film technique (NFT) 4 ตัวอย่าง, deep flow technique (DFT) 6 ตัวอย่าง, dynamic root floating technique (DRFT) 7 ตัวอย่าง และ substrate culture 4 ตัวอย่าง ที่ได้จากกรุงเทพมหานคร ฉะเชิงเทรา นครราชสีมา และเชียงใหม่ ซึ่งทำการแยกแบคทีเรียโดย ดูลักษณะโคโลนีที่ปรากฏด้วยตา ซึ่งโคโลนีที่แตกต่างกันบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PTYGA, TSA และ King's medium B จะถูกแยกออกมาเพื่อนำไปศึกษา ซึ่งจากการแยกแบคทีเรียเขตรากพืชพบว่าได้แบคทีเรียทั้งหมด 741 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งตามบริเวณที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ 4 ส่วนคือ แบคทีเรียจากบริเวณรอบราก (ectorhizosphere bacteria) 182 สายพันธุ์ แบคทีเรียครอบครองราก (root colonizing bacteria) 139 สายพันธุ์ แบคทีเรียจากบริเวณผิวราก (rhizoplane bacteria) 190 สายพันธุ์ และ แบคทีเรียที่เจริญอยู่ภายในเซลล์ราก (endophytic bacteria) 230 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่างๆบริเวณเขตรากพืช

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (สายพันธุ์) [1/]				รวม
	Endophytic	Rhizoplane	Root colonizing	Ectorhizosphere	(สายพันธุ์)
NFT					
Red coral	50 (ERC001-050)	54 (RRC001-054)	14 (CRC001-014)	-	118
Cos	10 (ECO009-018)	15 (RCO009-023)	11 (CCO011-021)	-	36
Red oak	12 (ERO014-025)	11 (RRO006-016)	9 (CRO006-014)	-	32
Nutrient solution (Cos and Red oak)	-	-	-	26 (SSMIX001-026)	26
DFT					
Celery	17 (EK001-017)	8 (RK001 -008)	11 (CK001-011)	-	36
Peppermint	4 (EPM001-004)	7 (RPM001-007)	10 (CPM001-010)	-	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (สายพันธุ์)[µ]				รวม
	Endophytic	Rhizoplane	Root colonizing	Ectorhizosphere	(สายพันธุ์)
Water cress	27 (EWC039, 046-062, 064-066, 069 และ 132-136)	39 (RWC020-036, 038, 040-045, 063 และ 094-107)	28 (CWC067-068, 070-093 และ 137-138)	-	94
Nutrient solution (Celery)	-	-	-	14 (SSK001-014)	14
Nutrient solution (Peppermint)	-	-	-	7 (SSPM001-007)	7
Nutrient solution (Water cress)	-	-	-	46 (SSWC001-019, 037, 108-131 และ 139-140)	46
DRFT					
Cos	8 (ECO001-008)	8 (RCO001-008)	10 (CCO002-010)	-	26
Frillice iceberg	20 (EFI001-020)	10 (RFI001-010)	10 (CFI001-010)	-	40
Green oak	2 (EGO001-002)	18 (RGO001-018)	25 (CGO001-025)	-	45
Red oak	13 (ERO001-013)	5 (RRO001-005)	5 (CRO001-005)	-	23
Nutrient solution (Frillice iceberg)	-	-	-	9 (SSFI001-009)	9
Nutrient solution **(Frillice iceberg and Cos)**	-	-	-	8 (SSFICO001-008)	8
Nutrient solution (Green oak)	-	-	-	14 (SSGO001-014)	14
Nutrient solution (Red oak)	-	-	-	23 (SSRO001-023)	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

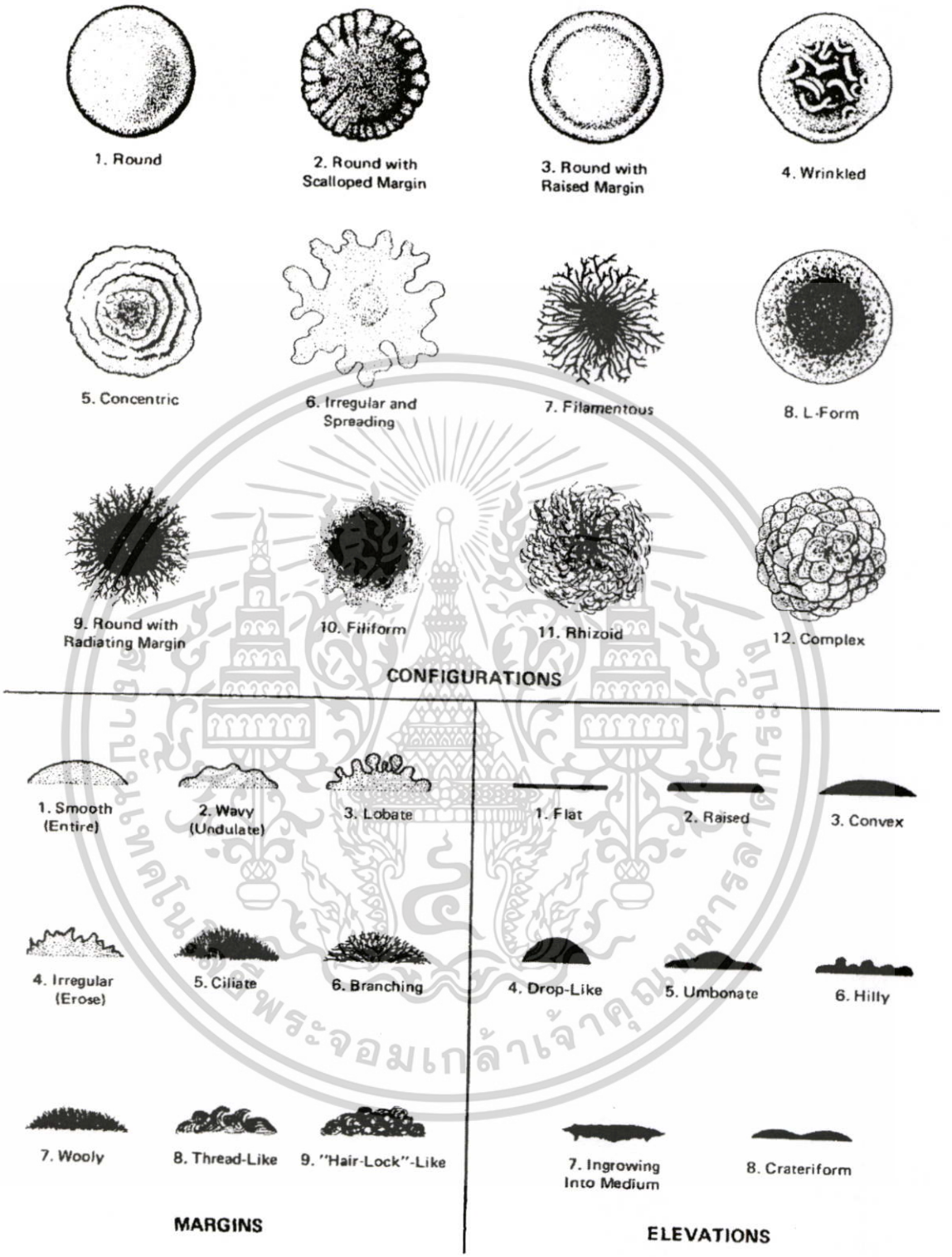
ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (สายพันธุ์)[1/]				รวม
	Endophytic	Rhizoplane	Root colonizing	Ectorhizosphere	(สายพันธุ์)
Substrate					
Chinese kale	43 (ECK001-043)	6 (RCK044-048)	1 (CCK052)	-	50
Swiss chard	24 (ESC006-010, 012-029 และ 044)	9 (RSC001 และ 063-070)	5 (CSC001-005)	-	38
Substrate (Chinese kale)	-	-	-	3 (SSCK049-051)	3
Substrate (Swiss chard)	-	-	-	32 (SSSC030-043 และ 045-062)	32
Total (สายพันธุ์)	230	190	139	182	741

[1/] ชื่อแบคทีเรียที่แยกได้จากพืช และระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่แตกต่างกันโดยที่ E= endophytic bacteria, R= rhizoplane bacteria, C= root colonizing bacteria, SS=ectorhizosphere bacteria และตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวต่อๆมาคืออักษรย่อของชนิดพืชที่แยก ตัวเลขที่ต่อท้ายคือลำดับของสายพันธุ์

จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมาบันทึกลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด stereoscopic microscope เปรียบเทียบตามภาพที่ 4.6 จาก Brown (2005) ซึ่งลักษณะที่ปรากฏแสดงไว้แสดงตามแต่ละชนิดของพืช และระบบปลูกพืชที่แยกได้ดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 รูปร่างของโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง

ที่มา: Brown (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหาร nutrient agar ของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช

ตัวอย่าง	จำนวน (สายพันธุ์)	Gram's staining	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA[1/]				หมายเหตุ[2/]
			color	configurations	elevations	margins	
NFT							
Red coral	2	+	orange	L-Form	Raised	Wavy(Undulate)	+OD0822
	1	+	white	Round	Raised	Wavy(Undulate)	+WD0122
	1	+	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Irregular(Erose)	+WD0224
	76	+	white	Irregular and Spreding	Raised	Lobate	+WD0623
	7	+	white	Irregular and Spreding	Hilly	Lobate	+WD0663
	1	+	white	Irregular and Spreding	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	21	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	2	+	white	Complax	Umbonate	Irregular(Erose)	+WD1252
	2	+	white	Complax	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	2	-	white	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-WD0141
	3	-	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Wavy(Undulate)	-WD0322
Cos	2	+	light orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OB0131
	1	+	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	+WD0121
	2	+	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Irregular(Erose)	+WD0224
	3	+	white	Round with Raised Margin	Umbonate	Smooth(Entire)	+WD0351
	2	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	4	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	4	+	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Irregular(Erose)	+WD0654
	3	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	1	+	yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	+YD0131
	1	+	yellow	Round with Raised Margin	Umbonate	Smooth(Entire)	+YD0351
	1	-	red	Round	Umbonate	Smooth(Entire)	-RD0151
	1	-	light white	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-WB0141
	1	-	light white	Wrinkled	Hilly	Lobate	-WB0463
	1	-	white	Round	Flat	Smooth(Entire)	-WD0111
	1	-	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WD0131
	2	-	white	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-WD0141
	1	-	white	Round	Umbonate	Smooth(Entire)	-WD0151
	1	-	light yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YB0131
	2	-	yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YD0131
	1	-	yellow	Round	Umbonate	Smooth(Entire)	-YD0151
Red oak	1	+	white	Round	Flat	Smooth(Entire)	+WD0111
	1	+	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	+WD0121
	1	+	white	Round	Hilly	Wavy(Undulate)	+WD0162
	3	+	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Irregular(Erose)	+WD0224
	8	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	1	+	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Lobate	+WD0653

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน (สายพันธุ์)	Gram's staining	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA[ง]				หมายเหตุ[ฉ]
			color	configurations	elevations	margins	
Red oak	8	+	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Irregular(Erose)	+WD0654
	1	+	white	Filamentous	Umbonate	Branchimg	+WD0756
	3	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	1	+	light yellow	Round	Umbonate	Smooth(Entire)	+YB0151
	1	-	red blight	Round	Convex	Smooth(Entire)	-RB0131
	1	-	light white	Wrinkled	Hilly	Lobate	-WB0463
	1	-	light yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YB0131
Nutrient solution (Cos and Red oak)	1	+	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OD0131
	1	+	light white	L-Form	Umbonate	Wavy(Undulate)	+WB0852
	1	+	light white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WB1264
	1	+	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	+WD0131
	1	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	1	+	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Wavy(Undulate)	+WD0652
	11	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	3	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	1	+	cream	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+YW1264
	1	-	light white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WB0131
	1	-	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WD0131
	1	-	crystal	Filiform	Hilly	Lobate	-WW1063
	1	-	yellow	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-YD0141
	1	-	cream	Round with Raised Margin	Umbonate	Wavy(Undulate)	-YW0352
DFT							
Celery	2	+	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OD0131
	2	+	White-orange	Round with Scalloped Margin	Umbonate	Smooth(Entire)	+OW0251
	1	+	White-orange	Concentric	Umbonate	Irregular(Erose)	+OW0454
	1	+	White-orange	Irregular and Spreading	Hilly	Lobate	+OW0663
	1	+	white	Round with Scalloped Margin	Flat	Irregular(Erose)	+WD0214
	2	+	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Irregular(Erose)	+WD0224
	4	+	white	Wrinked	Hilly	Wavy(Undulate)	+WD0462
	1	+	white	Wrinked	Hilly	Lobate	+WD0463
	2	+	white	Concentric	Umbonate	Lobate	+WD0553
	4	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	3	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	9	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	-	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	-WD0121
	2	-	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WD0131
	1	-	yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YD0131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน (สายพันธุ์)	Gram's staining	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA[1/]				หมายเหตุ[2/]
			color	configurations	elevations	margins	
Peppermint	1	+	light brown	Round	Raised	Smooth(Entire)	+BW0121
	2	+	white	Concentric	Hilly	Wavy(Undulate)	+WD0562
	6	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	4	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	2	+	white	L-From	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	4	-	crystal	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WW0131
	1	-	cream	Irregular and Spreading	Raised	Wavy(Undulate)	-YW0622
Water cress	4	+	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OD0131
	1	+	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	+WD0131
	1	+	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Irregular(Erose)	+WD0224
	10	+	white	Wrinked	Hilly	Lobate	+WD0463
	1	+	white	Wrinked	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0464
	8	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	24	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	9	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	2	-	light brown	Round	Raised	Smooth(Entire)	-BW0121
	3	-	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	-OD0131
	1	-	light white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	-WB0623
	11	-	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	-WD0121
	5	-	white	Round	Raised	Wavy(Undulate)	-WD0122
	1	-	white	Round	Raised	Irregular(Erose)	-WD0124
	5	-	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WD0131
	1	-	white	Round	Convex	Wavy(Undulate)	-WD0132
	1	-	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Wavy(Undulate)	-WD0222
	1	-	white	Round with Raised Margin	Umbonate	Wavy(Undulate)	-WD0352
	1	-	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	-WD0624
	1	-	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Lobate	-WD0653
	2	-	light yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YB0131
	2	-	cream	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YW0131
Nutrient solution (Celery)	1	+	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OD0131
	1	+	white	Round	Raised	Wavy(Undulate)	+WD0122
	1	+	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Irregular(Erose)	+WD0224
	4	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	1	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	2	+	white	Irregular and Spreading	Hilly	Lobate	+WD0663
	4	+	white	L-From	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน (สายพันธุ์)	Gram's staining	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA[1/]				หมายเหตุ[2/]
			color	configurations	elevations	margins	
Nutrient solution (Peppermint)	1	+	light brown	Round	Umbonate	Smooth(Entire)	+BW0151
	1	+	white	Wrinkled	Hilly	Lobate	+WD0463
	1	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	2	+	white	L-From	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	2	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
Nutrient solution (Water cress)	1	+	light brown	Concentric	Raised	Wavy(Undulate)	+BW0522
	3	+	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	+WD0121
	2	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	2	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	1	+	white	Irregular and Spreading	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	4	+	white	L-From	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	2	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	5	-	light brown	Round	Raised	Smooth(Entire)	-BW0121
	1	-	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	-OD0131
	2	-	light white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WB0131
	7	-	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	-WD0121
	3	-	white	Round	Raised	Wavy(Undulate)	-WD0122
	5	-	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WD0131
	1	-	white	Round with Scalloped Margin	Hilly	Irregular(Erose)	-WD0264
	1	-	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Lobate	-WD0653
	1	-	crystal	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	-WW0624
	3	-	crystal	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	-WW1264
	1	-	light yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YB0131
	1	-	cream	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-YW0141
DRFT							
Cos	5	+	white	Wrinkled	Hilly	Wavy(Undulate)	+WD0462
	1	+	white	Wrinkled	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0464
	1	+	white	Irregilar and Speading	Raised	Lobate	+WD0623
	5	+	white	Irregilar and Speading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	4	+	white	Irregilar and Speading	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	5	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	3	-	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WD0131
	1	-	cream	Round	Umbonate	Smooth(Entire)	-YW0151
Frillice iceberg	10	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	17	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	7	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	5	-	light white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WB0131
	1	-	white	Round with Raised Margin	Raised	Smooth(Entire)	-WD0321

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน (สายพันธุ์)	Gram's staining	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA[1/]				หมายเหตุ[2/]
			color	configurations	elevations	margins	
Green oak	1	+	light brown	Round	Raised	Wavy(Undulate)	+BW0122
	1	+	light brown	Concentric	Hilly	Irregular(Erose)	+BW0564
	1	+	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OD0131
	1	+	light white	Round	Hilly	Wavy(Undulate)	+WB0162
	1	+	white	Round	Raised	Wavy(Undulate)	+WD0122
	3	+	white	Round	Umbonate	Smooth(Entire)	+WD0151
	1	+	white	Wrinkled	Hilly	Wavy(Undulate)	+WD0462
	2	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	1	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	1	+	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Irregular(Erose)	+WD0654
	4	+	white	Irregular and Spreading	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	6	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	4	-	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	-WD0121
	1	-	white	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-WD0141
	3	-	white	Round	Umbonate	Wavy(Undulate)	-WD0152
	1	-	crystal	Irregular and Spreading	Convex	Smooth(Entire)	-WW0631
	9	-	crystal	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	-WW1264
	2	-	yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YD0131
	1	-	light yellow	Round	Hilly	Irregular(Erose)	-YW0164
Red oak	2	+	light brown	Round	Flat	Smooth(Entire)	+BW0111
	1	+	light brown	Round	Raised	Smooth(Entire)	+BW0121
	1	+	orange	Round	Raised	Smooth(Entire)	+OD0121
	1	+	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OD0131
	2	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	4	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	2	+	white	Irregular and Spreading	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	2	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	1	-	light white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WB0131
	1	-	light white	Irregular and Spreading	Hilly	Smooth(Entire)	-WB0661
	1	-	white	Round with Raised Margin	Raised	Smooth(Entire)	-WD0321
	2	-	white	L-Form	Umbonate	Wavy(Undulate)	-WD0852
	2	-	yellow	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-YD0141
Nutrient solution (Frillice iceberg)	5	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	1	+	white	L-From	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	2	-	white	Round	convex	Smooth(Entire)	-WD0131
	1	-	yellow	Round	convex	Smooth(Entire)	-YD0131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน (สายพันธุ์)	Gram's staining	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA[1/]				หมายเหตุ[2/]
			color	configurations	elevations	margins	
Nutrient solution (Frillice iceberg and Cos)	6	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	2	+	white	L-From	Umbonate	Irregular(Erose)	+WD0854
Nutrient solution (Green oak)	1	+	light white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WB1264
	1	+	white	Round	Raised	Wavy(Undulate)	+WD0122
	3	+	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	+WD0131
	3	+	white	Irregular and Spreading	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	2	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	1	-	light white	Round	Raised	Smooth(Entire)	-WB0121
	1	-	crystal	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	-WW1264
	1	-	yellow	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-YD0141
	1	-	cream	Round	Raised	Smooth(Entire)	-YW0121
Nutrient solution (Red oak)	1	+	white	Wrinkled	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0464
	10	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	2	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	7	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	3	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
Substrate							
	2	+	light brown	Round	Raised	Smooth(Entire)	+BW0121
	3	+	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	+WD0121
	4	+	white	Round	Raised	Wavy(Undulate)	+WD0122
	3	+	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	+WD0131
	3	+	white	Round with Scalloped Margin	Raised	Irregular(Erose)	+WD0224
	3	+	white	Round with Raised Margin	Raised	Wavy(Undulate)	+WD0322
	1	+	white	Concentric	Umbonate	Wavy(Undulate)	+WD0552
	3	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	3	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	1	+	white	Irregular and Spreading	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	7	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
Chinese kale	2	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	1	-	light white	Round	Raised	Wavy(Undulate)	-WB0122
	5	-	light white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WB0131
	1	-	light white	Round with Radiating Margin	Umbonate	Ciliate	-WB0955
	2	-	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WD0131
	1	-	white	Filamentous	-	Branching	-WD0706
	3	-	crystal	Round	Raised	Wavy(Undulate)	-WW0122
	1	-	crystal	Concentric	Raised	Wavy(Undulate)	-WD0522
	1	-	light yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YB0131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานสารนิพนธ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

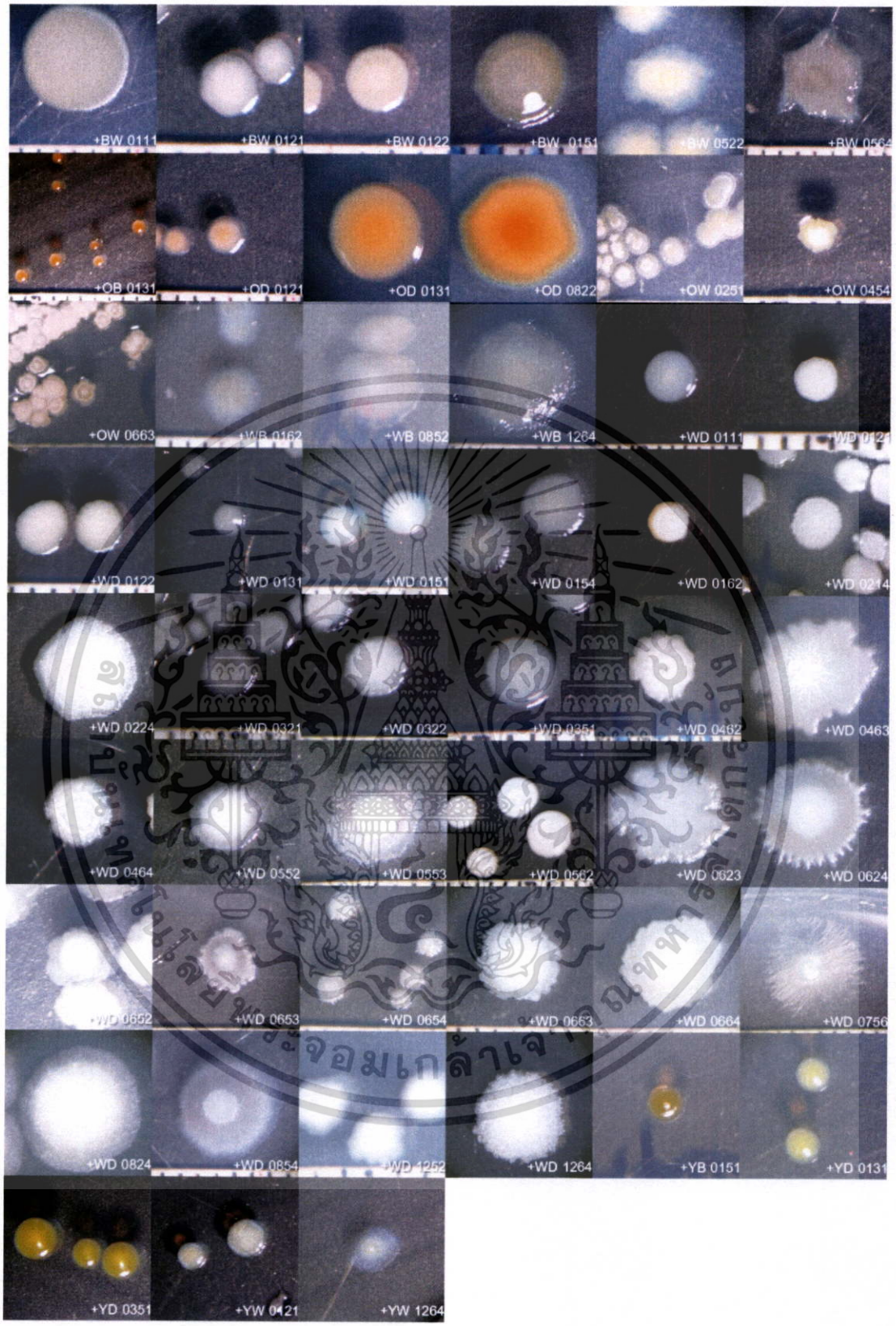
ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน (สายพันธุ์)	Gram's staining	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA[1/]				หมายเหตุ[2/]
			color	configurations	elevations	margins	
Swiss chard	1	+	light brown	Round	Raised	Smooth(Entire)	+BW0121
	1	+	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OD0131
	1	+	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	+WD0121
	1	+	white	Round	Convex	Smooth(Entire)	+WD0131
	7	+	white	Concentric	Umbonate	Wavy(Undulate)	+WD0552
	4	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	3	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular(Erose)	+WD0624
	3	+	white	Irregular and Spreading	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	5	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	5	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	1	+	cream	Round	Raised	Smooth(Entire)	+YW0121
	1	-	light white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WB0131
	1	-	light white	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-WB0141
	2	-	white	Round with Raised Margin	Umbonate	Smooth(Entire)	-WD0351
	1	-	yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YD0131
	1	-	cream	Round with Radiating Margin	Hilly	Thread-Like	-YW0968
Substrate (Chinese kale)	1	-	crystal	Concentric	Raised	Wavy(Undulate)	-WD0522
	1	-	yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YD0131
	1	-	cream	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YW0131
Substrate (Swiss chard)	2	+	light white	Round	Raised	Smooth(Entire)	+BW0121
	1	+	orange	Round	Convex	Smooth(Entire)	+OD0131
	1	+	white	Round	Raised	Smooth(Entire)	+WD0121
	1	+	white	Round	Umbonate	Smooth(Entire)	+WD0151
	3	+	white	Round	Umbonate	Irregular(Erose)	+WD0154
	1	+	white	Round with Raised Margin	Raised	Smooth(Entire)	+WD0321
	1	+	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Wavy(Undulate)	+WD0552
	8	+	white	Irregular and Spreading	Raised	Lobate	+WD0623
	1	+	white	Irregular and Spreading	Umbonate	Wavy(Undulate)	+WD0652
	1	+	white	Irregular and Spreading	Hilly	Irregular(Erose)	+WD0664
	3	+	white	L-Form	Raised	Irregular(Erose)	+WD0824
	2	+	white	Complex	Hilly	Irregular(Erose)	+WD1264
	2	-	light white	Round	Convex	Smooth(Entire)	-WB0131
	2	-	light white	Round	Drop-Like	Smooth(Entire)	-WB0141
	1	-	white	Round with Raised Margin	Umbonate	Smooth(Entire)	-WD0351
	1	-	light crystal	Round with Raised Margin	Umbonate	Wavy(Undulate)	-WW0352
	1	-	yellow	Round	Convex	Smooth(Entire)	-YB0131

[1/] เปรียบเทียบลักษณะตาม Brown (2005)

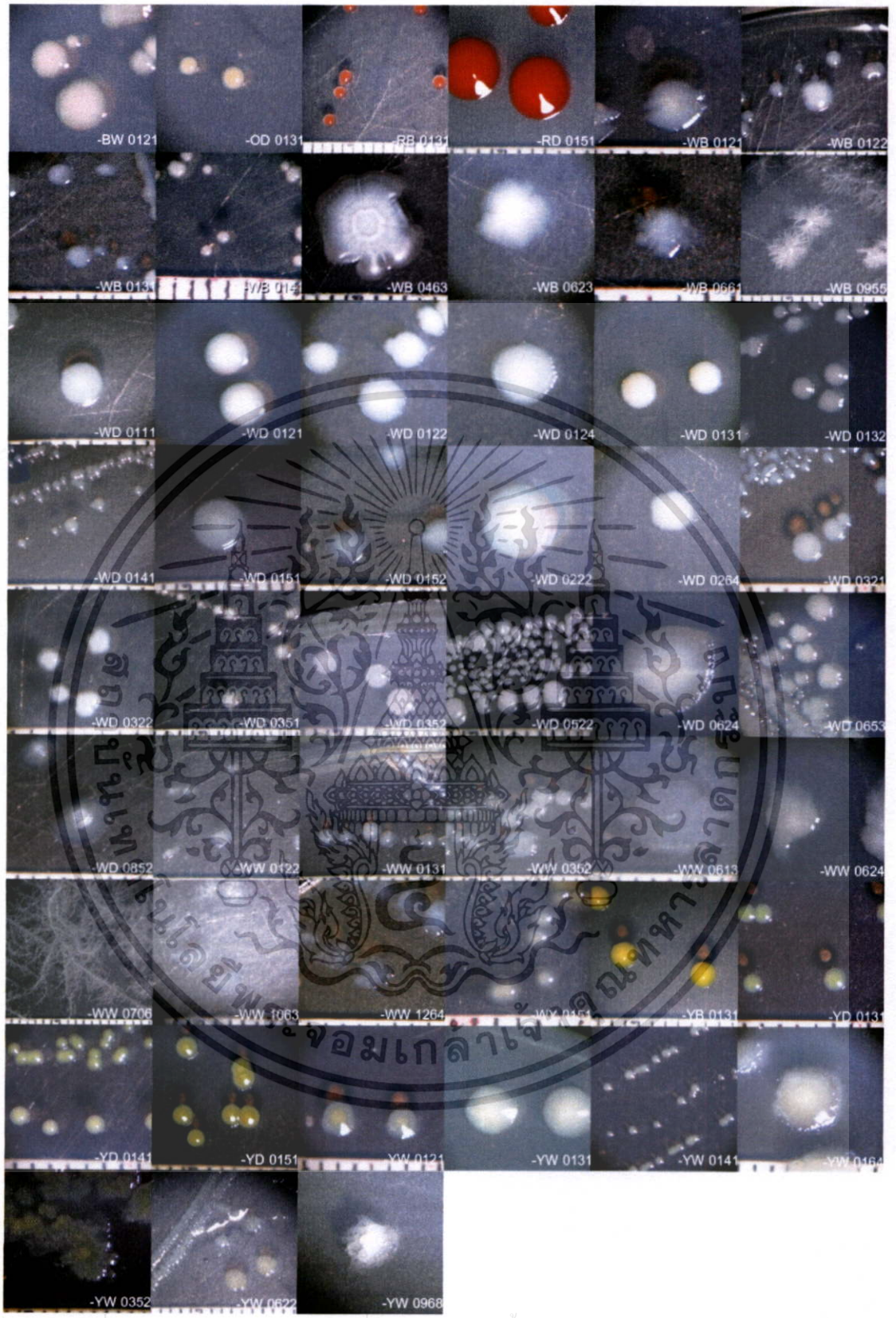
[2/] แสดงรูปภาพตามรหัสโดยแบคทีเรียแกรมบวก (+) ตามภาพที่ 4.7 และ แบคทีเรียแกรมลบ (–) ตามภาพที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.7 ลักษณะการเจริญบนอาหาร nutrient agar ของแบคทีเรียเขตรากพืชแกรมบวก (+)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.8 ลักษณะการเจริญบนอาหาร nutrient agar ของแบคทีเรียเขตรากพืชแกรมลบ (-)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. ด้วยวิธี bi-culture test

หลังจากได้เชื้อ *Py. myriotyrum* และ *Py. aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าในผักกินใบจากข้อ 4.2 และแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากข้อ 4.3 แบคทีเรียดังกล่าวได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Pythium* spp. สาเหตุโรครากเน่าด้วยวิธี bi-culture test โดยนำ mycelial disc ของเชื้อ *Pythium* sp. วางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ขอบด้านหนึ่งของจานเลี้ยงเชื้อและอีกด้านใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะ single colony ของเชื้อแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่จะทดสอบ ลากผ่านอาหาร PDA เป็นทางยาว ในทิศทางที่ขวางการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Pythium* sp. โดยมีกลุ่มการทดลองเปรียบเทียบคือ การเลี้ยงเชื้อ *Pythium* sp. เพียงอย่างเดียว บันทึกผลโดยวัดค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต โดยการทดสอบในครั้งแรกจะทดสอบกับเชื้อ *Py. aphanidermatum* ก่อน เนื่องจากเชื้อนี้สร้างความเสียหายได้หลายชนิดพืชในประเทศไทย ซึ่งจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 741 สายพันธุ์เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Py. aphanidermatum* มีแบคทีเรียที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 519 สายพันธุ์ และแบคทีเรียมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์จำนวน 222 สายพันธุ์ ซึ่งจะนำไปทดสอบต่อครั้งที่สองกับเชื้อ *Py. myriotyrum* และ *Py. aphanidermatum* เพื่อเป็นการยืนยันผลอีกครั้ง

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Py. myriotyrum* และ *Py. aphanidermatum* มากกว่า 61 เปอร์เซ็นต์ มีทั้งหมด 10 ได้แก่สายพันธุ์ ERO 002, ECK 017, SSCK 049, CSC 002, CSC 003, ESC 009, ESC 010, RSC 011, RSC 067, และ SSSC 041 ส่วนสายพันธุ์ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 41-60 เปอร์เซ็นต์มี 49 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ CCO 001, CCO 007, RCO 012, RCO 017, ECO 016, ECO 018, CRO 009, CRO 010, RRO 006, RRO 012, RRO 013, RRO 015, ERO 018, ERO 019, ERO 020, ERO 021, ERO 023, ERO 024, ERO 025, SSMIX 001, SSMIX 003, SSMIX 004, SSMIX 005, SSMIX 006, SSMIX 007, SSMIX 008, SSMIX 009, SSMIX 013, SSMIX 016, SSMIX 017, SSMIX 018, SSMIX 019, SSMIX 020, SSMIX 021, SSMIX 022, SSMIX 023, SSMIX 024, SSMIX 025, SSMIX 026, CPM 010, CWC 070, CWC 079, EWC 053, EWC 133, CGO 022, RGO 013, ESC 008, ESC 0022 และ SSCK 050 ซึ่งจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพ และมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* spp. ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อ *Pythium myriotyrum* และ *Pythium aphanidermatum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA

ตัวอย่าง	ถิ่นอาศัย	จำนวนสายพันธุ์ (สายพันธุ์)							
		การยับยั้ง (%) (1st Test) [1]		การยับยั้ง (%) (2nd Test) [2]					
				20-40		41-60		61-80	
		< 20[3]	> 20[3]	Pa	Pm	Pa	Pm	Pa	Pm
NFT									
Red coral	Root colonizing	14	0	-	-	-	-	-	-
	Rhizoplane	50	4	4	4	-	-	-	-
	Endophytic	43	7	7	7	-	-	-	-
Cos	Root colonizing	0	11	8	9	3	2	-	-
	Rhizoplane	3	12	10	10	2	2	-	-
	Endophytic	0	10	8	8	2	2	-	-
Red oak	Root colonizing	4	5	3	3	2	2	-	-
	Rhizoplane	0	11	7	7	4	4	-	-
	Endophytic	0	12	4	5	8	7	-	-
Nutrient solution (Cos and Red oak)	Ectorhizosphere	0	26	6	6	20	20	-	
DFT									
Celery	Root colonizing	7	4	4	4	-	-	-	-
	Rhizoplane	7	1	1	1	-	-	-	-
	Endophytic	17	0	-	-	-	-	-	-
Peppermint	Root colonizing	7	3	2	2	1	1	-	-
	Rhizoplane	7	0	-	-	-	-	-	-
	Endophytic	4	0	-	-	-	-	-	-
Water cress	Root colonizing	16	12	10	9	2	3	-	-
	Rhizoplane	24	15	15	13	-	2	-	-
	Endophytic	18	9	7	6	2	3	-	-
Nutrient solution (Celery)	Ectorhizosphere	13	1	1	1	-	-	-	-
Nutrient solution (Peppermint)	Ectorhizosphere	6	1	1	1	-	-	-	-
Nutrient solution (Water cress)	Ectorhizosphere	31	15	15	15	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ถิ่นอาศัย	จำนวนสายพันธุ์ (สายพันธุ์)							
		การยับยั้ง (%) (1st Test) [1/]		การยับยั้ง (%) (2nd Test) [2/]					
				20-40		41-60		61-80	
		< 20 [3/]	> 20 [3/]	Pa	Pm	Pa	Pm	Pa	Pm
DRFT									
Cos	Root colonizing	10	-	-	-	-	-	-	-
	Rhizoplane	4	4	4	4	-	-	-	-
	Endophytic	1	7	7	7	-	-	-	-
Frillice iceberg	Root colonizing	9	1	1	1	-	-	-	-
	Rhizoplane	9	1	1	1	-	-	-	-
	Endophytic	18	2	2	2	-	-	-	-
Green oak	Root colonizing	19	6	5	5	1	1	-	-
	Rhizoplane	16	2	1	1	1	1	-	-
	Endophytic	1	1	1	1	-	-	-	-
Red oak	Root colonizing	5	0	-	-	-	-	-	-
	Rhizoplane	5	0	-	-	-	-	-	-
	Endophytic	11	2	1	1	-	-	1	1
Nutrient solution (Frillice iceberg)	Ectorhizosphere	4	5	5	5	-	-	-	-
Nutrient solution (Frillice iceberg and Cos)	Ectorhizosphere	2	6	6	6	-	-	-	-
Nutrient solution (Green oak)	Ectorhizosphere	11	3	3	3	-	-	-	-
Nutrient solution (Red oak)	Ectorhizosphere	21	2	2	2	-	-	-	-
Substrate									
Chinese kale	Root colonizing	1	0	-	-	-	-	-	-
	Rhizoplane	6	0	-	-	-	-	-	-
	Endophytic	38	5	3	3	-	1	2	1
Swiss chard	Root colonizing	3	2	-	-	-	-	2	2
	Rhizoplane	7	2	-	-	-	-	2	2
	Endophytic	17	7	2	2	3	2	2	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

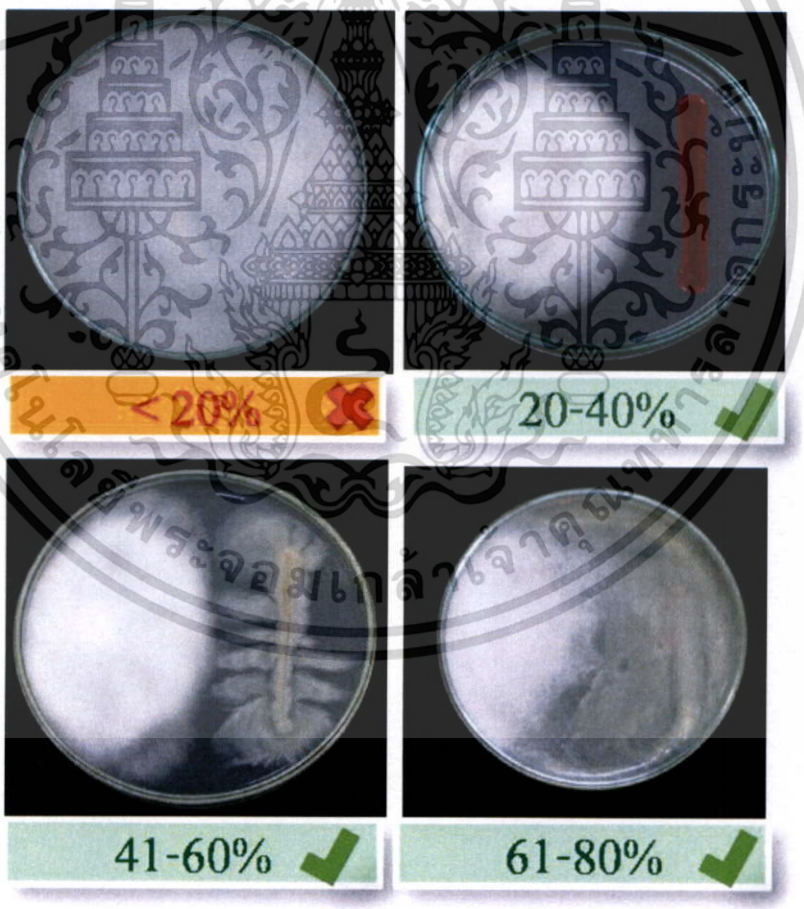
ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ถิ่นอาศัย	จำนวนสายพันธุ์ (สายพันธุ์)							
		การยับยั้ง (%) (1st Test) [1/]		% inhibition (2nd Test) [2/]					
				20-40		41-60		61-80	
		< 20 [3/]	> 20 [3/]	Pa	Pm	Pa	Pm	Pa	Pm
Substrate (Chinese kale)	Ectorhizosphere	1	2	-	-	1	1	1	1
Substrate (Swiss chard)	Ectorhizosphere	29	3	2	2	-	-	1	1
Total		**519**	**222**	**159**	**157**	**52**	**54**	**11**	**10**

[1/] เชื้อสาเหตุโรคที่ใช้ในการทดสอบคือ *Pythium aphanidermatum*

[2/] เชื้อสาเหตุโรคที่ใช้ในการทดสอบคือ *Pythium aphanidermatum* (Pa) และ *Pythium myriotylum* (Pm)

[3/] แสดงตัวอย่างการยับยั้งตามภาพที่ 4.9

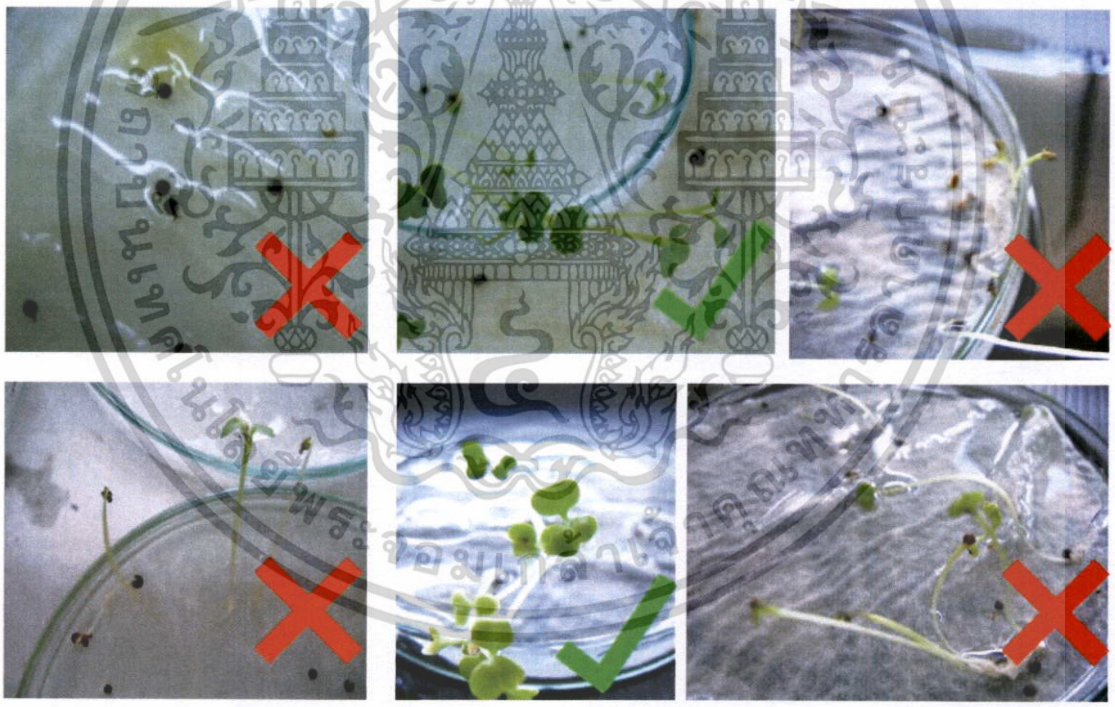


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.9 ตัวอย่างแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *Pythium* spp. ด้วยวิธี bi-culture test โดยที่เครื่องหมาย ✓ คือตัวอย่างลักษณะที่ผ่านการคัดเลือก และ ✗ คือตัวอย่างลักษณะที่ไม่ผ่านการคัดเลือก

4.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืชด้วยวิธี seedling bioassay

แบคทีเรียที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Pythium* spp. ได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี bi-culture test ทั้งหมด 222 สายพันธุ์จากข้อ 4.4 ถูกนำมาทดสอบเพื่อคัดกรองเอาเฉพาะสายพันธุ์ที่ไม่แสดงผลกระทบกับพืชทดสอบ ด้วยวิธี seedling bioassay โดยนำแบคทีเรียปริมาณ 1 cotton swab ลงไปคลุกกับเมล็ดพืชที่ใช้ทดสอบ ในครั้งนี้แล้วนำไปเพาะในกระดาษเพาะกล้าจากนั้นทำการประเมินผลโดยแบคทีเรียที่ส่งผลทางลบเช่นทำให้เมล็ดเน่า การเจริญในระยะเมล็ดผิดปกติไปจะถูกคัดออก จากนั้นจะทำการประเมิณค่าความแข็งแรงของต้นกล้าโดยใช้ค่าเฉลี่ยของความสูงลำต้น ความยาวราก เปอร์เซ็นต์การงอก มาคำนวนเป็นค่าเฉลี่ยดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียที่ไม่แสดงผลกระทบกับพืช (neutral strain) หรือสายพันธุ์ที่มีผลทางบวกกับพืชทดสอบ (beneficial strain) มีทั้งหมด 121 สายพันธุ์ (ตัวอย่างการทดสอบตามภาพที่ 4.10) โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากระบบ DFT, DRFT, NFT และ Substrates จำนวน 47, 18, 50 และ 6 สายพันธุ์ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5-4.8



ภาพที่ 4.10 ตัวอย่างแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการทดสอบความเป็นพิษกับพืช โดยที่เครื่องหมาย ✓ คือลักษณะที่ไม่แสดงผลกระทบกับพืช และ ✗ คือลักษณะที่แสดงผลกระทบทางลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าการเจริญเติบโต และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า (seedling vigor index) ของพืชทดสอบที่ใส่แบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากระบบ DFT

ชื่อสายพันธุ์	ค่าการเจริญเติบโต[1/]				ดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า	
	ลำต้น (ซม.)	ราก (ซม.)	การงอก (%)			
CK 007	0.72	2.35	80.00	A-E[2/]	243.33	C-L[2/]
CK 009	0.58	2.56	76.67	A-F	241.00	C-L
CPM 003	0.66	2.53	86.67	A-D	275.67	A-I
CPM 004	0.67	2.38	83.33	A-D	255.33	B-K
CPM 010	1.04	2.57	76.67	A-F	273.33	A-I
CWC 067	0.70	2.04	86.67	A-D	245.33	B-L
CWC 070	0.85	3.20	86.67	A-D	352.33	A
CWC 078	0.63	2.79	70.00	C-H	238.72	C-M
CWC 079	0.78	2.20	70.00	C-H	208.67	D-M
CWC 080	0.76	2.23	76.67	A-F	229.67	C-M
CWC 081	0.62	2.72	70.00	C-H	234.00	C-M
CWC 086	0.63	2.68	70.00	C-H	231.00	C-M
CWC 087	0.59	2.23	76.67	A-F	216.00	C-M
CWC 091	0.66	2.38	73.33	B-G	220.33	C-M
CWC 092	0.57	2.13	73.33	B-G	198.00	F-M
EWC 047	0.72	2.49	93.33	A-B	300.07	A-E
EWC 053	0.68	2.70	83.33	A-D	281.00	A-H
EWC 060	0.58	2.70	80.00	A-E	264.00	A-J
EWC 064	0.59	2.34	73.33	B-G	215.33	C-M
EWC 065	0.66	2.76	90.00	A-C	307.67	A-C
EWC 066	0.65	2.93	86.67	A-D	307.33	A-C
EWC 132	0.53	2.50	90.00	A-C	273.67	A-I
EWC 133	0.51	2.63	83.33	A-D	264.33	A-J
EWC 134	0.51	3.10	93.33	A-B	338.67	A-B
RK 001	0.60	2.51	76.67	A-F	238.33	C-M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ชื่อสายพันธุ์	ค่าการเจริญเติบโต[1/]			ดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า
	ลำต้น (ซม.)	ราก (ซม.)	การงอก (%)	
RWC 021	0.73	2.54	93.33 A-B[2/]	305.33 A-D[2/]
RWC 025	0.72	2.62	86.67 A-D	289.33 A-G
RWC 029	0.59	2.05	93.33 A-B	247.67 B-L
RWC 031	0.63	2.31	96.67 A	283.00 A-H
RWC 033	0.57	2.56	93.33 A-B	291.33 A-G
RWC 036	0.68	2.54	80.00 A-E	260.67 A-J
RWC 045	0.66	2.25	73.33 B-G	212.67 C-M
RWC 094	0.56	2.41	73.33 B-G	219.67 C-M
RWC 098	0.70	2.81	86.67 A-D	306.00 A-D
RWC 102	0.60	2.57	70.00 C-H	224.33 C-M
SSWC 004	0.74	2.54	80.00 A-E	261.67 A-J
SSWC 108	0.58	2.66	70.00 C-H	229.00 C-M
SSWC 109	0.60	2.74	73.33 B-G	245.67 B-L
SSWC 110	0.60	2.48	73.33 B-G	226.33 C-M
SSWC 112	0.57	2.74	70.00 C-H	233.67 C-M
SSWC 113	0.56	2.37	73.33 B-G	215.00 C-M
SSWC 114	0.46	2.54	70.00 C-H	212.33 C-M
SSWC 115	0.54	2.62	76.67 A-F	242.33 C-L
SSWC 117	0.67	2.58	70.00 C-H	225.33 C-M
SSWC 120	0.59	2.61	83.33 A-D	265.67 A-J
SSWC 122	0.55	2.72	73.33 B-G	239.33 C-M
SSWC 127	0.67	2.68	90.00 A-C	300.67 A-D
Control (healthy)	0.74	2.65	90.00 A-C	293.80 A-F

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 30 ต้น (n=30)

[2/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: สายพันธุ์ที่มีผลทางลบกับการทดสอบไม่ถูกแสดงผลไว้ที่นี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่าการเจริญเติบโต และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า (seedling vigor index) ของพืชทดสอบที่ใส่แบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากระบบ DRFT

ชื่อสายพันธุ์	ค่าการเจริญเติบโต[1/]			ดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า
	ลำต้น (ซม.)	ราก (ซม.)	การงอก (%)	
ECO 001	0.77	2.58	80.00 A-D[2/]	265.67 A-G[2/]
ECO 006	0.68	2.64	80.00 A-D	265.00 A-G
ECO 008	0.68	2.61	83.33 A-C	274.00 A-E
RFI 001	0.58	2.67	73.33 A-F	239.67 A-K
CGO 001	0.72	2.59	80.00 A-D	264.67 A-G
CGO 005	0.67	2.59	86.67 A-B	284.67 A-C
CGO 024	0.73	2.70	80.00 A-D	274.67 A-E
EGO 002	0.71	2.64	76.67 A-E	256.33 A-H
RGO 001	0.79	2.18	83.33 A-C	245.00 A-J
SSGO 004	0.59	2.74	83.33 A-C	276.67 A-D
SSGO 007	0.82	2.65	76.67 A-E	267.67 A-F
SSGO 010	0.71	2.75	73.33 A-F	253.67 A-I
ERO 001	0.76	2.28	83.33 A-C	254.00 A-I
SSFI 001	0.77	2.50	73.33 A-F	239.33 A-K
SSFI 007	0.74	2.92	83.33 A-C	307.67 A
SSFI 008	0.73	2.40	73.33 D-I	225.33 B-L
SSFICO 006	0.68	2.43	76.67 A-E	237.67 A-K
SSRO 002	0.69	2.38	70.00 A-G	217.33 B-M
Control (healthy)	0.74	2.65	90.00 A	293.80 A-B

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 30 ต้น (n=30)

[2/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: สายพันธุ์ที่มีผลทางลบกับการทดสอบไม่ถูกแสดงผลไว้ที่นี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าการเจริญเติบโต และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า (seedling vigor index) ของพืชทดสอบที่ใส่แบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	ค่าการเจริญเติบโต[1/]			ดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า
	ลำต้น (ซม.)	ราก (ซม.)	การงอก (%)	
CCO 011	0.72	2.83	93.33 A-C[2/]	332.00 A-G[2/]
ECO 009	0.83	2.48	90.00 A-D	296.00 B-M
ECO 012	0.66	2.82	96.67 A-B	338.33 A-E
ECO 013	0.96	2.41	76.67 D-H	259.00 D-W
ECO 017	0.96	2.75	83.33 B-F	307.33 B-K
RCO 010	0.67	2.47	83.33 B-F	262.67 D-W
RCO 017	0.79	2.77	93.33 A-C	332.00 A-G
RCO 018	0.81	2.56	76.67 D-H	261.33 D-W
RCO 019	0.86	3.28	93.33 A-C	386.00 A-B
RCO 020	0.78	2.48	83.33 B-F	269.73 D-U
RCO 021	1.03	2.68	76.67 D-H	286.00 C-R
RCO 023	0.83	3.49	93.33 A-C	402.00 A
ERC 034	0.63	2.87	80.00 C-G	279.67 C-S
ERC 039	0.73	2.71	76.67 D-H	265.58 D-W
ERC 048	0.96	2.52	76.67 D-H	267.33 D-V
RRC 016	0.68	2.28	90.00 A-D	266.33 D-V
RRC 051	0.69	3.03	83.33 B-F	309.00 B-K
CRO 008	0.83	3.40	86.67 A-E	364.67 A-C
CRO 009	0.65	2.41	83.33 B-F	256.00 D-W
CRO 010	0.81	2.03	86.67 A-E	249.15 D-X
ERO 014	0.51	2.39	83.33 B-F	242.33 F-Y
ERO 018	0.87	2.82	83.33 B-F	312.33 B-J
RRO 006	0.66	2.37	76.67 D-H[2/]	235.00 H-Y
RRO 015	0.63	2.47	76.67 D-H	239.67 G-Y
SSMIX 001	0.65	2.58	96.67 A-B	315.00 A-J
SSMIX 002	0.62	2.58	83.33 B-F	267.33 D-V
SSMIX 003	0.60	2.21	90.00 A-D	253.00 D-X
SSMIX 004	0.67	2.71	86.67 A-E	293.67 C-O

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

ชื่อสายพันธุ์	ค่าการเจริญเติบโต[1/]				ดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า	
	ลำต้น (ซม.)	ราก (ซม.)	การงอก (%)			
SSMIX 005	0.81	2.33	96.67	A-B[2/]	302.67	B-L[2/]
SSMIX 006	0.65	2.05	86.67	A-E	235.00	H-Y
SSMIX 007	0.46	2.84	76.67	D-H	254.00	D-X
SSMIX 008	0.78	2.83	86.67	A-E	315.33	A-J
SSMIX 009	0.61	3.18	90.00	A-D	342.33	A-D
SSMIX 010	0.73	2.65	83.33	B-F	280.67	C-S
SSMIX 011	0.73	2.96	86.67	A-E	319.33	A-I
SSMIX 012	0.77	2.74	90.00	A-D	318.33	A-I
SSMIX 013	0.66	2.47	96.67	A-B	303.33	B-L
SSMIX 014	0.65	2.76	90.00	A-D	302.33	B-L
SSMIX 015	0.68	2.73	93.33	A-C	316.67	A-J
SSMIX 016	0.76	2.71	96.67	A-B	333.00	A-G
SSMIX 017	0.62	2.71	86.67	A-E	288.00	C-Q
SSMIX 018	0.55	2.83	90.00	A-D	306.67	B-K
SSMIX 019	0.72	2.70	86.67	A-E	295.67	B-N
SSMIX 020	0.55	2.78	83.33	B-F	276.33	C-T
SSMIX 021	1.14	2.40	96.67	A-B	339.33	A-D
SSMIX 022	0.76	2.47	90.00	A-D	290.67	C-P
SSMIX 023	0.57	2.92	93.33	A-C	325.67	A-H
SSMIX 024	0.70	2.62	100.00	A	332.00	A-G
SSMIX 025	0.84	2.61	96.67	A-B	335.67	A-F
SSMIX 026	0.83	1.97	86.67	A-E	245.33	E-Y
Control (healthy)	0.74	2.65	90.00	A-D	293.80	C-O

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 30 ต้น (n=30)

[2/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน โดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: สายพันธุ์ที่มีผลทางลบกับการทดสอบไม่ถูกแสดงผลไว้ที่นี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ค่าการเจริญเติบโต และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า (seedling vigor index) ของพืชทดสอบที่ใส่แบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากระบบ substrates

ชื่อสายพันธุ์	ค่าการเจริญเติบโต[1/]				ดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า	
	ลำต้น (ซม.)	ราก (ซม.)	การงอก (%)			
ECK 001	0.75	2.32	93.33	A-B[2/]	286.67	A-B[2/]
ECK 040	0.66	2.16	90.00	A-C	253.67	B-D
SSCK 049	0.85	2.84	86.67	A-C	320.67	A
CSC 003	0.78	2.15	93.33	A-B	275.00	A-C
ESC 009	0.77	2.31	90.00	A-C	277.00	A-C
ESC 010	0.68	2.27	96.67	A	284.67	A-B
Control (healthy)	0.74	2.65	90.00	A-C	293.80	A-B

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 30 ต้น (n=30)

[2/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน โดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: สายพันธุ์ที่มีผลทางลบกับการทดสอบไม่ถูกแสดงผลไว้ที่นี้

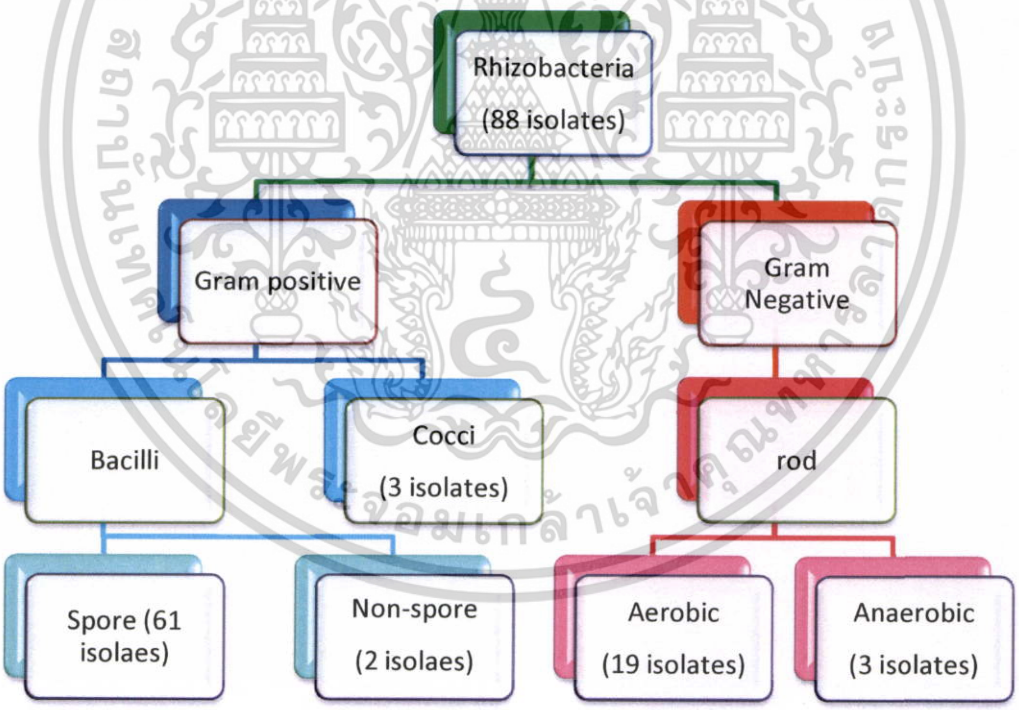
4.6 การทดสอบยืนยันความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากนั้นนำแบคทีเรียทั้งหมด 121 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งภายใต้ห้องปฏิบัติการอีกครั้งโดยเทคนิคการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (dual culture technique) แต่ในการทดสอบครั้งนี้จะใช้แบคทีเรียที่ทำการเก็บเป็นระยะเวลา 1 ปีในหลอด micro tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มี glycerol 25 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ -20 °C มาใช้ในการทดสอบโดยผลการทดสอบพบว่ามีแบคทีเรีย 88 สายพันธุ์ที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบข้างต้นไปดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในสภาพห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ (lab scale hydroponics)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโดยการปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ (lab scale hydroponics) ซึ่งพืชทดสอบคือ *L. sativa* L. การทดสอบจะปลูกพืชทดสอบในภาชนะบรรจุสารละลายธาตุอาหารพืช ทำการเติมสารละลายแบคทีเรียกับพืชทดสอบจำนวน 3 ครั้งคือ ครั้งที่หนึ่งคลุกเมล็ดปลูก ครั้งที่สอง ย้ายต้นกล้าลงภาชนะปลูก และครั้งที่สาม ก่อนการปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* เป็นเวลา 3 วัน หลังจากปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* ทำการบันทึกค่าความรุนแรงของการเกิดโรค น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของพืชทดสอบ ก่อนนำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติจากนั้นทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียทดสอบตามการติดสีแกรม และลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการคือรูปร่างเป็น bacilli, rod หรือ cocci รวมไปถึงการสร้าง spore ซึ่งจากการจัดกลุ่มนี้สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่คาดว่ามีศักยภาพดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 การจัดกลุ่มตามการติดสีแกรม และคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คาดว่าจะมีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากจัดกลุ่มแล้วนำค่าความรุนแรงของการเกิดโรค มาคำนวนหาค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรค นำค่าที่คำนวนได้รวมทั้งค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติเพื่อคัดกรองแบคทีเรียให้ได้ในขั้นตอนนี้จำนวน 30 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกต้องให้ค่าที่เทียบเท่ากันทางสถิติกับกลุ่มการทดลองควบคุม (healthy control) แบคทีเรียจำนวน 30 สายพันธุ์ ได้มาจาก

กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง bacilli ที่สร้างสปอร์ 18 สายพันธุ์ซึ่งในกลุ่มนี้มีสายพันธุ์ที่ให้ค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำที่สุดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์คือ RFI 001 และ SSMIX 020 ส่วนสายพันธุ์ที่ให้ค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ EWC 060 โดยมีค่าเท่ากับ 582.05 และ 26.60 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง bacilli ที่ไม่สร้างสปอร์ 2 สายพันธุ์ซึ่งในกลุ่มนี้ไม่พบสายพันธุ์ที่ให้ค่าดัชนีการเกิดโรคน้อยกว่าหรือเท่ากับกลุ่มการทดลองควบคุม (healthy) และ สายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดคือ SSWC 108 โดยมีค่าเท่ากับ 17.73 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง cocci 1สายพันธุ์ซึ่งในกลุ่มนี้ไม่พบสายพันธุ์ที่ให้ค่าดัชนีการเกิดโรคน้อยกว่าหรือเท่ากับกลุ่มการทดลองควบคุม (healthy) และ สายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดคือ CWC 085 โดยมีค่าเท่ากับ 18.60 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง rod (anaerobic) 3 สายพันธุ์ซึ่งในกลุ่มนี้ไม่พบสายพันธุ์ที่ให้ค่าดัชนีการเกิดโรคน้อยกว่าหรือเท่ากับกลุ่มการทดลองควบคุม (healthy) และ สายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดคือ EWC 080 โดยมีค่าเท่ากับ 20.67 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12)

กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง rod (aerobic) 6 สายพันธุ์ซึ่งสายพันธุ์ที่ให้ค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำที่สุดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์คือ ECO 008 ส่วนสายพันธุ์ที่ถูกเลือกและให้ค่าน้ำหนักสดสูงสุดคือ SSWC 110 โดยมีค่าเท่ากับ 495.16 มิลลิกรัม และน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ SSWC 112 โดยมีค่าเท่ากับ 25.9 มิลลิกรัมตามลำดับ (ตารางที่ 4.13)

จากนั้นนำตัวแทนของแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มที่เรียงลำดับศักยภาพจากมากไปน้อยจำนวน 30 สายพันธุ์ ในการคัดเลือกแบบนี้คาดว่าจะได้ชนิดของแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย ซึ่งจากการคัดเลือก 30 สายพันธุ์ได้แบคทีเรียดังนี้คือ ECK 001, CK 007, CWC 070, CWC 085, ECK 001, ECO 001, ECO 008, ERO 001, EWC 060, EWC 064, EWC 065, RCO 010, RCO 017, RCO 023, RFI 001, RWC 021, SSFI 007, SSFICO 006, SSMIX 003, SSMIX 005, SSMIX 006, SSMIX 007, SSMIX 013, SSMIX 019, SSMIX 020, SSMIX 022, SSMIX 023, SSMIX 025, SSWC 110 และ SSWC 112 จากนั้นนำแบคทีเรียทั้งหมด 30 สายพันธุ์ไปทำการทดสอบในขั้นต่อไป (ภาพที่ 4.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง bacilli ที่สร้างสปอร์ในการยับยั้งเชื้อโดยปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ

ชื่อสายพันธุ์	ดัชนีการเกิดโรค (%)	ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต	
		น้ำหนักสด (มก.)	น้ำหนักแห้ง (มก.)
CGO 005	40.00 C-H[1/]	377.60 A-F[1/]	21.07 A-D[1/]
CK 007	15.00 A-D	480.58 A-C	17.90 A-H
CPM 004	50.00 E-J	299.13 B-H	14.33 A-J
CRO 008	90.00 L-N	79.48 H-J	4.53 H-K
CSC 003	50.00 E-J	217.60 C-J	10.08 C-K
ECK 001	10.00 A-C	373.53 A-F	17.25 A-I
ECO 001	35.00 B-H	301.08 B-H	14.90 A-J
ECO 006	40.00 C-H	292.73 B-I	13.60 A-J
ECO 009	66.67 H-M	269.60 B-I	13.17 A-J
ECO 012	73.33 I-N	256.90 B-J	12.63 B-J
ECO 017	86.67 K-N	80.13 H-J	5.33 F-K
EGO 002	80.00 J-N	123.60 E-J	6.23 E-K
ERO 001	5.00 A-B	456.28 A-D	23.28 A-C
ERO 014	73.33 I-N	307.50 A-H	14.40 A-J
ESC 009	45.00 D-I	388.98 A-E	21.00 A-D
ESC 010	50.00 E-J	229.10 C-J	11.48 B-K
EWC 047	73.33 I-N	198.00 D-J	10.83 C-K
EWC 053	45.00 D-I	447.60 A-D	21.90 A-D
EWC 060	5.00 A-B	582.05 A	26.53 A
EWC 064	15.00 A-D	349.08 A-H	21.55 A-D
EWC 065	25.00 A-F	311.55 A-H	14.83 A-J
EWC 066	60.00 G-L	513.40 A-B	26.60 A
EWC 132	93.33 M-N	104.07 F-J	4.87 G-K
EWC 133	66.67 H-M	205.10 C-J	9.60 D-K
RCO 008	53.33 F-J	248.10 B-J	13.03 B-J
RCO 010	10.00 A-C	271.18 B-I	16.45 A-I
RCO 020	46.67 E-I	484.83 A-C	23.20 A-C
RCO 023	40.00 C-H	385.83 A-E	18.10 A-G
RFI 001	0.00 A	514.18 A-B	26.50 A
RK 001	40.00 C-H	311.08 A-H	14.05 A-J
RRO 006	45.00 D-I	268.25 B-J	13.05 B-J

เอกสารนี้เป็นที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

ชื่อสายพันธุ์	ดัชนีการเกิดโรค (%)		ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต			
			น้ำหนักสด (มก.)		น้ำหนักแห้ง (มก.)	
RWC 021	15.00	A-D[1/]	472.45	A-D[1/]	23.50	A-C[1/]
RWC 029	75.00	I-N	24.10	I-J	2.20	J-K
RWC 031	60.00	G-L	311.67	A-H	14.80	A-J
RWC 033	66.67	H-M	479.87	A-D	24.53	A-B
RWC 036	60.00	G-L	358.93	A-G	15.87	A-I
RWC 045	80.00	J-N	413.77	A-D	22.80	A-D
SSCK 049	66.67	H-M	358.00	A-G	18.97	A-E
SSFI 001	45.00	D-I	350.75	A-H	14.50	A-J
SSFI 007	25.00	A-F	445.13	A-D	19.65	A-D
SSFI 008	66.67	H-M	386.37	A-E	18.47	A-F
SSFICO 006	10.00	A-C	327.88	A-H	15.43	A-J
SSGO 004	60.00	G-L	437.47	A-D	21.57	A-D
SSMIX 001	73.33	I-N	267.80	B-J	13.00	B-J
SSMIX 002	66.67	H-M	226.33	C-J	11.93	B-K
SSMIX 003	5.00	A-B	316.08	A-H	17.58	A-I
SSMIX 004	55.00	F-K	285.35	B-I	13.58	A-J
SSMIX 006	35.00	B-H	315.33	A-H	14.33	A-J
SSMIX 007	20.00	A-E	306.63	A-H	16.75	A-I
SSMIX 009	66.67	H-M	252.63	B-J	13.03	B-J
SSMIX 013	5.00	A-B	438.28	A-D	21.83	A-D
SSMIX 016	53.33	F-J	289.43	B-I	14.80	A-J
SSMIX 018	45.00	D-I	421.30	A-D	17.70	A-I
SSMIX 019	30.00	A-G	378.50	A-F	20.75	A-D
SSMIX 020	0.00	A	358.13	A-G	16.08	A-I
SSMIX 021	66.67	H-M	260.53	B-J	15.10	A-J
SSMIX 023	5.00	A-B	407.68	A-D	17.15	A-I
SSMIX 024	46.67	E-I	90.13	G-J	4.50	I-K
SSMIX 026	73.33	I-N	428.77	A-D	21.47	A-D
SSRO 002	80.00	J-N	95.33	G-J	6.23	E-K
SSWC 115	66.67	H-M	248.17	B-J	12.40	B-K
CONTROL (inoculation)	100.00	N	0.00	J	0.00	K
CONTROL (healthy)	0.00	A	414.70	A-D	17.33	A-I

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: แถบสีเข้มที่ปรากฏในตารางหมายถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกเลือกนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง bacilli ที่ไม่สร้างสปอร์ในการยับยั้งเชื้อโดยปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ

ชื่อสายพันธุ์	ดัชนีการเกิดโรค (%)	ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต	
		น้ำหนักสด (มก.)	น้ำหนักแห้ง (มก.)
SSMIX 005	30.00 B[1/]	334.40 A[1/]	16.03 A[1/]
SSWC 108	53.33 C	351.63 A	17.73 A
CONTROL (inoculation)	100.00 D	0.00 B	0.00 B
CONTROL (healthy)	0.00 A	414.70 A	17.33 A

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: แถบสีเข้มที่ปรากฏในตารางหมายถึงแบคทีเรียสายพันธ์ที่ถูกเลือกนำไปทดสอบต่อไป

ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง cocci ในการยับยั้งเชื้อโดยปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ

ชื่อสายพันธุ์	ดัชนีการเกิดโรค (%)	ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต	
		น้ำหนักสด (มก.)	น้ำหนักแห้ง (มก.)
SSMIX 011	60.00 B[1/]	361.00 A[1/]	17.63 A[1/]
CWC 085	5.00 A	387.38 A	18.60 A
SSMIX 012	53.33 B	348.47 A	18.60 A
CONTROL (inoculation)	100.00 C	0.00 B	0.00 B
CONTROL (healthy)	0.00 A	414.70 A	17.33 A

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: แถบสีเข้าที่ปรากฏในตารางหมายถึงแบคทีเรียสายพันธ์ที่ถูกเลือกนำไปทดสอบต่อไป

ตารางที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง rod (anaerobic) ในการยับยั้งเชื้อโดยปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ

ชื่อสายพันธุ์	ดัชนีการเกิดโรค (%)	ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต	
		น้ำหนักสด (มก.)	น้ำหนักแห้ง (มก.)
CGO 024	53.33 B[1/]	374.87 A[1/]	19.34 A[1/]
CWC 070	60.00 B	345.77 A	18.57 A
EWC 080	53.33 B	341.60 A	20.67 A
CONTROL (inoculation)	100.00 C	0.00 B	0 B
CONTROL (healthy)	0 A	414.70 A	17.325 A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: แถบสีเข้มที่ปรากฏในตารางหมายถึงแบคทีเรียสายพันธ์ที่ถูกเลือกนำไปทดสอบต่อไป

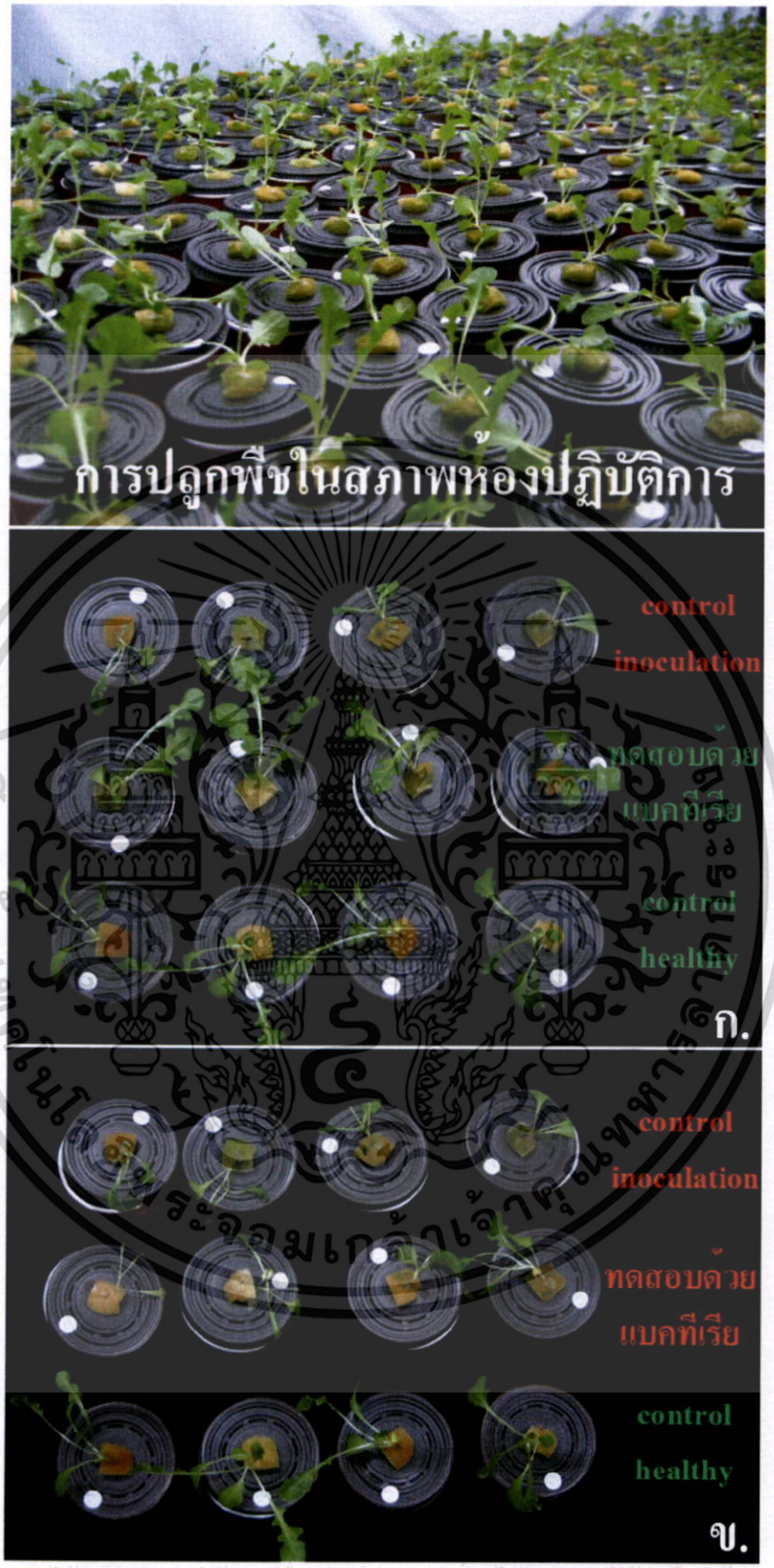
ตารางที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง rod (aerobic) ในการยับยั้งเชื้อโดยปลูกพืชในห้องปฏิบัติการ

ชื่อสายพันธุ์	ดัชนีการเกิดโรค (%)	ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต	
		น้ำหนักสด (มก.)	น้ำหนักแห้ง (มก.)
CK 009	53.33 D-F[1/]	365.53 A-E[1/]	17.20 A-F[1/]
CPM 003	73.33 F-G	268.60 B-F	16.23 A-F
CPM 010	60.00 E-F	223.87 D-F	12.37 C-F
CWC 079	86.67 G-H	122.33 F-G	6.43 F-G
ECK 040	75.00 F-G	159.08 E-G	7.93 E-G
ECO 008	0.00 A	423.98 A-D	20.68 A-D
RCO 017	10.00 A-B	364.60 A-E	18.00 A-F
RGO 001	86.67 G-H	137.57 E-G	7.77 E-G
RRO 015	60.00 E-F	293.93 A-F	17.47 A-F
RWC 025	53.33 D-F	420.37 A-D	23.80 A-C
RWC 102	66.67 F-G	201.27 D-G	9.57 D-G
SSMIX 022	5.00 A-B	243.85 C-F	12.88 B-F
SSMIX 025	20.00 A-C	474.15 A-C	24.88 A-B
SSWC 109	40.00 C-E	512.35 A	24.45 A-C
SSWC 110	25.00 A-C	495.13 A-B	22.28 A-C
SSWC 112	5.00 A-B	471.03 A-C	25.90 A
SSWC 114	40.00 C-E	365.13 A-E	17.10 A-F
SSWC 117	30.00 B-D	425.48 A-D	19.10 A-E
SSWC 122	55.00 D-F	337.45 A-F	19.23 A-E
CONTROL (inoculation)	100.00 H	0.00 G	0.00 G
CONTROL (healthy)	0.00 A	414.70 A-D	17.33 A-F

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: แถบสีเข้มที่ปรากฏในตารางหมายถึงแบคทีเรียสายพันธ์ที่ถูกเลือกนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโดยการปลูกพืช *Lactuca sativa* ในห้องปฏิบัติการ โดยที่ ก = ตัวอย่างที่ใส่แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือก และ ข = ตัวอย่างที่ใส่แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ถูกคัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ solution culture

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชแบบ solution culture โดยการปลูกพืชทดสอบภายในภาชนะปลูกที่มีสารละลายธาตุอาหารพืช และทำการเติมอากาศลงไปในระบบ ซึ่งพืชทดสอบที่ใช้คือ *L. sativa* L. cv. Butter head และมีการใส่แบคทีเรียให้กับพืชจำนวน 3 ครั้งคือ ครั้งที่หนึ่งคลุกเมล็ดปลูก ครั้งที่สอง ย้ายต้นกล้าลงภาชนะปลูก และครั้งที่สาม ก่อนการปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* เป็นเวลา 3 วัน หลังจากปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* ทำการบันทึกผลความรุนแรงของการเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* เป็นเวลา 5 วัน บันทึกผลน้ำหนักสด-แห้งของรากและลำต้น ความกว้างทรงพุ่ม และจำนวนใบพืชทดสอบ ในวันที่ 5 หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค จากนั้นนำค่าความรุนแรงของการเกิดโรคไปคำนวนหาค่าดัชนีการเกิดโรค และ เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่า แล้วนำไปวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติตามตารางที่ 4.14 และ ตารางที่ 4.15 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าทุกวันที่ทำการบันทึกผลแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์คือ ERO 001, RCO 010, SSMIX 013, SSMIX 025 และ SSWC 110 สามารถควบคุมโรครากเน่าได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบอาการของโรครากเน่าตลอดระยะเวลาที่เก็บข้อมูล นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียอีกจำนวน 14 สายพันธุ์ ได้แก่ CK 007, ECK 001, ECO 001, ECO 008, EWC 060, EWC 064, EWC 065, RFI 001, RWC 021, SSFI 007, SSFICO 006, SSMIX 019, SSMIX 020, และ SSMIX 023 ให้ค่าดัชนีความรุนแรงการเกิดโรค และ เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่าที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มการทดลองควบคุมที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ *Py. myriotylum*

เมื่อพิจารณา ค่าเฉลี่ยความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งต้น และ น้ำหนักแห้งราก โดยวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติตามตารางที่ 4.16 พบว่ามีแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ คือ ECO 008, ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025 และ SSWC 110 ให้ผลในทุกๆค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มการทดลองควบคุมที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* อีกทั้งแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ข้างต้นยังให้ค่าดัชนีการเกิดโรค และ เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่าเป็นไปในทางที่ดีอีกด้วย จึงทำการเลือกแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ข้างต้นไปทำการศึกษา และทำการจัดจำแนกในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 4.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรคในการยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ solution culture

ชื่อสายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยดัชนีเกิดโรค (%)					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
CGO 005	0 A[1/]	25 BC	35 D-G	35 C-G	50 E-G	55 C-E
CK 007	0 A	0 A	5 AB	15 A-D	15 A-D	15 A-C
CWC 070	0 A	5 A	45 E-G	50 E-G	55 FG	55 C-E
CWC 085	0 A	20 B	30 C-F	30 B-F	30 A-F	30 A-E
ECK 001	0 A	0 A	10 A-C	15 A-D	25 A-F	30 A-E
ECO 001	0 A	5 A	15 A-D	15 A-D	15 A-D	20 A-D
ECO 008	0 A	5 A	5 AB	5 AB	5 AB	5 AB
ERO 001	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
EWC 060	0 A	5 A	20 A-D	25 A-E	30 A-F	40 A-E
EWC 064	0 A	0 A	0 A	0 A	5 AB	15 A-C
EWC 065	0 A	0 A	0 A	0 A	5 AB	10 AB
RCO 010	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
RCO 017	0 A	5 A	25 B-E	40 D-G	40 C-G	55 C-E
RCO 023	0 A	25 BC	25 B-E	25 A-E	45 D-G	55 C-E
RFI 001	0 A	5 A	10 A-C	10 A-C	10 A-C	20 A-D
RWC 021	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	5 AB
SSFI 007	0 A	5 A	5 AB	10 A-C	20 A-E	35 A-E
SSFICO 006	0 A	0 A	10 A-C	15 A-D	25 A-F	30 A-E
SSMIX 003	5 B	5 A	10 A-C	10 A-C	20 A-E	40 A-E
SSMIX 005	0 A	25 BC	30 C-F	30 B-F	35 B-G	40 A-E
SSMIX 006	0 A	25 BC	10 A-C	15 A-D	40 C-G	45 B-E
SSMIX 007	0 A	35 C	50 FG	55 FG	55 FG	60 DE
SSMIX 013	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
SSMIX 019	0 A	0 A	10 A-C	10 A-C	10 ABC	15 A-C
SSMIX 020	0 A	0 A	5 AB	5 AB	5 AB	5 AB
SSMIX 022	0 A	25 BC	35 D-G	30 B-F	40 C-G	40 A-E
SSMIX 023	0 A	0 A	5 AB	5 AB	10 A-C	10 AB
SSMIX 025	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
SSWC 110	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
SSWC 112	0 A	20 B	25 B-E	25 A-E	25 A-F	25 A-D
CONTROL (healthy)	0 A	0 A	5 AB	0 A	15 A-D	20 A-D
CONTROL (inoculation)	0 A	35 C	55 G	60 G	65 G	70 E

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: แถบสีเข้มที่ปรากฏในตารางหมายถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกเลือกนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ค่าเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Py. myriotylum* โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ solution culture

ชื่อสายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรค (%)									
	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3		วันที่ 4		วันที่ 5	
CGO 005	28.57	BC[1/]	36.36	D-F	41.67	C-F	23.08	EF	21.43	CD
CK 007	100.00	A	90.91	AB	75.00	A-D	76.92	A-D	78.57	A-C
CWC 070	85.71	A	18.18	EF	16.67	EF	15.38	F	21.43	CD
CWC 085	42.86	B	45.45	C-F	50.00	B-F	53.85	A-F	57.14	A-D
ECK 001	100.00	A	81.82	ABC	75.00	A-D	61.54	A-F	57.14	A-D
ECO 001	85.71	A	72.73	A-D	75.00	A-D	76.92	A-D	71.43	A-D
ECO 008	85.71	A	90.91	AB	91.67	AB	92.31	AB	92.86	AB
ERO 001	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A
EWC 060	85.71	A	63.64	A-D	58.33	A-E	53.85	A-F	42.86	A-D
EWC 064	100.00	A	100.00	A	100.00	A	92.31	AB	78.57	A-C
EWC 065	100.00	A	100.00	A	100.00	A	92.31	AB	85.71	AB
RCO 010	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A
RCO 017	85.71	A	54.55	B-E	33.33	D-F	38.46	C-F	21.43	CD
RCO 023	28.57	BC	54.55	B-E	58.33	A-E	30.77	D-F	21.43	CD
RFI 001	85.71	A	81.82	A-C	83.33	A-C	84.62	A-C	71.43	A-D
RWC 021	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	92.86	AB
SSFI 007	85.71	A	90.91	AB	83.33	A-C	69.23	A-E	50.00	A-D
SSFICO 006	100.00	A	81.82	A-C	75.00	A-D	61.54	A-F	57.14	A-D
SSMIX 003	85.71	A	81.82	A-C	83.33	A-C	69.23	A-E	42.86	A-D
SSMIX 005	28.57	BC	45.45	C-F	50.00	B-F	46.15	B-F	42.86	A-D
SSMIX 006	28.57	BC	81.82	A-C	75.00	A-D	38.46	C-F	35.71	B-D
SSMIX 007	0.00	C	9.09	F	8.33	F	15.38	F	14.29	D
SSMIX 013	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A
SSMIX 019	100.00	A	81.82	A-C	83.33	A-C	84.62	A-C	78.57	A-C
SSMIX 020	100.00	A	90.91	AB	91.67	AB	92.31	AB	92.86	AB
SSMIX 022	28.57	BC	36.36	D-F	50.00	B-F	38.46	C-F	42.86	A-D
SSMIX 023	100.00	A	90.91	AB	91.67	AB	84.62	A-C	85.71	AB
SSMIX 025	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A
SSWC 110	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A	100.00	A
SSWC 112	42.86	B	54.55	B-E	58.33	A-E	61.54	A-F	64.29	A-D
CONTROL (healthy)	100.00	A	90.91	AB	100.00	A	76.92	A-D	71.43	A-D

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: แถบสีเข้มที่ปรากฏในตารางหมายถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกเลือกนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ค่าการเจริญเติบโตของพืชทดสอบในการควบคุมเชื้อ *Py. myriotylum* โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ solution culture

ชื่อสายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต													
	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)		จำนวนใบ (ใบ)		ความยาวราก (ซม.)		น้ำหนักสดต้น (ก.)		น้ำหนักสดราก (ก.)		น้ำหนักแห้งต้น (มก.)		น้ำหนักแห้งราก (มก.)	
CGO 005	16.86	AD[y]	16.20	AB	23.78	A-C	32.58	A-D	6.21	A-G	1735.08	A-C	175.82	B-G
CK 007	20.06	A-C	16.00	A-B	28.22	A-C	43.42	A-D	6.79	A-G	1574.40	B-C	194.54	B-G
CWC 070	17.77	A-D	13.00	AB	18.66	C	31.77	A-D	5.81	A-G	1748.26	A-C	242.90	A-G
CWC 085	20.66	A-C	17.80	AB	25.61	A-C	40.22	A-D	6.31	A-G	1709.10	A-C	155.74	D-G
ECK 001	16.86	A-D	15.20	AB	23.34	A-C	33.89	A-D	7.38	A-G	1185.04	BC	142.88	D-G
ECO 001	17.43	A-D	12.40	AB	21.24	BC	40.21	A-D	7.96	A-G	1546.50	A-C	201.68	B-G
ECO 008	20.32	A-C	18.60	AB	29.04	A-C	56.49	AB	9.39	A-E	2569.02	A-C	239.20	A-G
ERO 001	19.18	A-C	18.80	AB	36.38	A	56.45	AB	10.13	A-C	2388.50	A-C	273.16	A-F
EWC 060	13.50	B-D	12.80	AB	26.64	A-C	43.68	A-D	6.82	A-G	1383.66	BC	177.48	B-G
EWC 064	21.77	AB	18.80	AB	28.92	A-C	39.53	A-D	6.39	A-G	1290.20	BC	163.12	C-G
EWC 065	18.89	A-C	19.80	A	29.32	A-C	45.07	A-D	9.15	A-E	1580.36	BC	230.02	B-G
RCO 010	21.65	AB	18.20	AB	33.56	AB	58.76	A	10.57	A	2647.82	AB	290.10	A-D
RCO 017	8.78	D	10.60	B	17.50	C	26.62	B-D	4.63	E-G	1255.32	BC	137.46	E-G
RCO 023	18.15	A-D	17.20	AB	22.46	A-C	32.66	A-D	5.61	B-G	1505.96	BC	151.54	D-G
RFI 001	18.02	A-D	14.80	AB	25.48	A-C	53.13	A-C	9.07	A-E	1780.94	A-C	291.68	A-D
RWC 021	20.65	A-C	18.80	AB	29.46	A-C	56.64	A	9.51	A-D	2340.24	A-C	285.94	A-E
SSFI 007	18.07	A-D	18.40	AB	23.06	A-C	35.72	A-D	6.43	A-G	1254.14	BC	151.90	D-G
SSFICO 006	19.73	A-C	17.20	AB	23.88	A-C	36.16	A-D	5.26	D-G	1273.90	BC	148.72	D-G
SSMIX 003	15.92	A-D	15.20	AB	18.48	C	24.95	CD	4.21	FG	1437.64	BC	138.58	E-G
SSMIX 005	14.64	A-D	12.20	AB	22.10	A-C	32.44	A-D	5.15	D-G	2332.36	A-C	191.18	B-G
SSMIX 006	16.83	A-D	14.40	AB	18.24	C	36.70	A-D	6.55	A-G	1106.22	C	129.64	FG
SSMIX 007	15.13	A-D	13.80	AB	21.38	BC	34.37	A-D	5.49	C-G	1755.78	BC	186.84	B-G
SSMIX 013	21.61	AB	19.00	AB	31.18	A-C	58.16	A	10.46	AB	2267.58	A-C	322.88	AB
SSMIX 019	21.73	AB	19.00	AB	34.72	AB	59.11	A	9.93	A-D	2483.20	A-C	192.82	B-G
SSMIX 020	19.65	A-C	18.80	AB	27.52	A-C	55.46	AB	9.28	A-E	2278.06	A-C	310.72	A-C
SSMIX 022	21.69	AB	18.00	AB	28.30	A-C	45.49	A-D	9.02	A-F	1836.14	A-C	227.20	B-G
SSMIX 023	20.49	A-C	19.40	AB	29.60	A-C	46.83	A-D	9.10	A-E	3179.66	A	377.74	A
SSMIX 025	22.66	AB	20.80	A	31.78	A-C	55.62	AB	9.42	A-E	2335.98	A-C	243.04	A-G
SSWC 110	24.16	A	19.60	A	29.32	A-C	60.51	A	9.10	A-E	1658.84	A-C	245.78	A-G
SSWC 112	18.94	A-C	18.00	AB	30.76	A-C	53.66	A-C	10.21	A-C	1491.08	BC	261.28	A-G
CONTROL (healthy)	16.59	A-D	13.80	AB	23.24	A-C	39.96	A-D	6.38	A-G	1399.14	BC	176.98	B-G
CONTROL (inoculation)	11.24	CD	12.40	AB	17.26	C	18.78	D	3.75	G	1322.88	BC	115.30	G

[y] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

หมายเหตุ: แถบสีเข้มที่ปรากฏในตารางหมายถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกเลือกนำไปทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบอายุ 30 วันในการควบคุมเชื้อ *Py. myriotylum* โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกจากการปลูกพืชแบบ solution culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ Nutrient Film Technique

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าสาเหตุจากเชื้อ *Py. myriotylum* ในระบบปลูกพืชแบบ solution culture ข้างต้นได้แบคทีเรียจำนวน 10 สายพันธุ์มาทำการทดสอบการควบคุมโรคดังกล่าวในระบบ Nutrient Film Technique ซึ่งเป็นระบบที่ใกล้เคียงกับระบบปลูกพืชที่ใช้ทางการค้าที่ได้รับความนิยมระบบหนึ่งในประเทศไทย (ภาพที่ 4.14) โดยการทดสอบ 2 รอบปลูกพบว่า

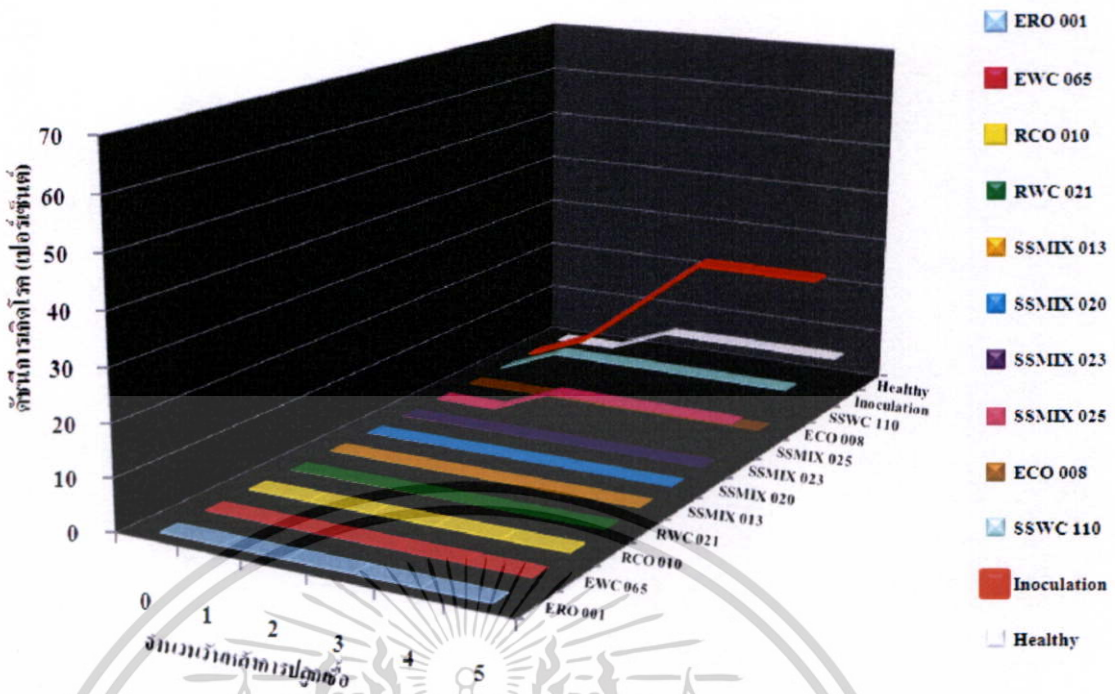
รอบปลูกที่ 1 แบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008, ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025 และ SSWC 110 สามารถทำให้ดัชนีการเกิดโรคในพืช *L. sativa* L. cv. Butter head และ *L. sativa* L. cv. Red coral ลดลง (ภาพที่ 4.15 ภาพที่ 4.16 ตามลำดับ) ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008, ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020 และ SSMIX 023 มีความสามารถในการควบคุมโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ นับตั้งแต่วันปลูกเชื้อจนถึงวันที่ 5 หลังจากการปลูกเชื้อโรครากเน่า และแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 025 และ SSWC 110 สามารถควบคุมโรครากเน่าได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5 หลังจากการปลูกเชื้อโรครากเน่า ทั้งในพืช *L. sativa* L. cv. Butter head และ *L. sativa* L. cv. Red coral ลดลง

รอบปลูกที่ 2 แบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008, ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025 และ SSWC 110 สามารถลดอัตราการเกิดโรครากเน่าในพืช *L. sativa* L. cv. Butter head และ *L. sativa* L. cv. Red coral (ภาพที่ 4.17 และ ภาพที่ 4.18 ตามลำดับ) และแบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001, RCO 010, RWC 021, SSMIX 020 และ SSMIX 023 มีความสามารถในการควบคุมโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ นับตั้งแต่วันปลูกเชื้อจนถึงวันที่ 5 หลังจากการปลูกเชื้อโรครากเน่า ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008, EWC 065, SSMIX 023, SSMIX 025 และ SSWC 110 สามารถควบคุมโรครากเน่าได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5 หลังจากการปลูกเชื้อโรครากเน่า ทั้งในพืช *L. sativa* L. cv. Butter head และ *L. sativa* L. cv. Red coral ลดลง

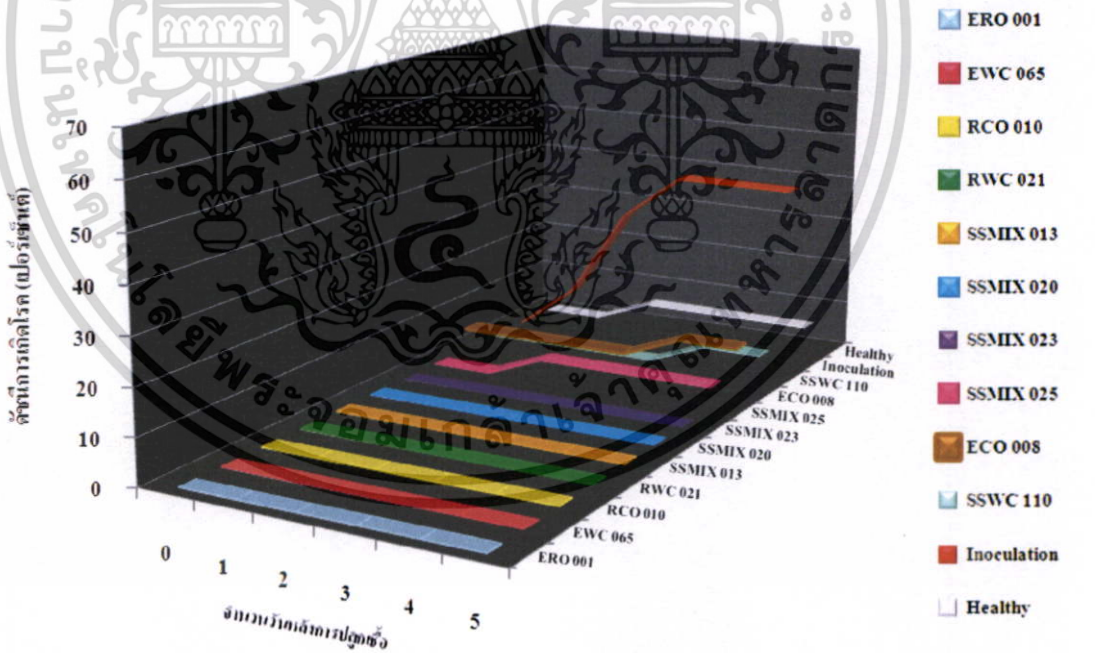
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.14 ระบบการปลูกพืชแบบ Nutrient Film Technique ที่ใช้ในการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

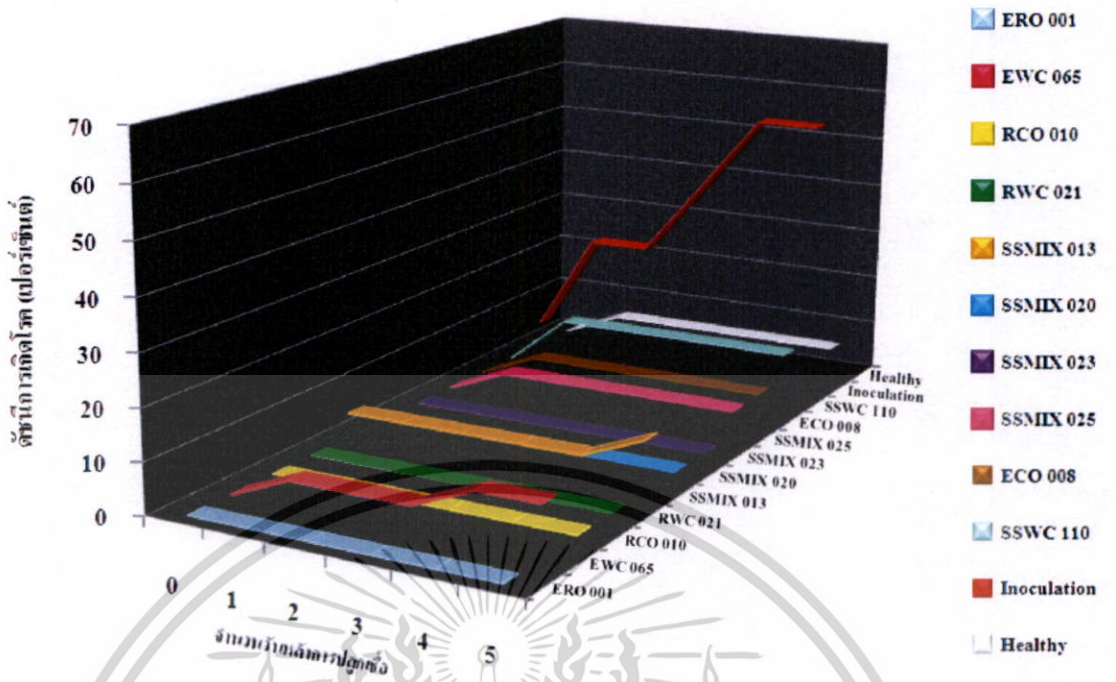


ภาพที่ 4.15 ค่าดัชนีการเกิดโรครากเน่า จากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *L. sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT ครั้งที่ 1

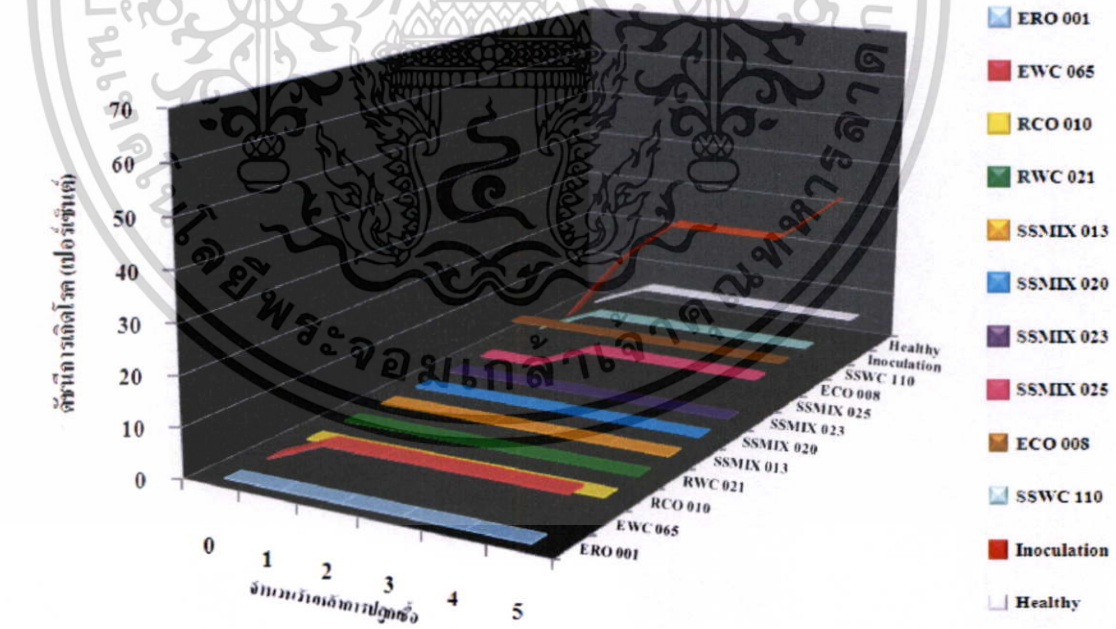


ภาพที่ 4.16 ค่าดัชนีการเกิดโรครากเน่า จากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *L. sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT ครั้งที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.17 ค่าดัชนีการเกิดโรครากเน่า จากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *L. sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT ครั้งที่ 2



ภาพที่ 4.18 ค่าดัชนีการเกิดโรครากเน่า จากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *L. sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT ครั้งที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.10 การศึกษากลไกในการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพด้วยวิธี agar disk diffusion

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยวิธี agar disk diffusion โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NB และ PDA โดยใช้ส่วนต่างๆของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแต่ละสายพันธุ์ คือ purified cell, purified sterile cell, cell–free culture filtrate และ cell culture โดยมีสารกำจัดเชื้อรา metalaxyl เป็นวิธีการเปรียบเทียบ แล้วนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ผลดังนี้

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร NB โดยบันทึกผลที่ 24 ชั่วโมง พบว่าส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ของทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสูงสุดเท่ากับ 72.00 และ 69.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) สูงที่สุดเท่ากับ 3.95 และ 3.74 เซนติเมตร ตามลำดับ รวมไปถึงผลในการยับยั้งที่ดีกว่าการใช้สาร metalaxyl ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 025, ECO 008 และ SSWC 110 พบว่าในส่วนของ cell culture ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสูงกว่าในส่วนของ purified cell แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองส่วนให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยน้อยกว่าการใช้สาร metalaxyl (ตารางที่ 4.17)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร NB โดยบันทึกผลที่ 48 ชั่วโมง พบว่าส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ของทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 และ SSMIX 023 พบว่าในส่วนของ cell culture ให้ค่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 89.78 และ 78.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยังให้ผลในการยับยั้งที่ดีกว่าการใช้สาร metalaxyl ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 025 พบว่าในส่วนของ purified cell ให้ค่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 68.89 เปอร์เซ็นต์ และยังให้ผลในการยับยั้งที่ดีกว่าการใช้สาร metalaxyl จากประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 020 พบว่าส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงกว่าการใช้สาร metalaxyl โดยมีค่าเท่ากับ 69.78 และ 69.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ EWC 065 และ SSMIX 013 พบว่าส่วนของ cell culture, purified cell และ สาร metalaxyl ให้ค่าในการควบคุมไม่แตกต่างกันทางสถิติ แบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001, RWC 021, ECO 008 และ SSWC 110 พบว่าส่วนของ cell culture กับ สาร metalaxyl ให้ค่าในการควบคุมไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงค่าบริเวณการยับยั้งพบว่าแบคทีเรียสาย

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

พันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ cell culture ให้ค่าบริเวณยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 4.14 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.18)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร NB โดยบันทึกผลที่ 96 ชั่วโมง พบว่าส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ของทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ในส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงกว่าการใช้สาร metalaxyl โดยพบว่าสายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ purified cell ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 94.44 เปอร์เซ็นต์เมื่อพิจารณาถึงค่าบริเวณการยับยั้งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ cell culture ให้ค่าบริเวณยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 4.24 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.19)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร NB โดยบันทึกผลที่ 192 ชั่วโมง พบว่าส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ของทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ในส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงกว่าการใช้สาร metalaxyl ซึ่งสายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ purified cell ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 96.44 เปอร์เซ็นต์เมื่อพิจารณาถึงค่าบริเวณการยับยั้งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ cell culture ให้ค่าบริเวณยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 4.37 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.20, ภาพที่ 4.19)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร PDB โดยบันทึกผลที่ 24 ชั่วโมง พบว่าส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ของทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ส่วนของ purified cell และ cell culture ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสูงสุดเท่ากับ 83.20 และ 82.40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยังให้ค่าบริเวณยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 4.08 และ 3.91 เซนติเมตรตามลำดับ รวมไปถึงผลในการยับยั้งที่ดีกว่าการใช้สาร metalaxyl ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, SSMIX 020, SSMIX 025, ECO 008 และ SSWC 110 พบว่าในส่วนของ cell culture ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสูงกว่าในส่วนของ purified cell ในทางกลับกันสายพันธุ์ RWC 021 และ SSMIX 023 พบว่าในส่วนของ purified cell ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสูงกว่าในส่วนของ cell culture แต่ทั้งสองส่วนให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยน้อยกว่าการใช้สาร metalaxyl (ตารางที่ 4.21)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร PDB โดยบันทึกผลที่ 48 ชั่วโมง พบว่าส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ของทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 พบว่าในส่วนของ purified cell ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 91.56 เปอร์เซ็นต์ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสายพันธุ์ EWC 065, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 และ ECO 008 พบว่าทั้งในส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงกว่าการใช้สาร metalaxyl และทั้งสองส่วนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ข้างต้นยังให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงค่าบริเวณการยับยั้งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ cell culture ให้ค่าบริเวณยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 4.10 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.22)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร PDB โดยบันทึกผลที่ 96 ชั่วโมง พบว่าส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ทุกๆสายพันธุ์ของแบคทีเรียไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ในส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงกว่าการใช้สาร metalaxyl และทุกๆสายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้งในส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ผลที่ไม่แตกต่างทางสถิติยกเว้น ERO 001 ที่ในส่วนของ purified cell ให้ผลที่ดีและแตกต่างทางสถิติกับส่วนของ cell culture เมื่อพิจารณาถึงค่าบริเวณการยับยั้งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ cell culture ให้ค่าบริเวณยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 4.24 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.23)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร PDB โดยบันทึกผลที่ 192 ชั่วโมง พบว่าส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ทุกๆสายพันธุ์ของแบคทีเรียไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ cell culture ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 96.44 เปอร์เซ็นต์ และทุกสายพันธุ์ในการทดสอบพบว่าส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ค่าเปอร์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงกว่าการใช้สาร metalaxyl ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ EWC 065, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSWC 110 พบว่าในส่วนของ cell culture และ purified cell ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยไม่แตกต่างทางสถิติอีกด้วยซึ่งเมื่อพิจารณาถึงค่าบริเวณการยับยั้งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ purified cell ให้ค่าบริเวณยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 4.39 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.24, ภาพที่ 4.20)

ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพของแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ในอาหาร PDB มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Py. myriotylum* ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร NB และเมื่อวัดค่าที่ 96 ชั่วโมงทุกสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อดังกล่าวได้ผลดีกว่าการใช้สาร metalaxyl เมื่อพิจารณาในทุกสายพันธุ์พบว่าส่วน cell culture และ purified cell ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 24 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง	สายพันธุ์	กรรมวิธีทดสอบ									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum*	ERO 001	30.40	B [1/]	0.00	C	61.60	A	0.00	C	33.60	B
	EWC 065	46.40	B	0.00	C	62.40	A	0.00	C	48.80	B
	RCO 010	69.60	A	0.00	C	61.60	B	0.00	C	72.00	A
	RWC 021	31.20	C	0.00	D	62.40	A	0.00	D	40.00	B
	SSMIX 013	46.40	B	0.00	C	61.60	A	0.00	C	47.20	B
	SSMIX 020	44.80	B	0.00	C	62.40	A	0.00	C	47.20	B
	SSMIX 023	44.80	C	0.00	D	61.60	A	0.00	D	54.40	B
	SSMIX 025	44.80	B	0.00	C	62.40	A	0.00	C	44.80	B
	ECO 008	29.60	B	0.00	C	61.60	A	0.00	C	36.80	B
	SSWC 110	32.80	B	0.00	C	62.40	A	0.00	C	38.40	B
Inhibition zone (ซม.)	ERO 001	2.41		0.00		3.42		0.00		2.91	
	EWC 065	3.36		0.00		3.51		0.00		3.12	
	RCO 010	3.74		0.00		3.54		0.00		3.95	
	RWC 021	2.81		0.00		3.55		0.00		3.05	
	SSMIX 013	3.15		0.00		3.52		0.00		2.89	
	SSMIX 020	3.07		0.00		3.48		0.00		3.16	
	SSMIX 023	3.09		0.00		3.51		0.00		3.45	
	SSMIX 025	3.09		0.00		3.58		0.00		2.94	
	ECO 008	2.98		0.00		3.59		0.00		2.94	
	SSWC 110	2.80		0.00		3.56		0.00		2.93	

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 48 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง	สายพันธุ์	กรรมวิธีทดสอบ									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum*	ERO 001	60.89	B[1/]	0.00	C	65.78	A	0.00	C	66.67	A
	EWC 065	64.00	A	0.00	B	64.89	A	0.00	B	65.78	A
	RCO 010	82.67	B	0.00	D	65.33	C	0.00	D	89.78	A
	RWC 021	61.33	B	0.00	C	65.78	A	0.00	C	66.67	A
	SSMIX 013	65.78	A	0.00	B	66.22	A	0.00	B	65.33	A
	SSMIX 020	69.33	A	0.00	C	65.78	B	0.00	C	69.78	A
	SSMIX 023	68.89	B	0.00	C	66.22	B	0.00	C	78.22	A
	SSMIX 025	68.89	A	0.00	B	66.22	B	0.00	C	64.89	C
	ECO 008	57.33	B	0.00	C	65.33	A	0.00	C	64.44	A
	SSWC 110	58.22	B	0.00	C	65.78	A	0.00	C	65.33	A
Inhibition zone (ซม.)	ERO 001	2.40		0.00		3.13		0.00		2.99	
	EWC 065	3.22		0.00		3.19		0.00		2.99	
	RCO 010	3.81		0.00		3.24		0.00		4.14	
	RWC 021	2.80		0.00		3.25		0.00		3.05	
	SSMIX 013	3.05		0.00		3.24		0.00		2.77	
	SSMIX 020	3.07		0.00		3.18		0.00		3.14	
	SSMIX 023	3.08		0.00		3.23		0.00		3.53	
	SSMIX 025	3.08		0.00		3.29		0.00		2.84	
	ECO 008	2.97		0.00		3.29		0.00		2.93	
	SSWC 110	2.70		0.00		3.26		0.00		2.92	

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 96 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง	สายพันธุ์	กรรมวิธีทดสอบ									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum*	ERO 001	60.89	A[1/]	0.00	C	32.44	B	0.00	C	62.67	A
	EWC 065	71.11	A	0.00	C	32.44	B	0.00	C	71.56	A
	RCO 010	96.44	A	0.00	D	33.33	C	0.00	D	94.22	B
	RWC 021	61.33	B	0.00	D	32.89	C	0.00	D	67.56	A
	SSMIX 013	69.78	A	0.00	C	32.00	B	0.00	C	71.11	A
	SSMIX 020	69.33	A	0.00	C	32.44	B	0.00	C	69.78	A
	SSMIX 023	68.89	B	0.00	D	32.89	C	0.00	D	78.22	A
	SSMIX 025	68.89	A	0.00	D	32.89	C	0.00	D	60.89	B
	ECO 008	57.33	B	0.00	D	32.00	C	0.00	D	64.44	A
	SSWC 110	58.22	B	0.00	D	32.00	C	0.00	D	65.33	A
Inhibition zone (ซม.)	ERO 001	2.40		0.00		1.34		0.00		2.90	
	EWC 065	3.38		0.00		1.41		0.00		3.12	
	RCO 010	3.94		0.00		1.39		0.00		4.27	
	RWC 021	2.80		0.00		1.42		0.00		3.07	
	SSMIX 013	3.14		0.00		1.36		0.00		2.90	
	SSMIX 020	3.07		0.00		1.36		0.00		3.14	
	SSMIX 023	3.08		0.00		1.40		0.00		3.53	
	SSMIX 025	3.08		0.00		1.37		0.00		2.75	
	ECO 008	2.97		0.00		1.38		0.00		2.93	
	SSWC 110	2.70		0.00		1.43		0.00		2.92	

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 192 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง	สายพันธุ์	กรรมวิธีทดสอบ									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum*	ERO 001	60.89	B[1/]	0.00	C	0.00	C	0.00	C	62.67	A
	EWC 065	73.78	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	65.78	B
	RCO 010	96.44	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	94.22	B
	RWC 021	61.33	B	0.00	C	0.00	C	0.00	C	67.56	A
	SSMIX 013	71.11	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	65.33	B
	SSMIX 020	69.33	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	69.78	A
	SSMIX 023	68.89	B	0.00	C	0.00	C	0.00	C	78.22	A
	SSMIX 025	68.89	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	60.89	B
	ECO 008	57.33	B	0.00	C	0.00	C	0.00	C	64.44	A
	SSWC 110	58.22	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	65.33	A
Inhibition zone (ซม.)	ERO 001	2.40		0.00		0.00		0.00		2.90	
	EWC 065	3.44		0.00		0.00		0.00		2.99	
	RCO 010	4.37		0.00		0.00		0.00		4.27	
	RWC 021	2.80		0.00		0.00		0.00		3.07	
	SSMIX 013	3.17		0.00		0.00		0.00		2.77	
	SSMIX 020	3.07		0.00		0.00		0.00		3.14	
	SSMIX 023	3.08		0.00		0.00		0.00		3.53	
	SSMIX 025	3.08		0.00		0.00		0.00		2.75	
	ECO 008	2.97		0.00		0.00		0.00		2.93	
	SSWC 110	2.70		0.00		0.00		0.00		2.92	

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 24 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง	สายพันธุ์	กรรมวิธีทดสอบ									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum*	ERO 001	39.20	C[1/]	0.00	D	61.60	A	0.00	D	49.60	B
	EWC 065	51.20	B	0.00	C	60.80	A	0.00	C	53.60	B
	RCO 010	83.20	A	0.00	C	60.80	B	0.00	C	82.40	A
	RWC 021	56.00	B	0.00	C	61.60	A	0.00	C	52.80	B
	SSMIX 013	50.40	B	0.00	C	57.60	A	0.00	C	50.40	B
	SSMIX 020	52.00	B	0.00	C	59.20	A	0.00	C	52.80	B
	SSMIX 023	52.80	B	0.00	C	59.20	A	0.00	C	50.40	B
	SSMIX 025	46.40	C	0.00	D	61.60	A	0.00	D	51.20	B
	ECO 008	40.80	B	0.00	C	60.80	A	0.00	C	41.60	B
	SSWC 110	41.60	B	0.00	C	60.00	A	0.00	C	42.40	B
Inhibition zone (ซม.)	ERO 001	2.52		0.00		3.42		0.00		3.11	
	EWC 065	3.42		0.00		3.49		0.00		3.18	
	RCO 010	3.91		0.00		3.53		0.00		4.08	
	RWC 021	3.12		0.00		3.54		0.00		3.21	
	SSMIX 013	3.20		0.00		3.47		0.00		2.93	
	SSMIX 020	3.16		0.00		3.44		0.00		3.23	
	SSMIX 023	3.19		0.00		3.48		0.00		3.40	
	SSMIX 025	3.11		0.00		3.57		0.00		3.02	
	ECO 008	3.00		0.00		3.58		0.00		3.00	
	SSWC 110	2.91		0.00		3.53		0.00		2.98	

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 48 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง	สายพันธุ์	กรรมวิธีทดสอบ							
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum*	ERO 001	66.22	B[1/]	0.00	C	64.89	B	0.00	C	72.00	A
	EWC 065	72.89	A	0.00	C	64.44	B	0.00	C	72.44	A
	RCO 010	91.56	A	0.00	C	63.56	B	0.00	C	91.11	A
	RWC 021	75.56	A	0.00	C	65.33	B	0.00	C	74.67	A
	SSMIX 013	72.44	A	0.00	C	64.44	B	0.00	C	72.00	A
	SSMIX 020	73.33	A	0.00	C	63.11	B	0.00	C	73.78	A
	SSMIX 023	73.78	A	0.00	C	62.22	B	0.00	C	74.22	A
	SSMIX 025	70.22	B	0.00	D	63.56	C	0.00	D	72.89	A
	ECO 008	65.78	A	0.00	C	62.22	B	0.00	C	66.67	A
	SSWC 110	66.22	AB	0.00	C	63.11	B	0.00	C	66.67	A
Inhibition zone (ซม.)	ERO 001	2.52		0.00		3.11		0.00		3.11	
	EWC 065	3.42		0.00		3.18		0.00		3.14	
	RCO 010	3.93		0.00		3.20		0.00		4.10	
	RWC 021	3.12		0.00		3.24		0.00		3.23	
	SSMIX 013	3.20		0.00		3.20		0.00		2.92	
	SSMIX 020	3.16		0.00		3.12		0.00		3.23	
	SSMIX 023	3.19		0.00		3.14		0.00		3.44	
	SSMIX 025	3.11		0.00		3.23		0.00		3.02	
	ECO 008	3.00		0.00		3.22		0.00		2.98	
	SSWC 110	2.88		0.00		3.20		0.00		2.95	

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.23 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 96 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง	สายพันธุ์	กรรมวิธีทดสอบ									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum*	ERO 001	66.22	B[1/]	0.00	D	30.22	C	0.00	D	72.00	A
	EWC 065	69.33	A	0.00	C	29.33	B	0.00	C	67.56	A
	RCO 010	91.56	A	0.00	C	30.67	B	0.00	C	93.78	A
	RWC 021	72.00	A	0.00	C	29.78	B	0.00	C	72.44	A
	SSMIX 013	72.44	A	0.00	C	28.44	B	0.00	C	72.00	A
	SSMIX 020	73.33	A	0.00	C	29.33	B	0.00	C	73.33	A
	SSMIX 023	73.78	A	0.00	C	29.33	B	0.00	C	74.67	A
	SSMIX 025	70.22	B	0.00	D	29.33	C	0.00	D	72.89	A
	ECO 008	65.78	A	0.00	C	29.78	B	0.00	C	66.67	A
	SSWC 110	66.22	A	0.00	C	28.89	B	0.00	C	67.56	A
Inhibition zone (ซม.)	ERO 001	2.52		0.00		1.26		0.00		3.11	
	EWC 065	3.34		0.00		1.32		0.00		3.03	
	RCO 010	3.93		0.00		1.27		0.00		4.24	
	RWC 021	3.04		0.00		1.27		0.00		3.18	
	SSMIX 013	3.20		0.00		1.25		0.00		2.92	
	SSMIX 020	3.16		0.00		1.26		0.00		3.22	
	SSMIX 023	3.19		0.00		1.29		0.00		3.45	
	SSMIX 025	3.11		0.00		1.28		0.00		3.02	
	ECO 008	3.00		0.00		1.33		0.00		2.98	
	SSWC 110	2.88		0.00		1.32		0.00		2.97	

[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

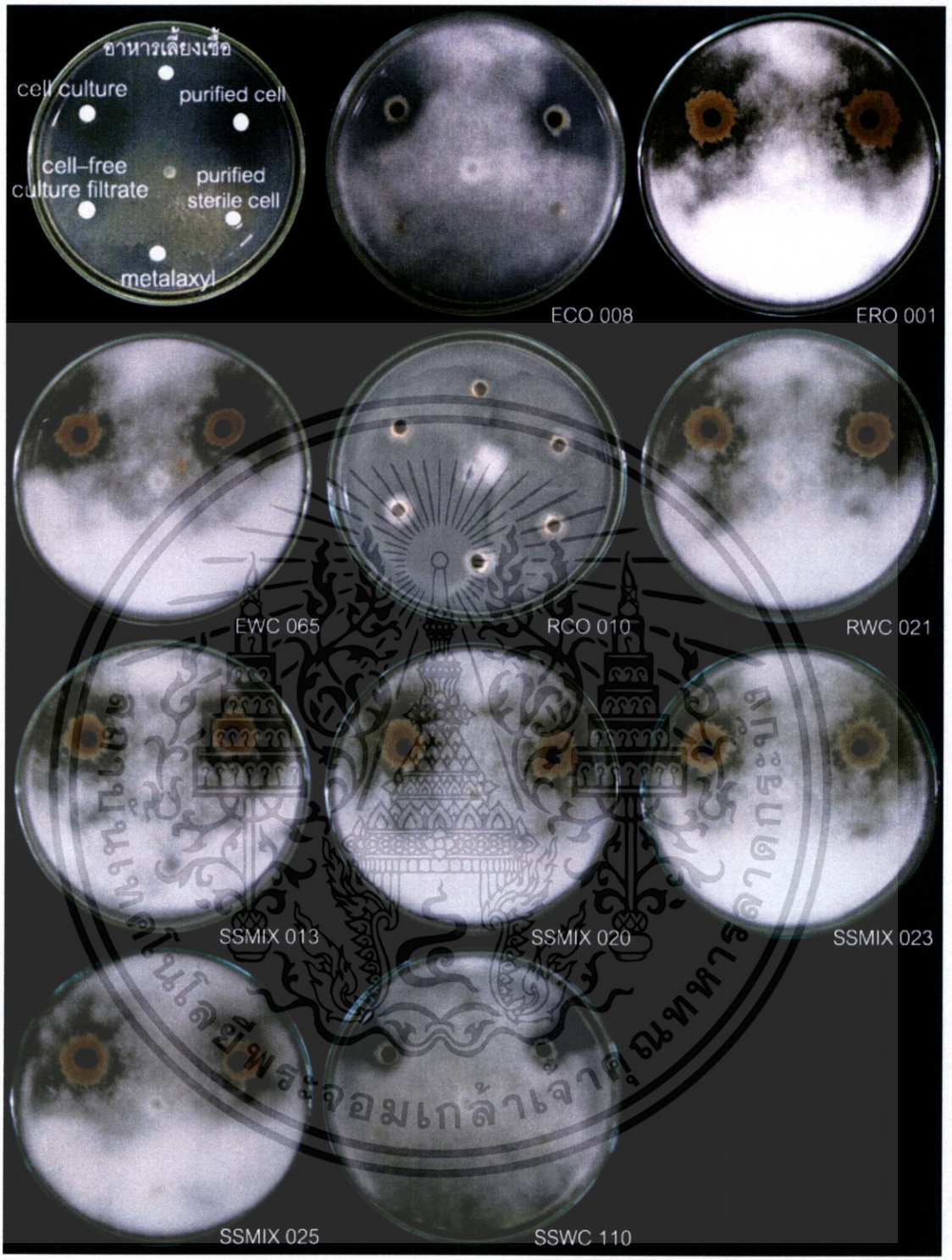
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.24 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method บันทึกค่าที่ 192 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง	สายพันธุ์	กรรมวิธีทดสอบ									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum*	ERO 001	67.56	B[1/]	0.00	C	0.00	C	0.00	C	72.00	A
	EWC 065	74.67	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	74.67	A
	RCO 010	91.56	B	0.00	C	0.00	C	0.00	C	96.44	A
	RWC 021	75.11	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	74.67	A
	SSMIX 013	72.89	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	73.78	A
	SSMIX 020	73.78	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	74.67	A
	SSMIX 023	74.22	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	75.11	A
	SSMIX 025	70.67	B	0.00	C	0.00	C	0.00	C	72.89	A
	ECO 008	65.78	B	0.00	C	0.00	C	0.00	C	68.00	A
	SSWC 110	66.67	A	0.00	C	0.00	C	0.00	C	67.56	A
Inhibition zone (ซม.)	ERO 001	2.55		0.00		0.00		0.00		3.19	
	EWC 065	3.46		0.00		0.00		0.00		3.19	
	RCO 010	4.39		0.00		0.00		0.00		4.36	
	RWC 021	3.11		0.00		0.00		0.00		3.29	
	SSMIX 013	3.21		0.00		0.00		0.00		3.22	
	SSMIX 020	3.17		0.00		0.00		0.00		3.25	
	SSMIX 023	3.20		0.00		0.00		0.00		3.46	
	SSMIX 025	3.12		0.00		0.00		0.00		3.21	
	ECO 008	3.01		0.00		0.00		0.00		3.03	
	SSWC 110	2.89		0.00		0.00		0.00		2.97	

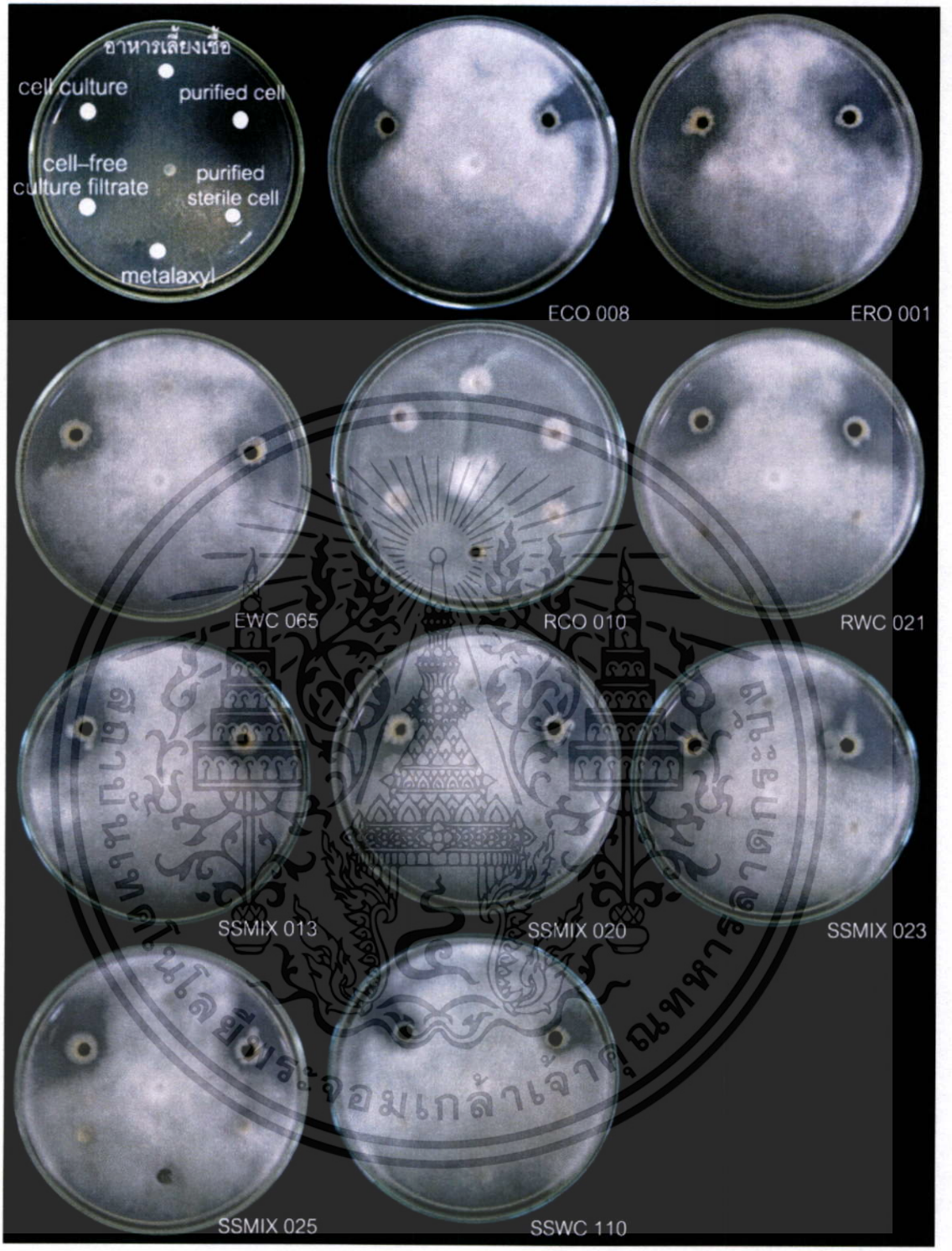
[1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ DMRT ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.19 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพโดยเลี้ยงบนอาหารNB ด้วยวิธี agar diffusion method ที่ 192 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 การยับยั้งเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพโดยเลี้ยงบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method ที่ 192 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.11 การศึกษากลไกในการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์

การศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Py. myriotylum* ด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* ในระหว่างที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงชนิด compound microscope โดยใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุเท่ากับ 10× (ภาพที่ 4.21) และ 40× (ภาพที่ 4.22) ซึ่งสังเกตผลการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อได้ดังนี้

การเจริญของเส้นใยเชื้อบนแผ่นกระจกสไลด์ที่เลี้ยงเชื้อ *Py. myriotylum* เพียงอย่างเดียว พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมงการเจริญของเส้นใยมีส่วนเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณที่ขีดเชื้อแบคทีเรียไว้เป็นทางยาว ซึ่งเส้นใยเชื้อจะเจริญค่อนข้างตรง เมื่อเส้นใยมีการแตกแขนงจะแยกออกเป็น 2 ทางและค่อยๆเจริญ ในส่วนของ cytoplasm ภายในเส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* มีการเคลื่อนที่ไหลไปทางส่วนปลายอย่างช้าๆ จนบางช่วงเวลาไม่สามารถสังเกตการไหลของ cytoplasm ภายในเส้นใยเชื้อได้ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลอีกครั้ง พบว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Py. myriotylum* ให้ลักษณะที่ไม่แตกต่างกับผลที่ได้บันทึกไว้เมื่อเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008 ในการควบคุมเชื้อ *Py. myriotylum* เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง พบว่าเส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเกิดขึ้นคือบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเริ่มมีการแตกแขนงตรงส่วนปลายของเส้นใยมากขึ้น และในบางครั้งเริ่มมีการเจริญงอในทางด้านข้าง และ/หรือ สวนทางกับการเคลื่อนที่เดิมของเส้นใยปกติ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 แล้วชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลง อีกครั้งพบว่าส่วนของเส้นใยทั้งส่วนปลายเส้นใย และถัดจากส่วนปลายของเส้นใยเชื้อเข้ามามีลักษณะหงิก งอ ผิดปกติไปเมื่อเทียบเทียบกับแผ่นกระจกสไลด์ที่เลี้ยงเชื้อ *Py. myriotylum* เพียงอย่างเดียว อีกทั้งยังพบบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *Py. myriotylum* อย่างไรก็ตามที่เวลา 36 ชั่วโมงไม่พบบริเวณโซนใส และส่วนปลายของเส้นใยสามารถเจริญเข้าไปชิดกับบริเวณที่แบคทีเรียเจริญอยู่ได้

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RWC 021, SSMIX 013 และ SSMIX 020 ต่อเชื้อ *Py. myriotylum* พบว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกันคือ เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง เส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* มีการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเกิดขึ้นคือ cytoplasm ภายในเส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* มีการเคลื่อนที่ผิดปกติได้แก่มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และหยุด สลับกันไปมา โดยทิศทางการเคลื่อนที่จะไปรวมกันในส่วนปลายของเส้นใย และไหล

เอกสารนี้เป็นการเผยแพร่ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย้อนกลับอย่างรวดเร็ว ซ้ำไปซ้ำมากว่า 4 ครั้ง จากนั้นเกิดการแตกของเส้นใยบริเวณต่างๆ โดยเฉพาะส่วนปลายของเส้นใยที่น่าจะเป็นบริเวณที่มีความอ่อนแอที่สุดของเส้นใย เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลอีกครั้งพบว่าเส้นใยที่ไม่มีการแตกบริเวณปลายของเส้นใยจะเกิดการหงิก งอ ผิดปกติไป และไม่มีการเจริญต่อของเส้นใยเชื้อรา จึงส่งผลให้เกิดบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *Py. myriotylum* เมื่อเทียบเทียบกับแผ่นกระจกสไลด์ที่เลี้ยงเชื้อ *Py. myriotylum*

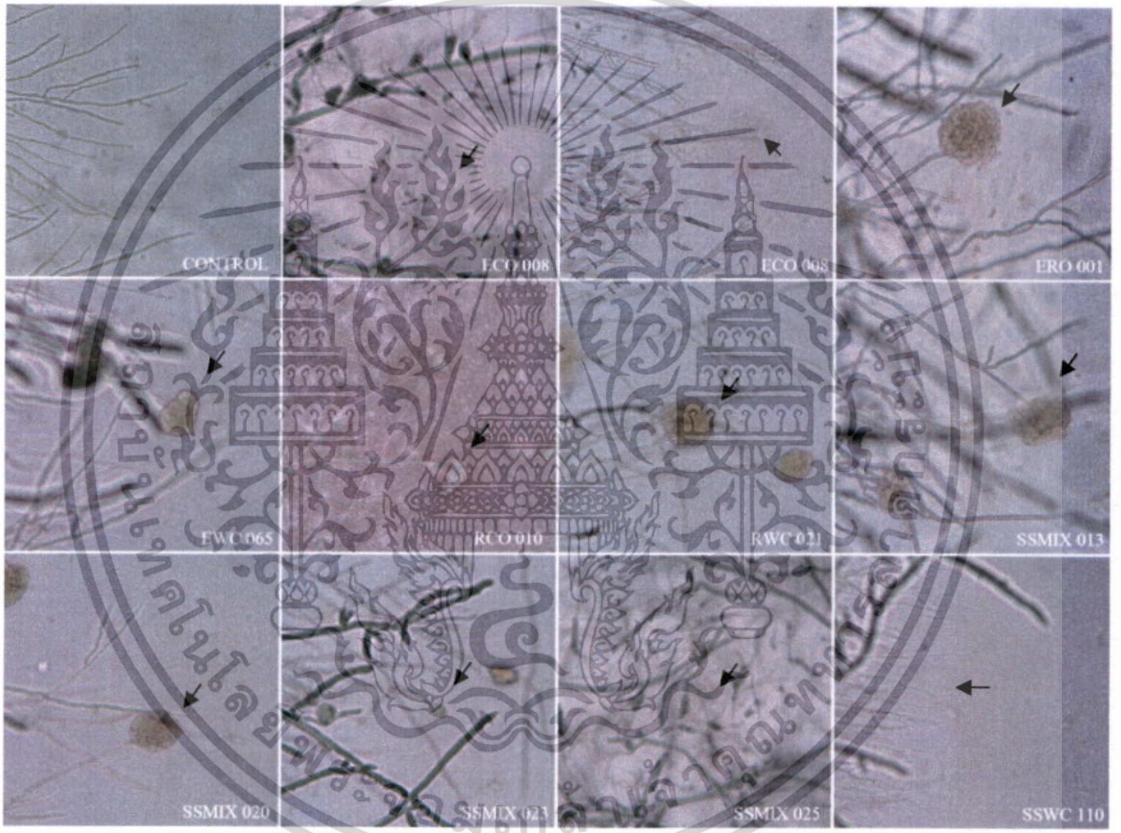
การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ต่อเชื้อ *Py. myriotylum* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมงเส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* มีการสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบ เนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และยังสังเกตเห็นอีกว่าเชื้อ *Py. myriotylum* สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแบคทีเรีย แต่มีการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเกิดขึ้นคือ เกิดการแตกในส่วนปลายของเส้นใย แต่ก่อนการแตกของเส้นใยไม่สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนเนื่องมาจากบริเวณที่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อ มีแบคทีเรียเจริญอยู่เป็นจำนวนมาก และการทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 นี้ไม่พบบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อ *Py. myriotylum*

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 023 ต่อเชื้อ *Py. myriotylum* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง เส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* มีการแตกแขนงมากกว่า 2 แขนงอยู่เป็นจำนวนมาก และมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ภายในของเส้นใยเกิดขึ้นคือ cytoplasm ภายในเส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* มีการเคลื่อนที่ผิดปกติได้แก่มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และบริเวณส่วนปลายหรือถัดจากส่วนปลายของเส้นใยเข้ามามีลักษณะบวมขึ้นมากกว่า ซึ่งอาจเกิดจากของเหลวภายในเซลล์ไหลไปรวมกัน จากนั้นส่วนปลายของเส้นใยเกิดการแตกในบริเวณที่บวม เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมงแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลง อีกครั้งพบว่าเส้นใยมีการเจริญไปในแนวตั้งฉากกับการเจริญปกติ และไม่มีการเจริญต่อของเส้นใยเชื้อรา จึงส่งผลให้เกิดบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *Py. myriotylum* ได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นกระจกสไลด์ที่เลี้ยงเชื้อ *Py. myriotylum* เพียงอย่างเดียว

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 025 ต่อเชื้อ *Py. myriotylum* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง เส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* จะมีการแตกแขนงของเส้นใยมากกว่าปกติรวมไปถึงเส้นใยจะเกิดการหงิก งอ ผิดปกติไป เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมง และสังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลอีกครั้งพบว่าเกิดการแตกของเส้นใยทั้งในส่วนปลายของเส้นใย และส่วนที่ถัดจากส่วนปลายเส้นใยเข้ามา แต่จะพบการแตกในบริเวณที่ถัดจากส่วนปลายเส้นใยเข้ามามากกว่า อีกทั้งยังพบว่าไม่มีการเจริญต่อของเส้นใยเชื้อรา จึงส่งผลให้เกิดบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *Py. myriotylum* เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นกระจกสไลด์ที่เลี้ยงเชื้อ *Py. myriotylum* เพียงอย่างเดียว

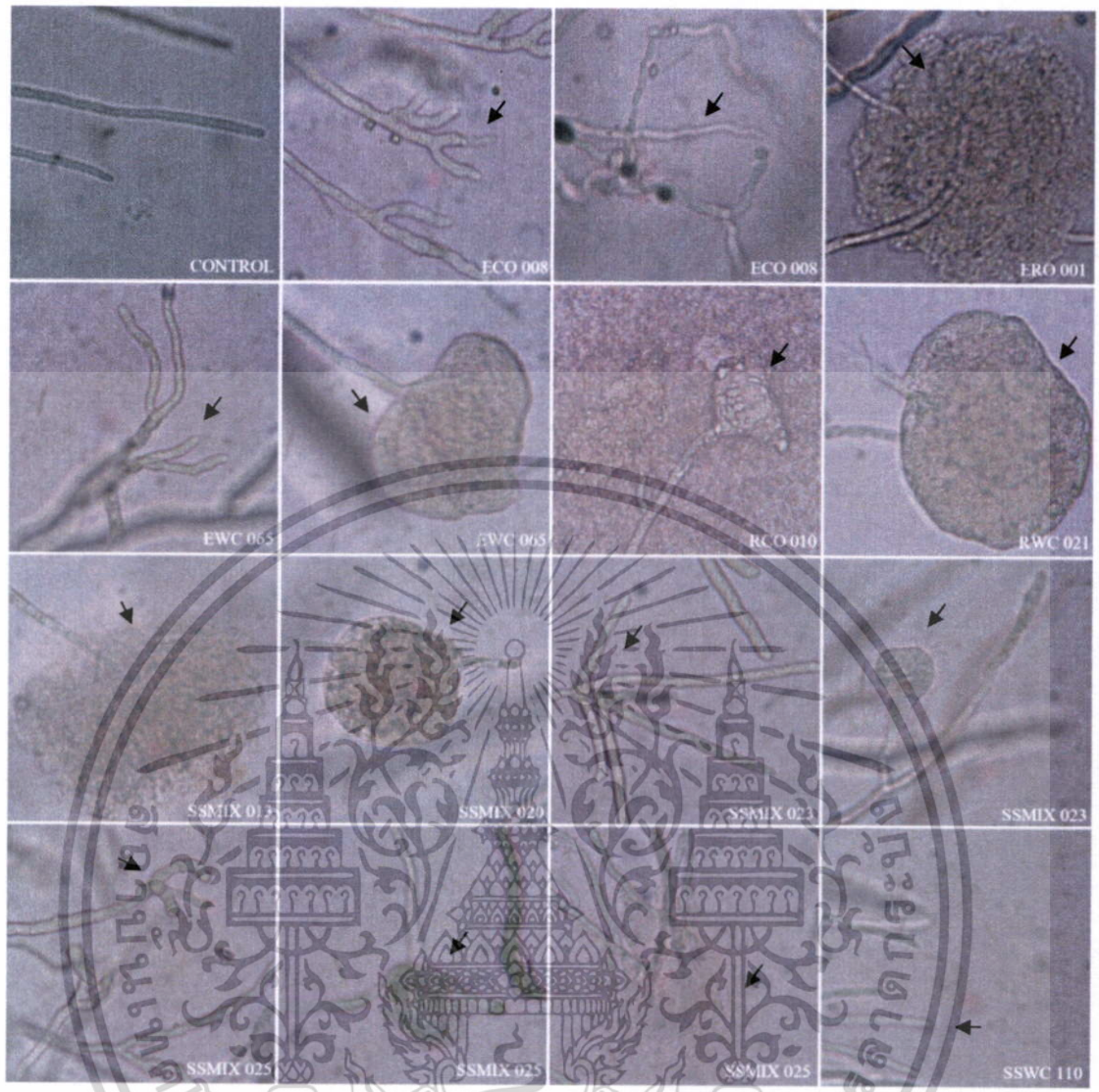
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSWC 110 ต่อเชื้อ *Py. myriotylum* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมงไม่พบความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *Py. myriotylum* เกิดขึ้น แต่บริเวณส่วนปลายของเส้นใยมีการเจริญที่ค่อนข้างจะอยู่ในระนาบเดียวกัน เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลงอีกครั้งก็ยังไม่พบความผิดปกติของเส้นใยเกิดขึ้นแต่ประการใด แต่เส้นใยเชื้อไม่มีการเจริญเติบโตต่อไปอีก ส่งผลให้เกิดบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *Py. myriotylum* แต่เมื่อวางแผ่นสไลด์ไว้เป็นเวลาประมาณ 36 ชั่วโมงไม่พบบริเวณโซนใส และส่วนปลายของเส้นใยสามารถเจริญเข้าไปชิดกับบริเวณที่แบคทีเรียเจริญอยู่ได้



ภาพที่ 4.21 ความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *Py. myriotylum* (รูปศรชี้) ที่ถูกทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์โดยใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุเท่า 10×

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 ความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *Py. myriotylum* (รูปศรชี้) ที่ถูกทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์โดยใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุเท่า 40×

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.12 การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในระบบปลูก

จากการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกในระบบปลูกพืชแบบ NFT ซึ่งใส่แบคทีเรียทดสอบจำนวน 3 ครั้งคือ ครั้งที่หนึ่งแช่เมล็ดปลูก ครั้งที่สองย้ายต้นกล้าลงอนุบาล และครั้งที่สามย้ายกล้าจากรางอนุบาลลงระบบปลูก ในวันเก็บผลผลิตทำการวัดค่า ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งต้น และ น้ำหนักแห้งราก โดยผลการทดสอบที่ได้จากการเติมแบคทีเรียทั้งหมดข้างต้นจะนำไปคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตเทียบกับพืชทดสอบที่ไม่ได้ใส่แบคทีเรียลงไป ซึ่งจากการปลูกพืช 2 ครั้งให้ผลดังนี้

การปลูก *L. sativa* L. cv. Butter head ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ NFT ครั้งที่ 1 พบว่า เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SSWC 110 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชปลูกได้ดีที่สุดเนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนใบ น้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก และน้ำหนักแห้งต้นสูงที่สุดโดยเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วมีค่าการเพิ่มขึ้นของผลผลิตดังกล่าวเท่ากับ 23.81, 30.70, 51.90 และ 59.31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008 เพิ่มค่าความยาวราก น้ำหนักสดราก และ น้ำหนักแห้งรากสูงสุดเท่ากับ 31.39, 48.97 และ 45.82 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 020 สามารถเพิ่มความกว้างทรงพุ่มได้สูงที่สุด 16.84 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.25)

การปลูก *L. sativa* L. cv. Butter head ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ NFT ครั้งที่ 2 พบว่า ผลยังคงเป็นไปในทำนองเดียวกับการปลูกครั้งที่ 1 คือ เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชปลูกได้ดีที่สุดเนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก และน้ำหนักแห้งรากสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วมีค่าการเพิ่มขึ้นของผลผลิตดังกล่าวเท่ากับ 11.43, 27.99, 36.95, 39.86 และ 46.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ SSWC 110 เพิ่มค่าน้ำหนักแห้งต้นสูงสุดเท่ากับ 48.06 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 025 สามารถเพิ่มความกว้างทรงพุ่มได้สูงที่สุด 13.51 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.26)

การปลูก *L. sativa* L. cv. Red coral ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ NFT ครั้งที่ 1 พบว่า เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SSWC 110 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชปลูกได้ดีที่สุดเนื่องจากสามารถเพิ่ม ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ น้ำหนักสดต้น และ น้ำหนักแห้งต้นสูงที่สุดโดยเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วมีค่าการเพิ่มขึ้นของผลผลิตดังกล่าวเท่ากับ 28.38, 31.71, 49.66 และ 45.96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008 เพิ่มความยาวราก น้ำหนักสดราก และ น้ำหนักแห้งรากสูงสุดเท่ากับ 31.33, 57.53 และ 42.90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.27)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปลูก *L. sativa* L. cv. Red coral ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ NFT ครั้งที่ 2 พบว่าผลยังคงเป็นไปในทำนองเดียวกับการปลูกครั้งที่ 1 คือ เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชปลูกได้ดีที่สุดเนื่องจากสามารถเพิ่ม ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ ความยาวราก และ น้ำหนักแห้งรากสูงที่สุดโดยเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วมีค่าการเพิ่มขึ้นของผลผลิตดังกล่าวเท่ากับ 19.57, 23.94, 15.95 และ 31.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ SSWC 110 น้ำหนักสดต้น และ น้ำหนักแห้งต้นสูงสุดเท่ากับ 37.90 และ 34.41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001 สามารถเพิ่มน้ำหนักสดรากได้สูงที่สุดเท่ากับ 27.68 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.28)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.25 ค่าการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Butter head ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ NFT ครั้งที่ 1

ชื่อสายพันธุ์	การเจริญเติบโตของพืช (เปอร์เซ็นต์)[1]						
	ความกว้างทรงพุ่ม	จำนวนใบ	ความยาวราก	น้ำหนักสดต้น	น้ำหนักสดราก	น้ำหนักแห้งต้น	น้ำหนักแห้งราก
ERO 001	0.00	0.00	3.10	1.53	10.39	28.32	13.91
EWC 065	6.63	0.00	9.49	23.12	48.53	23.50	23.84
RCO 010	8.16	0.00	0.93	2.74	25.65	0.07	13.48
RWC 021	7.65	6.35	25.37	13.41	37.71	1.35	20.05
SSMIX 013	7.65	11.11	28.85	1.05	14.17	0.71	30.61
SSMIX 020	16.84	0.00	24.75	23.68	48.46	5.63	20.45
SSMIX 023	1.02	15.87	2.05	19.61	26.29	33.24	16.32
SSMIX 025	6.63	17.46	6.39	10.73	25.13	22.73	36.17
ECO 008	12.76	7.94	31.39	29.15	48.97	43.57	45.82
SSWC 110	15.82	23.81	21.96	30.70	51.90	59.31	43.88

[1] ค่าเฉลี่ยจากพืชจำนวน 5 ต้น โดยคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่ทำการใส่เชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.26 ค่าการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Butter head ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ NFT ครั้งที่ 2

ชื่อสายพันธุ์	การเจริญเติบโตของพืช (เปอร์เซ็นต์)[1]						
	ความกว้างทรงพุ่ม	จำนวนใบ	ความยาวราก	น้ำหนักสดต้น	น้ำหนักสดราก	น้ำหนักแห้งต้น	น้ำหนักแห้งราก
ERO 001	2.70	0.95	6.23	8.47	2.28	9.17	25.36
EWC 065	6.08	7.62	14.12	28.20	20.21	45.16	30.93
RCO 010	7.43	7.62	9.22	12.19	19.17	8.65	2.70
RWC 021	10.81	10.48	22.39	19.12	19.25	5.69	5.64
SSMIX 013	9.46	-0.95	0.51	2.20	4.66	23.74	30.67
SSMIX 020	2.03	0.95	27.99	36.28	35.83	10.95	0.96
SSMIX 023	6.08	5.71	17.24	8.10	18.81	2.96	0.68
SSMIX 025	13.51	1.90	27.54	4.24	22.90	18.88	6.54
ECO 008	12.84	11.43	27.99	36.95	39.86	42.07	46.21
SSWC 110	8.78	9.52	32.12	35.62	30.34	48.06	41.58

[1] ค่าเฉลี่ยจากพืชจำนวน 5 ต้น โดยคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่ทำการใส่เชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.27 ค่าการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Red coral ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ NFT ครั้งที่ 1

ชื่อสายพันธุ์	การเจริญเติบโตของพืช (เปอร์เซ็นต์)[1]						
	ความกว้างทรงพุ่ม	จำนวนใบ	ความยาวราก	น้ำหนักสดต้น	น้ำหนักสดราก	น้ำหนักแห้งต้น	น้ำหนักแห้งราก
ERO 001	14.19	0.00	3.01	19.90	32.36	11.73	30.36
EWC 065	13.51	0.00	1.36	0.25	0.27	17.76	19.16
RCO 010	18.24	-2.44	5.87	30.25	4.63	15.13	15.58
RWC 021	18.24	17.07	29.14	28.22	22.70	31.89	4.47
SSMIX 013	16.22	17.07	28.01	23.05	1.35	11.48	33.24
SSMIX 020	23.65	29.27	26.66	48.55	32.47	47.57	13.47
SSMIX 023	10.81	7.32	6.85	1.39	20.35	1.46	17.65
SSMIX 025	17.57	14.63	10.62	6.14	15.14	3.51	4.30
ECO 008	26.35	29.27	31.33	45.91	57.53	38.30	42.90
SSWC 110	28.38	31.71	23.34	49.66	38.11	45.96	33.92

[1] ค่าเฉลี่ยจากพืชจำนวน 5 ต้นโดยคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่ทำการใส่เชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.28 ค่าการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Red coral ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูกพืชแบบ NFT ครั้งที่ 2

ชื่อสายพันธุ์	การเจริญเติบโตของพืช (เปอร์เซ็นต์)[µ]						
	ความกว้างทรงพุ่ม	จำนวนใบ	ความยาวราก	น้ำหนักสดต้น	น้ำหนักสดราก	น้ำหนักแห้งต้น	น้ำหนักแห้งราก
ERO 001	7.97	9.86	15.10	30.81	27.68	12.77	13.18
EWC 065	13.04	0.00	0.20	9.16	9.18	1.08	9.42
RCO 010	13.77	7.04	8.64	27.53	22.01	9.22	22.13
RWC 021	11.59	7.04	13.05	17.19	12.52	6.04	5.34
SSMIX 013	10.14	16.90	4.15	14.07	11.63	5.29	11.70
SSMIX 020	1.45	26.76	0.92	29.13	30.34	4.08	12.66
SSMIX 023	0.72	12.68	2.70	2.08	12.74	9.06	1.62
SSMIX 025	10.87	11.27	14.96	19.80	16.65	12.41	2.90
ECO 008	19.57	23.94	15.95	34.97	25.75	23.57	31.23
SSWC 110	13.77	21.13	10.15	37.90	18.64	34.41	24.41

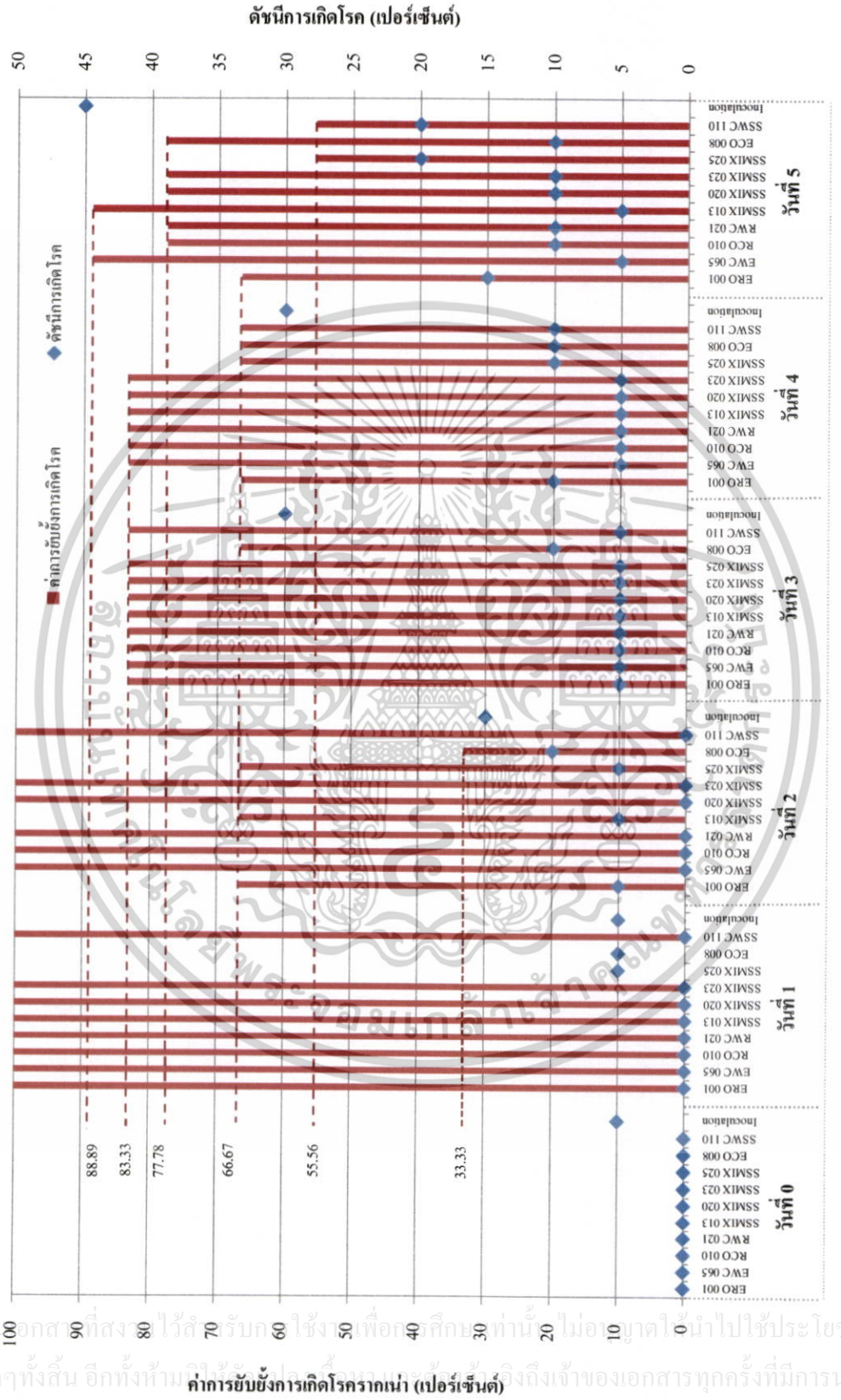
[µ] ค่าเฉลี่ยจากพืชจำนวน 5 ต้น โดยคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่ทำการใส่เชื้อแบคทีเรีย

4.13 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งโรคด้วยวิธี split root technique

การศึกษาแบคทีเรียที่มีศักยภาพด้วยวิธี split-root technique โดยมี *L. sativa* L. cv. Butter head เป็นพืชทดสอบซึ่งจะบันทึกค่าการเกิดโรคจากรากส่วนที่ทำการปลูกเชื้อสาเหตุที่ไม่ได้สัมผัสกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ จากการบันทึกผลในวันที่ 1 หลังจากการปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* พบว่าพืชที่มีการใส่แบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSWC 110 ไม่พบอาการของโรครากเน่า โดยมีค่าดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกลุ่มการทดลองที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียลงไปให้ค่าดัชนีการเกิดโรคสูงเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 2 หลังจากการปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* พืชที่มีการใส่แบคทีเรียสายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSWC 110 ไม่แสดงอาการของโรครากเน่า คิดเป็นค่าการยับยั้งการเกิดโรคเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มการทดลองที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียลงไปให้ค่าดัชนีการเกิดโรคสูงเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 3, 4 และ 5 หลังจากการปลูกเชื้อ *Py. myriotylum* พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใส่ลงในพืชทดสอบทำให้รากของพืชทดสอบแสดงอาการเกิดโรคทั้งหมด โดยสายพันธุ์ที่ส่งผลให้ค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำสุดเท่ากันทั้งในวันที่ 3, 4 และ 5 คือ EWC 065 และ SSMIX 013 โดยมีค่าเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 83.3 เปอร์เซ็นต์

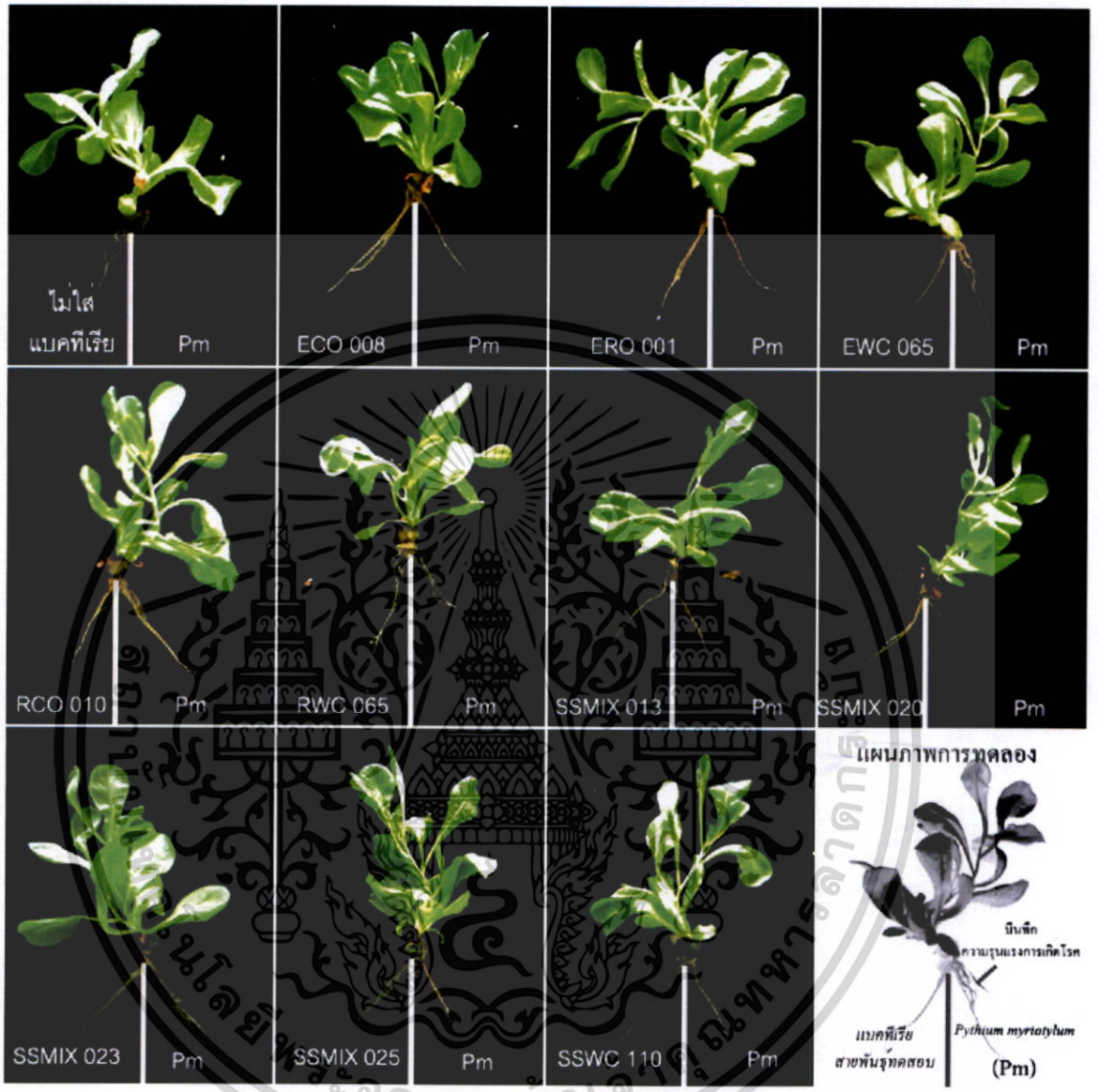
จากการทดลองเห็นได้ว่าในจำนวนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์คือ EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSWC 110 ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดสาร secondary metabotile ของแบคทีเรียส่งผ่านจากรากด้านหนึ่งสู่รากอีกด้านหนึ่ง จนส่งผลในการยับยั้งอาการของโรครากเน่าได้จากการทดสอบด้วยวิธี split-root technique (ภาพที่ 4.23) (ภาพที่ 4.24)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.23 ค่าประเมินการยับยั้งโรครากเน่าจากเบคทีเรียปริเวณเขตรากพืชด้วยวิธี split-root technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.24 การยับยั้งโรครากเน่าจากแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชด้วยวิธี split-root technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.14 การศึกษาลักษณะโคโลนี และคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพบนอาหารทดสอบ

การเจริญบนอาหาร Nutrient glucose agar, Sheep blood agar, Mac Conkey, Pseudo P และ Pseudo F ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพพบว่ามีลักษณะเหมือน และ/หรือแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 4.29; ภาพที่ 4.25) ดังนี้

ลักษณะการเจริญบนอาหาร NGA จะทำการบันทึกลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงออก ซึ่งพบว่าจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพทั้งหมด 10 สายพันธุ์มีรูปร่าง (Configuration) ทั้งในรูปแบบ Irregular and Spreading, L-Form, Round, Round with Raised Margin และ Wrinked ระดับผิวหน้าโคโลนีพบรูปแบบ Raised, Hilly, Umbonate และ Convex ขอบของโคโลนีพบ Irregular (Erose), Lobate และ Smooth (Entire)

การเจริญบนอาหาร sheep blood agar เป็นการบันทึกความสามารถของแบคทีเรียในการสลายเม็ดเลือดแดงซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบการสลายได้ 2 ลักษณะคือ β-hemolysis และ γ-hemolysis ซึ่งการสลายตัวแบบ β-hemolysis จะมีลักษณะที่บริเวณโคโลนีของแบคทีเรียจะเป็นโซนใส และ การสลายตัวแบบ γ-hemolysis จะไม่พบโซนใส และโซนสีเขียวบริเวณโคโลนีของแบคทีเรียทดสอบซึ่งผลของการสลายเม็ดเลือดแดงจะช่วยในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้

อาหาร Mac Conkey เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือน้ำดี ซึ่งเกลือน้ำดีมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ส่งผลให้แบคทีเรียแกรมลบสามารถเจริญได้ดีดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพทั้งหมด 10 สายพันธุ์ที่ทดสอบ มี 2 สายพันธุ์สามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารแสดงว่าอาจจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

ต่อจากนั้นแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร Mac Conkey จะถูกนำไปเลี้ยงต่อบนอาหาร Pseudo P เพื่อใช้ทดสอบว่าแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกลุ่ม Pseudomonad หรือไม่ และอาหาร Pseudo F ว่าแบคทีเรียที่ทดสอบสามารถสร้างสารที่เรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet หรือไม่ ซึ่งจากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถเจริญได้ในอาหาร Pseudo P และในอาหาร Pseudo F แบคทีเรียทั้ง 2 สามารถตรวจพบสารเรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรจากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารชนิดต่างๆสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้ดังนี้ คือ

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร Mac Conkey สามารถสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Sheep blood agar แบบ β-hemolysis ลักษณะการเจริญบนอาหาร NGA ที่รูปร่าง แบบ Irregular and Spreading ระดับผิวหน้าโคโลนีพบรูปแบบ Hilly และขอบของโคโลนีเป็นแบบ Irregular (Erose) ได้แก่แบคทีเรีย สายพันธุ์ ERO 001 และ SSMIX 013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร Mac Conkey สามารถสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Sheep blood agar แบบ β-hemolysis ลักษณะการเจริญบนอาหาร NGA ที่รูปร่าง แบบ Wrinked ระดับผิวหน้าโคโลนีพบรูปแบบ Raised และขอบของโคโลนีเป็นแบบ Lobate ได้แก่แบคทีเรีย สายพันธุ์ EWC 065 และ RWC 021

กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร Mac Conkey สามารถสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Sheep blood agar แบบ β-hemolysis ลักษณะการเจริญบนอาหาร NGA ที่รูปร่าง แบบ Round with Raised Margin ระดับผิวหน้าโคโลนีพบรูปแบบ Umbonate และขอบของโคโลนีเป็นแบบ Smooth (Entire) ได้แก่แบคทีเรีย สายพันธุ์ RCO 010

กลุ่มที่ 4 แบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร Mac Conkey สามารถสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Sheep blood agar แบบ β-hemolysis ลักษณะการเจริญบนอาหาร NGA ที่รูปร่าง แบบ L-Form ระดับผิวหน้าโคโลนีพบรูปแบบ Raised และขอบของโคโลนีเป็นแบบ Irregular (Erose) ได้แก่แบคทีเรีย สายพันธุ์ SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSMIX 025

กลุ่มที่ 5 แบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสามารถเจริญได้บนอาหาร Mac Conkey สามารถสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Sheep blood agar แบบ γ-hemolysis ลักษณะการเจริญบนอาหาร NGA ที่รูปร่าง แบบ Round ระดับผิวหน้าโคโลนีพบรูปแบบ Convex ขอบของโคโลนีเป็นแบบ Smooth (Entire) สามารถเจริญได้ในอาหาร Pseudo P และในอาหาร Pseudo F ตรวจพบสารเรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จึงอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ได้แก่แบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008

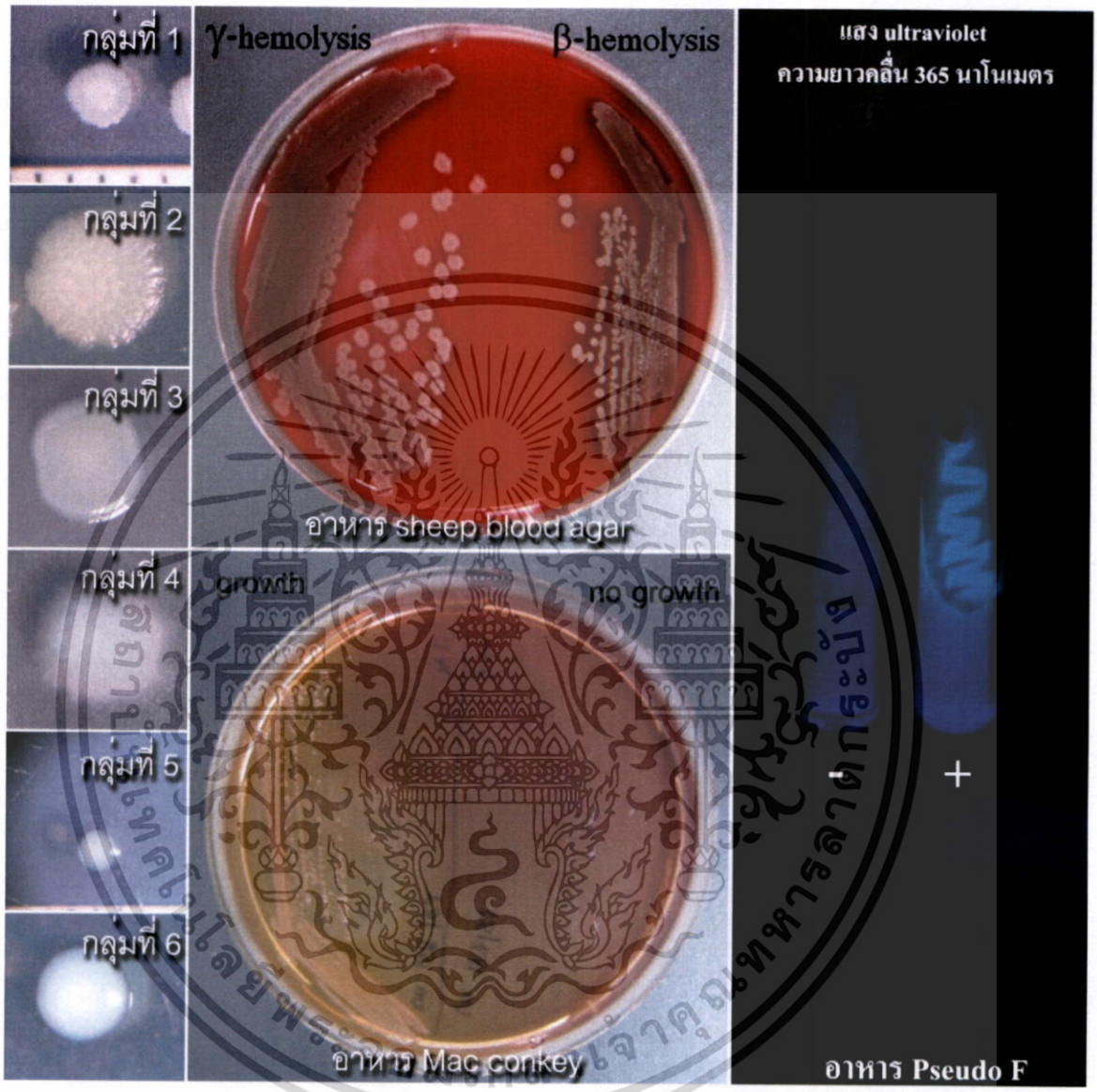
กลุ่มที่ 6 แบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสามารถเจริญได้บนอาหาร Mac Conkey สามารถสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Sheep blood agar แบบ γ-hemolysis ลักษณะการเจริญบนอาหาร NGA ที่รูปร่าง แบบ Round ระดับผิวหน้าโคโลนีพบรูปแบบ Raised ขอบของโคโลนีเป็นแบบ Smooth (Entire) สามารถเจริญได้ในอาหาร Pseudo P และในอาหาร Pseudo F ตรวจพบสารเรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จึงอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ได้แก่แบคทีเรียสายพันธุ์ SSWC 110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.29 ลักษณะการเจริญบนอาหารบางชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ

สายพันธุ์	ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ							
	NGA[1]				Sheep blood agar	Mac Conkey	Pseudo P	Pseudo F
	color	Configurations	Elevations	Margins				
ERO 001	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular (Erose)	β-hemolysis	no growth	*Not tested*	*Not tested*
EWC 065	white	Wrinked	Hilly	Lobate	β-hemolysis	no growth	*Not tested*	*Not tested*
RCO 010	white	Round with Raised Margin	Umbonate	Smooth (Entire)	β-hemolysis	no growth	*Not tested*	*Not tested*
RWC 021	white	Wrinked	Hilly	Lobate	β-hemolysis	no growth	*Not tested*	*Not tested*
SSMIX 013	white	Irregular and Spreading	Raised	Irregular (Erose)	β-hemolysis	no growth	*Not tested*	*Not tested*
SSMIX 020	white	L-Form	Raised	Irregular (Erose)	β-hemolysis	no growth	*Not tested*	*Not tested*
SSMIX 023	white	L-Form	Raised	Irregular (Erose)	β-hemolysis	no growth	*Not tested*	*Not tested*
SSMIX 025	white	L-Form	Raised	Irregular (Erose)	β-hemolysis	no growth	*Not tested*	*Not tested*
ECO 008	white	Round	Convex	Smooth (Entire)	γ-hemolysis	growth	growth	+
SSWC 110	white	Round	Raised	Smooth (Entire)	γ-hemolysis	growth	growth	+

[1] เปรียบเทียบลักษณะตาม Brown (2005)



ภาพที่ 4.25 ลักษณะโคโลนี และคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.15 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางสัณฐาน

จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการโดยการการย้อมสีแบคทีเรียแบบ Gram's staining การย้อมสีแบบ Leifson flagella stain การย้อมสีแบบ malachite green ศึกษาการเจริญในสภาพ anaerobes การเจริญภายใต้อุณหภูมิ 4 และ 42 องศาเซลเซียสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ พบว่ามีลักษณะเหมือน และ/หรือแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 4.30) โดยสามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มคือ

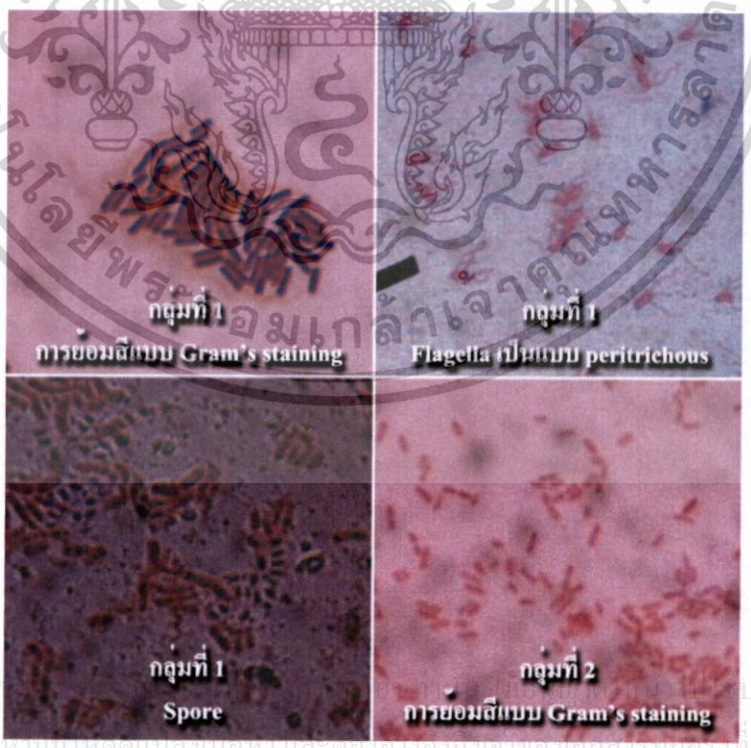
กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน มี Flagella เป็นแบบ peritrichous สามารถสร้างสปอร์ได้ ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพ Anaerobes และสามารถมีชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากข้อมูลข้างต้นเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Brown (2005) ที่อ้างถึงการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่าเป็นแบคทีเรียใน Group I ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่นแบคทีเรียใน Genus *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolacobacillus* เป็นต้นซึ่งจากการทดสอบแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่สายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSMIX 025 (ภาพที่ 4.26)

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน มี Flagella มากกว่า 1 เส้นแบบ Lophotrichous ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพ Anaerobes และ สามารถมีชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 4°C แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42°C จากข้อมูลข้างต้นเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Brown (2005) ที่อ้างถึงการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่าเป็นแบคทีเรียใน Group VIII ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้เช่นแบคทีเรียใน Genus *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Halobacterium* และ *Flavobacterium* เป็นต้น ซึ่งจากการทดสอบแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110 (ภาพที่ 4.26)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.30 คุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ

สายพันธุ์	คุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการ					
	Gram's staining	Flagella	Spore	Anaerobes	4°C (Growth)	42°C (Growth)
ERO 001	positive/ rod	peritrichous	+	-	+	*Not tested*
EWC 065	positive/ rod	peritrichous	+	-	+	*Not tested*
RCO 010	positive/ rod	peritrichous	+	-	+	*Not tested*
RWC 021	positive/ rod	peritrichous	+	-	+	*Not tested*
SSMIX 013	positive/ rod	peritrichous	+	-	+	*Not tested*
SSMIX 020	positive/ rod	peritrichous	+	-	+	*Not tested*
SSMIX 023	positive/ rod	peritrichous	+	-	+	*Not tested*
SSMIX 025	positive/ rod	peritrichous	+	-	+	*Not tested*
ECO 008	negative/rod	>1	*Not tested*	-	+	-
SSWC 110	negative/rod	>1	*Not tested*	-	+	-



ภาพที่ 4.26 คุณสมบัติสัณฐานวิทยาบางประการของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.16 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยา

จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ พบว่ามีลักษณะเหมือน และ/หรือ แตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 4.31; ภาพที่ 4.27; ภาพที่ 4.28) ซึ่งเมื่อข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียที่มีการบรรยายลักษณะต่างๆ ไว้ในหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner *et al.* 2005) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (Barrow and Feltham. 2004) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition (Holt *et a.l* 1994) และ A Colour Atlas of Bacillus species (Parry *et al.* 1988) จากผลการทดสอบที่ได้สามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 3 ชนิดคือ

Bacillus subtilis ได้แก่แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSMIX 025 ซึ่งให้ผลการทดสอบตามตารางที่ 4.31

Pseudomonas fluorescens ได้แก่แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสายพันธุ์ ECO 008 ซึ่งให้ผลการทดสอบตามตารางที่ 4.31

Pseudomonas putida ได้แก่แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสายพันธุ์ SSWC 110 ซึ่งให้ผลการทดสอบตามตารางที่ 4.31

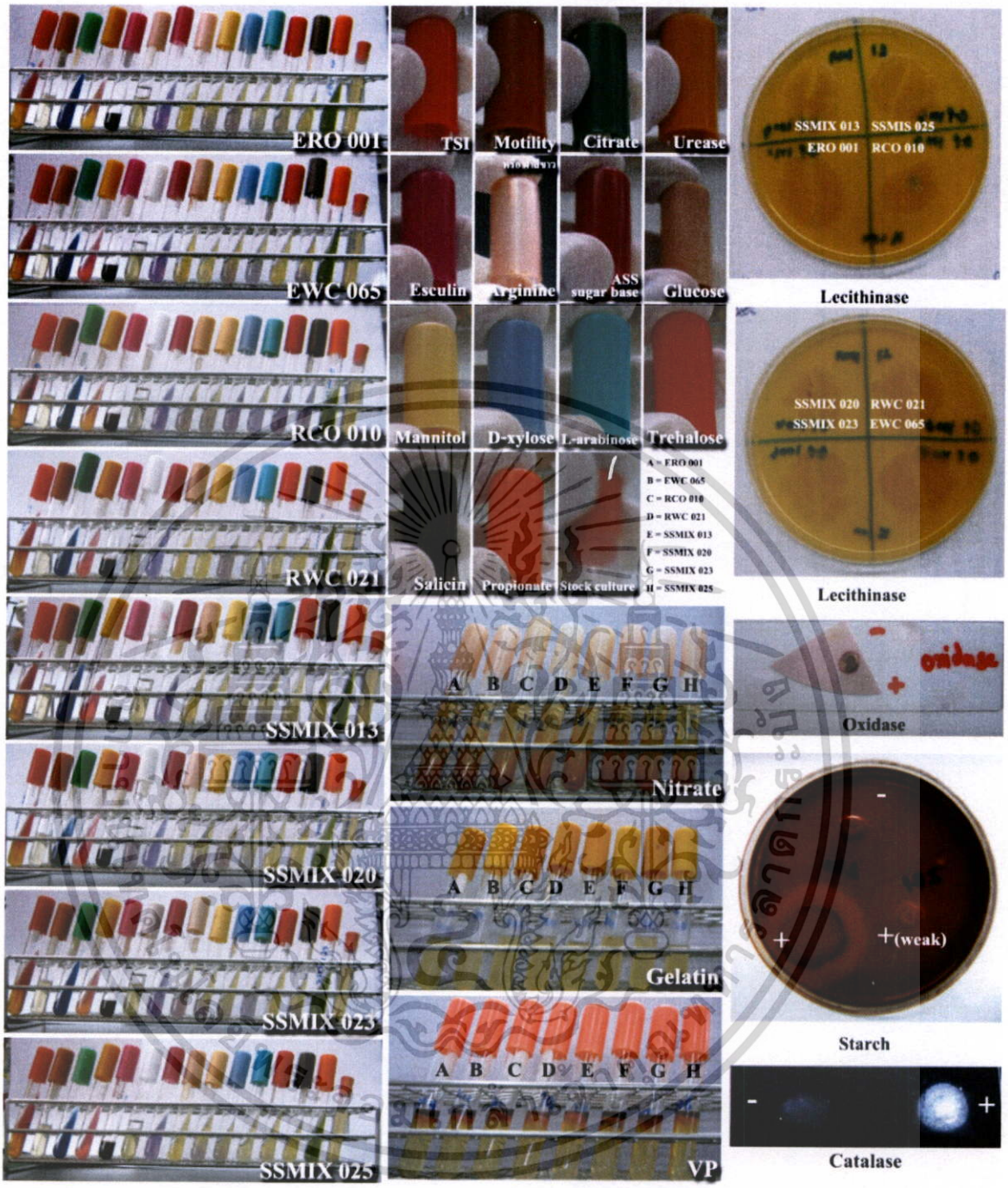
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.31 คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ

การทดสอบ	คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการของแบคทีเรียสายพันธุ์									
	ERO 001	**EWC 065**	**RCO 010**	**RWC 021**	**SSMIX 013**	**SSMIX 020**	**SSMIX 023**	**SSMIX 025**	**ECO 008**	**SSWC 110**
Triple sugar iron	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/K	K/K
Hydrogen sulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+		
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Nitrogen gas	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	-	-
Starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+(weak)	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Acetate	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lecithinase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

ตารางที่ 4.31 (ต่อ)

การทดสอบ	คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการของแบคทีเรียสายพันธุ์									
	ERO 001	**EWC 065**	**RCO 010**	**RWC 021**	**SSMIX 013**	**SSMIX 020**	**SSMIX 023**	**SSMIX 025**	**ECO 008**	**SSWC 110**
Carbohydrate										
Sugar base	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose/gas	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	+
Lactose	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	-	-
Maltose	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	-	-
Adonitol	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	-	-
Fructose	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	*Not tested*	*Not tested*
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	*Not tested*	*Not tested*
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	*Not tested*	*Not tested*
Propionate	-	-	-	-	-	-	-	-	*Not tested*	*Not tested*
Dihydrolyse arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Decarboxylate lysine	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	-	-
Decarboxylate ornithine	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	*Not tested*	-	-



ภาพที่ 4.27 คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการ ของแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.28 คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการ ของแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ

4.17 การจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. ด้วยวิธี 16s rRNA

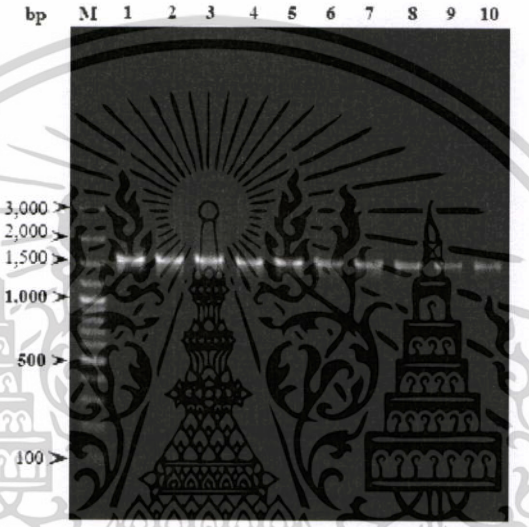
การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยการเปรียบเทียบความเหมือน เนื่องจากยีนในส่วน 16S rRNA เป็นส่วนของไรโบโซมที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิด อีกทั้งไรโบโซมมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ ซึ่งมีการอนุรักษ์ในระดับที่เหมาะสม และ rRNA ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะแน่นอน จึงนำมาใช้สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตโดยผลการทดลองพบว่า

การสกัด Chromosomal DNA จากแบคทีเรียแกรมลบ โดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ An *et al.* 2005 และ แบคทีเรียแกรมบวกโดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Tajima *et al. 1999* และนำไปวิเคราะห์ DNA ด้วยด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยมี 1 kb DNA ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่า Chromosomal DNA แบคทีเรียที่มีศักยภาพทุกสายพันธุ์ให้แถบ Chromosomal DNA ที่สูงกว่าขนาด 10,000 bp (ภาพที่ 4.29)

ภาพที่ 4.29 ผลการสกัด Chromosomal DNA ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. โดย Marker: 1 kb DNA ladder, 1: ERO 001, 2: EWC 065, 3: RCO 010, 4: RWC 021, 5: SSMIX 013, 6: SSMIX 020, 7: SSMIX 023, 8: SSMIX 025, 9: ECO 008 และ 10: SSWC 110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำ Chromosomal DNA มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรียคือ BSF8/20 และ REVB หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครบจำนวน 35 รอบได้นำมาวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี 100 bp plus DNA Ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตพบว่า ผลผลิตพีซีอาร์จากแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 4.30)

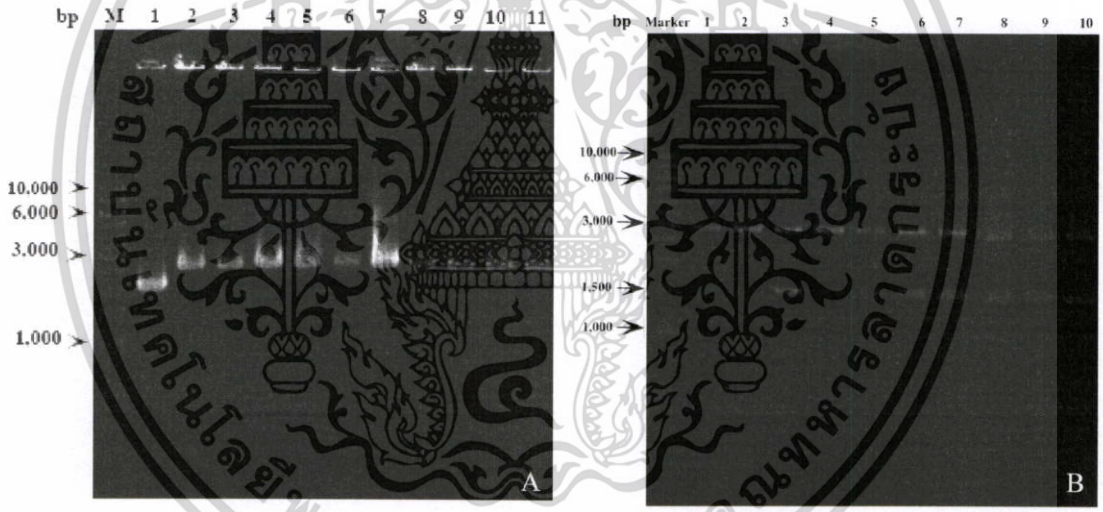


ภาพที่ 4.30 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. โดย M: 100 bp plus DNA Ladder, 1: ERO 001, 2: EWC 065, 3: RCO 010, 4: RWC 021, 5: SSMIX 013, 6: SSMIX 020, 7: SSMIX 023, 8: SSMIX 025, 9: ECO 008 และ 10: SSWC 110

จากการนำชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB ที่มีขนาด 1,500 pb และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T และการเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์อาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase และใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลลาร์ผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวคเตอร์เท่ากับ 3:1 จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ทั้งหมดมาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ Competent cell *E.coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock และคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin, X-Gal และ IPTG เนื่องจากในพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T นั้นมียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin และมี *LacZ* gene ที่ทำหน้าที่เป็น Selective gene สำหรับการทำงานของ *lacZ* gene นั้นจะถูกชักนำด้วยสารละลาย IPTG ให้ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase เพื่อย่อย Substrate X-gal ได้เป็นตะกอนสีฟ้า แต่ถ้าโคโลนีที่มีการเชื่อมผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์จะไปหยุดการแสดงออกของ *LacZ*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gene ทำให้ได้โคโลนีเป็นสีขาว ดังนั้นจึงใช้ blue white screening เป็นวิธีในการตรวจสอบชิ้นยีนเป้าหมาย จากนั้นจึงสุ่มคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามีผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการมาเก็บไว้เป็นเพลทต้นแบบ (Master plates) จากนั้นสุ่มพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี 100 bp plus DNA Ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยมีพลาสมิดเวคเตอร์ที่ไม่ได้รับการสอดแทรกด้วย 16S rRNA gene เป็นตัวเปรียบเทียบ และให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งการทดลองพบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ส่วนของพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene มีขนาดที่มากกว่าพลาสมิดเวคเตอร์ที่ไม่ได้รับการสอดแทรกด้วย 16S rRNA gene (ภาพที่ 4.31A) และตรวจสอบพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 4.31 B)



ภาพที่ 4.31 ผลของพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp. (A) และ การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI (B) โดย M: 1 kb DNA ladder, 1: พลาสมิดเวคเตอร์ที่ไม่ได้รับการสอดแทรก, 2: ERO 001, 3: EWC 065, 4: RCO 010, 5: RWC 021, 6: SSMIX 013, 7: SSMIX 020, 8: SSMIX 023, 9: SSMIX 025, 10: ECO 008 และ 11: SSWC 110

จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้ไพรเมอร์ M13F (-29) ในด้าน Forward และใช้ไพรเมอร์ M13R (-20) ทำการต่อสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ด้าน Forward และ Reverse ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Version 7.0.9.0 และนำสายของนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราห์ค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเตอร์เน็ต ที่ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ซึ่งให้ผลดังนี้

แบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,492 เบสซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Pseudomonas putida* strain J312 (GenBank No.: EF203210) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,498 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.32)

แบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,513 เบสซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,513 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.33)

แบคทีเรียสายพันธุ์ EWC 065 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,575 เบสซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,513 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34)

แบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,575 เบสซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus lichentiformis* (GenBank No.: AY971527) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,514 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.35)

แบคทีเรียสายพันธุ์ RWC 021 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,524 เบส และ แบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 023 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,550 เบส ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,513 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ (RWC 021: ภาพที่ 4.36, SSMIX 023: ภาพที่ 4.39)

แบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 013 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,538 เบสซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,513 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.37)

แบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 020 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,469 เบสซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* strain DYU1 (GenBank No.: EF442670) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,477 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.38)

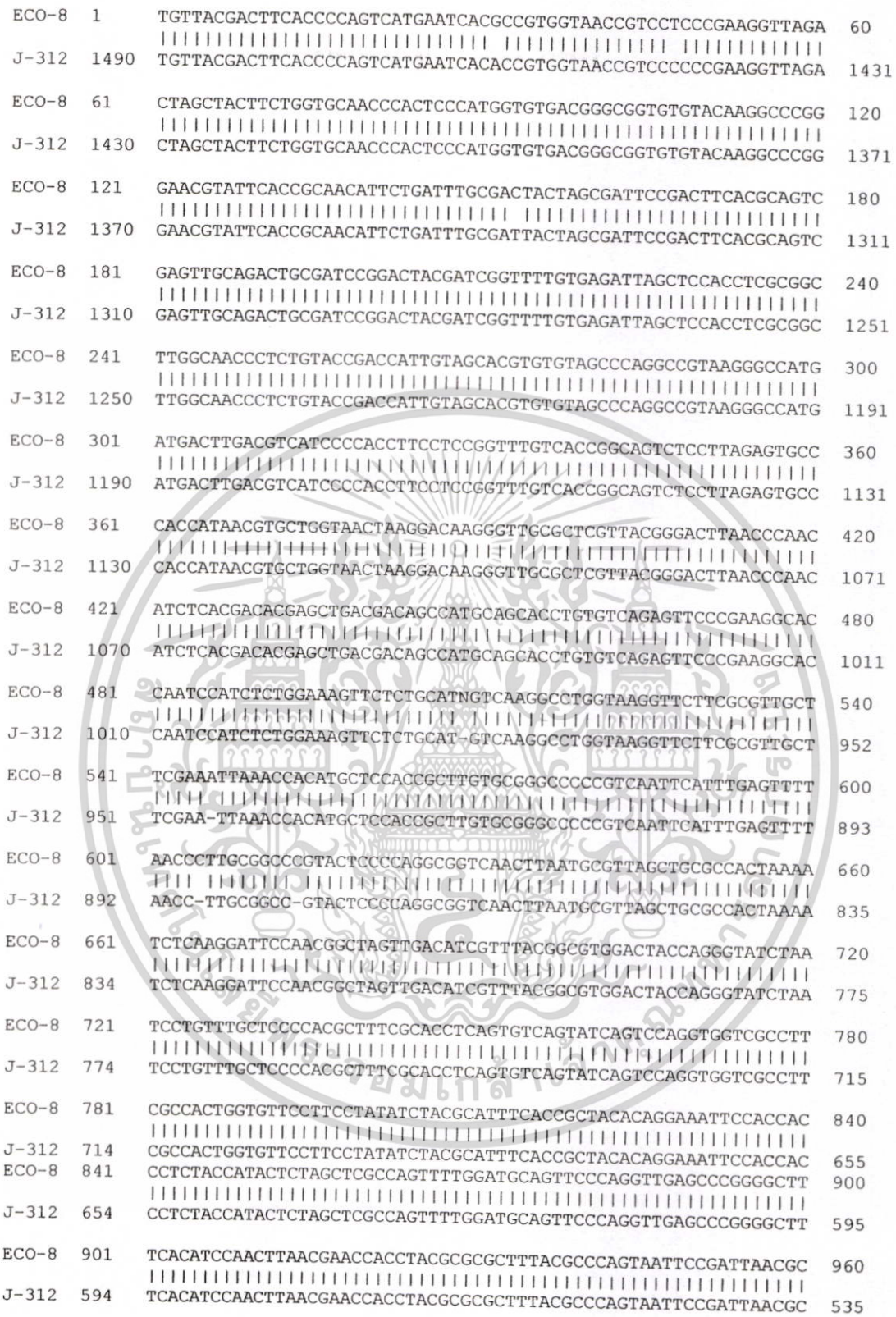
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 025 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,554 เบสซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,513 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 91 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.40)

แบคทีเรียสายพันธุ์ SSWC 110 ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,572 เบสซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Pseudomonas putida* strain BM2 (GenBank No.: DQ989291) ที่มีความยาวเบสของลำดับเบสของยีน 16S rRNA เท่ากับ 1,547 เบส ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.41)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.32 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 008 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Pseudomonas putida* strain J312 (GenBank No.: EF203210) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
ECO-8   961   CTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGGGCTTATTCTGTCGG  1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
J-312   534   TTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCGG   475

ECO-8  1021   TAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAGCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTAC  1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
J-312   474   TAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAGCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTAC   415

ECO-8  1081   AATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCA  1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
J-312   414   AATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCA   355

ECO-8  1141   ATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTG  1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
J-312   354   ATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTG   295

ECO-8  1201   ATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACCTACTAG  1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
J-312   294   ATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACCTACTAG   235

ECO-8  1261   CTAATCCGACCTAGGCTCATCTTATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGT  1320
              |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
J-312   234   CTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGT   175

ECO-8  1321   AGGACGTATGCGGTATTAGCGCTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCCACTACCAGGCAGATTC  1380
              |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
J-312   174   AGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCCACTACCAGGCAGATTC   115

ECO-8  1381   CTAGGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGA  1440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
J-312   114   CTAGGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGA    55

ECO-8  1441   CTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACT  1492
              |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| |||||||||
J-312    54   CTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGCTCAATCTGAGCCATGATCAAACT
```

ภาพที่ 4.32 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
ERO-1  3    GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG  62
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1    GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG  60

ERO-1  63   GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC  122
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  61   GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC  120

ERO-1  123  CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAA  182
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
WD-23  121  CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAA  180

ERO-1  183  CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  242
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  181  CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  240

ERO-1  243  ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  302
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  241  ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  300

ERO-1  303  GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  362
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  301  GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  360

ERO-1  363  AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  422
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  361  AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  420

ERO-1  423  GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG  482
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  421  GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG  480

ERO-1  483  ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  542
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  481  ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  540

ERO-1  543  TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  602
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  541  TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  600

ERO-1  603  ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG  662
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  601  ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG  660

ERO-1  663  AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA  722
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  661  AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA  720

ERO-1  723  GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  782
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  721  GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  780

ERO-1  783  ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT  842
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  781  ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT  840

ERO-1  843  TTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA  902
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  841  TTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA  900

ERO-1  903  AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  962
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  901  AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  960
```

ภาพที่ 4.33 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการใช้

```
ERO-1  963   TCGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGG  1022
             ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  961   TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGG  1020

ERO-1  1023  ACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA  1082
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1021  ACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA  1080

ERO-1  1083  GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTT  1142
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1081  GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTT  1140

ERO-1  1143  GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA  1202
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1141  GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA  1200

ERO-1  1203  TCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGA  1262
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1201  TCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGA  1260

ERO-1  1263  AACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT  1322
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1261  AACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT  1320

ERO-1  1323  CGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT  1382
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1321  CGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT  1380

ERO-1  1383  CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTG  1442
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1381  CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTG  1440

ERO-1  1443  AGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAA  1502
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1441  AGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAA  1500

ERO-1  1503  CAAGGTAACC  1512
             ||||||||||
WD-23  1501  CAAGGTAACC  1510
```

ภาพที่ 4.33 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
EWC65  33   GAGTTTGATCCTGCGCTCTTCGACGAACGTCTGTGCGGCGTGCCTAACACATGTCACTCT  92
WD-23   1   GAGTTTGATCCTG-GCTCAG-GACGAACG-CTG-GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG  56

EWC65  93   TTGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCC-TGATGTTAGCTGCGCCCGGGTGAGTAACACGTGG  151
WD-23  57   A-GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG  115

EWC65  152  GTCACCTGCCTGCCCCCCTGGGATAACTCCCGGAAACCGGGGCTAATCTCGGATGCTCCT  211
WD-23  116  GTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT  175

EWC65  212  CCCGAACCGTCTGGTTCAAACATAACACGTGGTTTCCGTTCCCACTTACAGATGGACCCC  271
WD-23  176  TT-GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCG  234

EWC65  272  CGGCGTCTTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACCATGCCTCGCCGACCT  331
WD-23  235  CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT  294

EWC65  332  CAGACGGTCATCCCCCACTCTGCCCACTGCAGACACGGCCCCAACTCCCACGCGCCCCAG  391
WD-23  295  GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG-ACTG-AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  352

EWC65  392  TAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACCACCGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  451
WD-23  353  CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  412

EWC65  452  AGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCG  511
WD-23  413  AGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCG  472

EWC65  512  GTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  571
WD-23  473  GTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  532

EWC65  572  TACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCT  631
WD-23  533  TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCT  592

EWC65  632  TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGCTGGGGAACTT  691
WD-23  593  TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT  652

EWC65  692  GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG  751
WD-23  653  GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG  712

EWC65  752  GAACACCAGTGGCGAACGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG  811
WD-23  713  GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG  772

EWC65  812  GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  871
WD-23  773  GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG-  831

EWC65  872  TTAggggggTTTTCCCGCCCCTTAGTGCTGCACCTAACGTCATTAAGCACTCCGCCTGG  931
WD-23  832  TTAGGGGG----TTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG-CATTAAGCACTCCGCCT-G  885

EWC65  932  GGGACTCACCGGTCCGCAAAGACTGAAAACTTCAAAAGGGAAATTTGACCGGGGGCTCCG  991
WD-23  886  GGGAGT--ACGGT-CGC-AAGACTGAAA--CTCAAA--GGAA--TTGA-CGGGGGC-CCG  933
```

ภาพที่ 4.34 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ EWC 065 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
EWC65  992   CACCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT  1051
             ||  ||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  934   CA-CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT-CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT  991

EWC65  1052  TGACACCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCTCCCTTCGGGGGCAGAGTGACACGTG  1111
             |||||  |||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||  |||
WD-23  992   TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTC-CCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTG  1050

EWC65  1112  CGTGCATGGTTGTCGATCAGCCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  1171
              |||||||||||||  ||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1051  -GTGCATGGTTGTCG-TCAG-CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  1107

EWC65  1172  GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC  1231
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1108  GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC  1167

EWC65  1232  AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAC  1291
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1168  AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAC  1227

EWC65  1292  ACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAA  1351
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1228  ACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAA  1287

EWC65  1352  ATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT  1411
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1288  ATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT  1347

EWC65  1412  AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA  1471
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1348  AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA  1407

EWC65  1472  CACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCG  1531
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1408  CACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCG  1467

EWC65  1532  AAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1574
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1468  AAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1510
```

ภาพที่ 4.34 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
RCO10  2     GGTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAA  61
             || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  1529  GGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAA  1470

RCO10  62    AAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC  121
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  1469  AAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC  1410

RCO10  122   AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTT  181
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  1409  AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTT  1350

RCO10  182   CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAA  241
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  1349  CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAA  1290

RCO10  242   CCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA  301
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  1289  CCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA  1230

RCO10  302   AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT  361
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  1229  AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT  1170

RCO10  362   TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  421
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  1169  TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  1110

RCO10  422   ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCG  481
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  1109  ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCG  1050

RCO10  482   AAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTTCG  541
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Blich  1049  AAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT-CG  991

RCO10  542   CGTTGCCTCGAATTAAACCACATGCGCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTG  601
             |||||| ||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  990   CGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTG  931

RCO10  602   AGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACT  661
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  930   AGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACT  871

RCO10  662   AAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTA  721
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  870   AAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTA  811

RCO10  722   TCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTC  781
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  810   TCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTC  751

RCO10  782   GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCC  841
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  750   GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCC  691

RCO10  842   ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGG  901
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  690   ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGG  631

RCO10  902   GGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGAC  961
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  630   GGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGAC  571
```

ภาพที่ 4.35 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus licheniformis* (GenBank No.: AY971527) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
RCO10  962   AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGG  1021
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  570   AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGG  511

RCO10  1022  TTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAG  1081
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  510   TTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAG  451

RCO10  1082  CTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCAT  1141
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  450   CTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCAT  391

RCO10  1142  TGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTG  1201
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  390   TGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTG  331

RCO10  1202  TGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACC  1261
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Blich  330   TGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACC  271

RCO10  1262  AACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTT  1321
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  270   AACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTT  211

RCO10  1322  GAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGT  1381
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  210   GAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGT  151

RCO10  1382  CTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGC  1441
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Blich  150   CTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCACCGCTAACATCAGGGAGCAAGC  91

RCO10  1442  TCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCA  1501
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Blich  90    TCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCA  31

RCO10  1502  GGATCAAACTCTA  1514
             |||||||||||||
Blich  30    GGATCAAACTCTA  18
```

ภาพที่ 4.35 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
RWC21   3     GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG  62
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   1     GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG  60

RWC21   63    GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC  122
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   61    GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC  120

RWC21   123   CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAA  182
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
WD-23   121   CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAA  180

RWC21   183   CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  242
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   181   CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  240

RWC21   243   ATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  302
              ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   241   ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  300

RWC21   303   GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  362
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   301   GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  360

RWC21   363   AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  422
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   361   AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  420

RWC21   423   GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG  482
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   421   GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG  480

RWC21   483   ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  542
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   481   ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  540

RWC21   543   TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  602
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   541   TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  600

RWC21   603   ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG  662
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   601   ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG  660

RWC21   663   AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA  722
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   661   AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA  720

RWC21   723   GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  782
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   721   GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  780

RWC21   783   ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTTAGGGGG  842
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
WD-23   781   ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG-TTAGGGGG  839

RWC21   843   TTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC  902
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   840   TTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC  899

RWC21   903   AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAATGGGGGTTT  962
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  | |||||
WD-23   900   AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA--TGTGGTTT  957
```

ภาพที่ 4.36 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RWC 021 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้มีการดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
RWC21   963  AATTCGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT  1022
             ||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   958  AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT  1017

RWC21  1023  AGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTTTGACAAGGTGGGTTGCAATGGGTTGTTCGTCAGC  1082
             |||||||||||||||||||||||  ||||  ||||||  ||||  |||||  ||||||||
WD-23  1018  AGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAG--TGAC-AGGTGG--TGCA--TGGTTG-TCGTCAGC  1069

RWC21  1083  TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCC  1142
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1070  TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCC  1129

RWC21  1143  AGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  1202
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1130  AGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  1189

RWC21  1203  ACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA  1262
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1190  ACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA  1249

RWC21  1263  AAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC  1322
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1250  AAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC  1309

RWC21  1323  AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG  1382
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1310  AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG  1369

RWC21  1383  GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACC  1442
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1370  GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACC  1429

RWC21  1443  CGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGG  1502
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1430  CGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGG  1489

RWC21  1503  TGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1523
             |||||||||||||||||||||
WD-23  1490  TGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1510
```

ภาพที่ 4.36 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SSM13   3     GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG  62
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   1     GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG  60

SSM13   63    GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC  122
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   61    GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC  120

SSM13   123   CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAA  182
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
WD-23   121   CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAA  180

SSM13   183   CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  242
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   181   CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  240

SSM13   243   ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  302
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   241   ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  300

SSM13   303   GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  362
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   301   GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  360

SSM13   363   AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  422
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   361   AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  420

SSM13   423   GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG  482
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   421   GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG  480

SSM13   483   ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  542
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   481   ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  540

SSM13   543   TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  602
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23    541  TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  600

SSM13   603   ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG  662
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   601   ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG  660

SSM13   663   AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA  722
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   661   AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA  720

SSM13   723   GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  782
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   721   GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  780

SSM13   783   ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG  842
              |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   781   ACAGGATTAGATACCCTGGTAGT-CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG  839

SSM13   843   GTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTTAAAGCACTCCCGCCCCTGGGGGAAGTA  902
              |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||  | |||||||  ||||
WD-23   840   TTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT--AAGCACTC---CGCCTGGGG--AGTA  892

SSM13   903   CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAAGCC  962
              |||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||| |||
WD-23   893   CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG-AATTGACGGGGGCCCGCAC-AAGCGGTGG-AGC-  948
```

ภาพที่ 4.37 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 013 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ ให้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ยกเว้นการอ้างอิงที่ถูกต้องเหมาะสม ผู้ใช้งานจะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SSM13   963   AATGGGGGGTTTAAATTTCGAAAGCAAACCCCCGAAAAGAAACCCTTACCAGGTCTTGAC  1022
              ||  | |||||||  |||| ||||||      ||  |||||  ||||||||||||||||||
WD-23   949   -AT--GTGGTTTAA--TTCG-AAGCAA-----CGCGAAGAA--CCTTACCAGGTCTTGAC   995

SSM13  1023   ATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCA  1082
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   996   ATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCA  1055

SSM13  1083   TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  1142
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1056   TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  1115

SSM13  1143   TGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA  1202
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1116   TGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA  1175

SSM13  1203   GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  1262
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1176   GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  1235

SSM13  1263   CAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTC  1322
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1236   CAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTC  1295

SSM13  1323   TCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG  1382
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1296   TCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG  1355

SSM13  1383   ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA  1442
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1356   ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA  1415

SSM13  1443   GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGG  1502
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1416   GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGG  1475

SSM13  1503   ACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1537
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1476   ACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1510
```

ภาพที่ 4.37 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SSM20  2     GGTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAA  61
             || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  1477  GGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAA  1418

SSM20  62    AAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC  121
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  1417  AAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC  1358

SSM20  122   AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTT  181
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  1357  AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTT  1298

SSM20  182   CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAA  241
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  1297  CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAA  1238

SSM20  242   CCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA  301
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  1237  CCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA  1178

SSM20  302   AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT  361
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  1177  AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT  1118

SSM20  362   TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  421
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  1117  TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  1058

SSM20  422   ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCG  481
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  1057  ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCG  998

SSM20  482   AAGGAGGACGTCCTATCTCTAGGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCCTGGTAAAGGTTCT  541
             |||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| |||||| ||||||
DYU-1  997   AAGG-GGACGTCCTATCTCTAGG-ATTGTCAGAGGATGTCAAGACC-TGGTAA-GGTTCT  942

SSM20  542   TCGCGTTGCTTCGAATTAAACCCACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC  601
             |||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  941   TCGCGTTGCTTCGAATTAAACCA--CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC  884

SSM20  602   CTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC  661
             |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  883   CTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCC-AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC  825

SSM20  662   AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTAC  721
             |||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  824   AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCC-TAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTAC  766

SSM20  722   CAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCA  781
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  765   CAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCA  706

SSM20  782   GAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTG  841
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  705   GAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTG  646

SSM20  842   GAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTG  901
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  645   GAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTG  586

SSM20  902   AGCCGGGGGCTTTCACATCAAACTTAAAAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAAT  961
             |||||||||||||||||||  |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  585   AGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAAT  526
```

ภาพที่ 4.38 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 020 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain DYU1 16S (GenBank No.: EF442670) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SSM20  962   TCCGGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGG  1021
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  525   TCCGGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGG  466

SSM20  1022  CTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAA  1081
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  465   CTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAA  406

SSM20  1082  CAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTT  1141
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  405   CAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTT  346

SSM20  1142  TCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAG  1201
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  345   TCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAG  286

SSM20  1202  TCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTT  1261
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  285   TCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTT  226

SSM20  1262  ACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTT  1321
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  225   ACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTT  166

SSM20  1322  TTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTT  1381
              |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  165   TTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTT  106

SSM20  1382  ATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGG  1441
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DYU-1  105   ATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGG  46

SSM20  1442  GAGCAAGCACCCATCTGTCCGCTCGACT  1469
              |||||||| ||||||||||||||||||
DYU-1  45    GAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACT  18
```

ภาพที่ 4.38 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SSM23  27    GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG  86
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1     GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG  60

SSM23  87    GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC  146
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  61    GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC  120

SSM23  147   CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAA  206
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
WD-23  121   CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAA  180

SSM23  207   CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  266
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  181   CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  240

SSM23  267   ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  326
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  241   ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  300

SSM23  327   GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  386
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  301   GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  360

SSM23  387   AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  446
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  361   AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  420

SSM23  447   GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG  506
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  421   GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG  480

SSM23  507   ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  566
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  481   ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  540

SSM23  567   TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  626
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  541   TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG  600

SSM23  627   ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG  686
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  601   ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG  660

SSM23  687   AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA  746
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  661   AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA  720

SSM23  747   GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  806
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  721   GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  780

SSM23  807   ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGG  866
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
WD-23  781   ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA-GGGGG  839

SSM23  867   TTTCCGCCCCTTTACTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCCGCCTGGGGGAGTACGGT  926
             |||||||||| ||| |||||||||||||||||||||||| |||||| ||||||||||||
WD-23  840   TTTCCGCCCC-TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT-CCGCCT-GGGGAGTACGGT  896

SSM23  927   CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCCGGTGGAGCATGTGGT  986
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
WD-23  897   CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG-CGGTGGAGCATGTGGT  955
```

ภาพที่ 4.39 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 023 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SSM23  987   TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAG  1046
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  956   TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAG  1015

SSM23  1047  CATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAGCTGACAGGGTGGGTGCCATGGGTTGTTCGTCA  1106
              |||||||| ||||||||||||||||| |||||||    |||| ||| ||||| ||||||
WD-23  1016  -ATAGGACGT-CCCCTTCGGGGGCAGAG-TGACAGG--TGGTG-CAT-GGTTG-TCGTCA  1067

SSM23  1107  GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG  1166
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1068  GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG  1127

SSM23  1167  CCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  1226
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1128  CCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  1187

SSM23  1227  TGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAA  1286
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1188  TGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAA  1247

SSM23  1287  CAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATC  1346
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1248  CAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATC  1307

SSM23  1347  GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG  1406
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1308  GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG  1367

SSM23  1407  CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACA  1466
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1368  CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACA  1427

SSM23  1467  CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGG  1526
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1428  CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGG  1487

SSM23  1527  GGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1549
             |||||||||||||||||||||||
WD-23  1488  GGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1510
```

ภาพที่ 4.39 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SSM25   3     GCGGCCCGCCTAACACATGCGGCGTCCAGCGGACAAACGGGCAGCTTGCTCCCTGATGTT  62
              |||||  ||||||  ||||||   |||  ||||||||  |  |||  ||||||||||||||||||
WD-23   31    GCGGCGTGCCTAATACATGCAA-GTCGAGCGGACAGATGGG-AGCTTGCTCCCTGATGTT  88

SSM25   63    ACCCGGCCGACGGCTGACTAACACGTGCCTAACCTGCCTGCAAAACTGGGCATAACTCCC  122
              |  |  |||  |||||  |||  |||||||||  ||||||||||  ||  ||||||  ||||||||
WD-23   89    AGC-GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG-ATAACTCCG  146

SSM25   123   GGAAACCGGGGCTAATACCCGGATGCTTATTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTG  182
              ||||||||||||||||||  |||||  ||  ||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   147   GGAAACCGGGGCTAATACC-GGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTG  205

SSM25   183   GCTTCCGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  242
              |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   206   GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  265

SSM25   243   TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCCCACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG  302
              ||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   266   TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCG-ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG  324

SSM25   303   ACACGGCCCACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCCCAATGGACGAAAGTC  362
              |||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||
WD-23   325   ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC  384

SSM25   363   TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG  422
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23   385   TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG  444

SSM25   423   GAAGAACCAAGTACCGTTCCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGCAAAGCCA  482
              ||||||  ||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||
WD-23   445   GAAGAA-CAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAG-AAAGCCA  502

SSM25   483   CGGCTAACTACATGCCAGCAGCCGCGGTAATACGCAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA  542
              ||||||||||  ||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||
WD-23   503   CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA  562

SSM25   543   TTGGGCGTAAAGGGCTCGCACGCGGTTTCTTAAGTCTGATAGTGAAAGCCCCCTTGAGTC  602
              ||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||  ||||||||||  |  |
WD-23   563   TTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT-GTGAAAGCCCCC----GGC  617

SSM25   603   TCAACCGTGGGAGGGTCATTGGACAACAGGTTGGAAGCTTGAGTGCATGAAGAGGAGAGT  662
              |||||||  ||||||||||||||  |||  ||  ||||  ||||||||||  |||||||||||
WD-23   618   TCAACCG-GGGAGGGTCATTGGA-AACTGG--GGAA-CTTGAGTGCA-GAAGAGGAGAGT  671

SSM25   663   GGAATTCCACGCGTAGCGGTGAAATGAGTAGAGATGTGGAGGAATTCACCAGTGGCGAAG  722
              ||||||||||  ||||||||||||||  ||||||||||||||||  ||||||||||||||
WD-23   672   GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA--CACCAGTGGCGAAG  729

SSM25   723   GCGACACTCTGGTCTGTAAACTGACGCTGCAGGAGCGAATAGAGAGGGGAGCGAACAGGA  782
              |||||  ||||||||||  ||||||||||  |||||||||  ||  |  ||||||||||||||
WD-23   730   GCGACTCTCTGGTCTGT-AACTGACGCTG-AGGAGCGAA-AGCGTGGGGAGCGAACAGGA  786

SSM25   783   TTAGATACCCTGGAAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTCCTAAGTGTTCAGCGGGGTCTTC  842
              ||||||||||||  ||||||||||||||||||||||  |||||||||  ||  |||||  |||
WD-23   787   TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT-AG-GGGGT-TTC  843

SSM25   843   CACGCCCCTTTAGTGCTGCAGCTCAATCGTCAGTTAAGCACTCCCGACCTAGAGAGTACG  902
                ||||||  ||||||||||||||  |  ||  ||  ||||||||||  |||  |  |||||||
WD-23   844   --CGCCCC-TTAGTGCTGCAGCT--AACG-CA-TTAAGCACTCC--GCCTGGGGAGTACG  894

SSM25   903   GTTCGCAATGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCTCCGCATCAAGCGGTGGACGCA  962
              |  ||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  ||||||||||  |||
WD-23   895   G-TCGCAA-GACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC-CCGCA-CAAGCGGTGGA-GCA  949
```

ภาพที่ 4.40 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSMIX 025 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Bacillus subtilis* strain WD23 (GenBank No.: EU780682) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 91 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SSM25  963   CTCATCGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTTACCACGGTTCTTTGAACAATCCT  1022
             ||||||||||||||||||||||||||||| |||||| ||| |||| |||| 
WD-23  950   ---TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC-TTACCA-GGT--CTTGA--CATCC-  999

SSM25  1023  TCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCAGTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTCCGCA  1082
             |||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||| |||
WD-23  1000  TCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCC--TTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGT--GCA  1055

SSM25  1083  TGGTTGTCGACAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGCGTTAAGTCCCGACAATCGAGCGCAACC  1142
             ||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||| ||| ||||||||||
WD-23  1056  TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG-CAA-CGAGCGCAACC  1113

SSM25  1143  CTTGATCTTAGATATGACCAGCATTCAGTTGCGAGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA  1202
             |||||||||||  | |||||||||||||  | ||||||||||||||||||||||||
WD-23  1114  CTTGATCTTAG---TTGCCAGCATTCAGTT--GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA  1168

SSM25  1203  AACCGGAGGAAGGTGCGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACA  1262
             |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1169  AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACA  1228

SSM25  1263  CGTACTATCAATGGACAGAACAAAGGGCATGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACA  1322
             ||| ||| ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
WD-23  1229  CGTGCTA-CAATGGACAGAACAAAGGGCA-GCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACA  1286

SSM25  1323  AATCGGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACGTCGACTGCGTCAAGCTGGAATCAGCT  1382
             |||| |||||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||||| |||
WD-23  1287  AATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAAC-TCGACTGCGTGAAGCTGGAATC-GCT  1344

SSM25  1383  AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGAATGTGAATACGTNTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC  1442
             |||||||||||||||||||||  |||||||||| |||||||||||||||||||||||
WD-23  1345  AGTAATCGCGGATCAGCATGCCG-CGGTGAATACGT-TCCCGGGCCTTGTACACACCGCC  1402

SSM25  1443  CGTCACACCACGAGAGTTCGTAACACCCGAAGTCCGTGAGGAAACCTTCATCAGGAGCCA  1502
             |||||||||||||||| |||||||||||||| |||||| |||||| | ||||||||
WD-23  1403  CGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTT--TTAGGAGCCA  1460

SSM25  1503  GCCTGCCGAAGGTGGGACAGATCATTGGCGTGAAGTCATAACAAGGTAACC  1553
             ||| |||||||||||||||| ||||| |||||||| ||||||||||||
WD-23  1461  GCC-GCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC  1510
```

ภาพที่ 4.40 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SW110   1     GTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
B-M-2   1515  GTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCCCCCGAA  1456

SW110   61    GGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B-M-2   1455  GGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA  1396

SW110   121   GGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCA  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B-M-2   1395  GGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCA  1336

SW110   181   CGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACC  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B-M-2   1335  CGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACC  1276

SW110   241   TCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAG  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B-M-2   1275  TCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAG  1216

SW110   301   GGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTA  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B-M-2   1215  GGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTA  1156

SW110   361   GAGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTA  420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B-M-2   1155  GAGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTA  1096

SW110   421   ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACAGACNAGCCTATGCAGACAGCCTAGTGTGCAGT  480
              |||||||||||||||||||||||| ||| |||| |||||| || ||| |||| |||
B-M-2   1095  ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC-GAC-AGCC-ATGCAG-CA-CCT-GTGT-CAG-  1044

SW110   481   AGTTCCACGAGAGGCACCATACTCACATCTCTGGAATAGTACGTCGTACATGTCAGAGGA  540
              |||||| ||| |||||||| |  ||||||||||| ||| | || | |||||| |||
B-M-2   1043  AGTTCC-CGA-AGGCACCAATC---CATCTCTGGAA-AGTTC-TC-TGCATGTCA-AGG-  994

SW110   541   CGTGCGTAAGGGTTCTACGCGTTGCTAGCGAATTCAAACCACATGCTGCCACCGCTTATG  600
              | || |||| |||||| |||||||| |||||| |||||||||| |||||||||  ||
B-M-2   993   CCTG-GTAA-GGTTCTTCGCGTTGCT-TCGAATT-AAACCACATGCT-CCACCGCTTGTG  939

SW110   601   CGGGCACCAGTCGAATTCCATTTTAGAGTGTTGAACCGTGCGGGCCGTACTCCCGCAGGC  660
              ||||| || ||| |||||  ||  |||| || |||| ||| ||||||||||||  |||||
B-M-2   938   CGGGCCCCCGTC-AATTCACTT---GAGT-TTTAACCTTGC-GGCCGTACTCCC-CAGGC  886

SW110   661   GGTCAACTGAATGCGTTAGCTGAAGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCCAGTTGA  720
              |||||||| |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
B-M-2   885   GGTCAACTTAATGCGTTAGCTG-CGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGA  827

SW110   721   CATCAGTTTACGGCGTGAGACGACCGACGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC  780
              |||| |||||||||||| ||| ||| | ||||||||||||||||||||||||||||||
B-M-2   826   CATC-GTTTACGGCGTG-GACTACC-AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC  770

SW110   781   GCACCTCAAGTGTCAGTATCAGTCCAAGTGGTAACCTTCGCCACTGGATGTTCCTTCCGA  840
              ||||||| |||||||||||||||||| |||||  |||||||||||| |||||||||| |
B-M-2   769   GCACCTC-AGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGG-TGTTCCTTCCTA  712

SW110   841   TAGCGACGCATTTCGACAGCTACACGAGGAAATTCCACCACCCTCAACCGTACGCAAGCT  900
              || | ||||||||| || ||||||| |||||||||||||||||| ||||||| | ||||
B-M-2   711   TATCTACGCATTTC-ACCGCTACAC-AGGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCT  654

SW110   901   TACACAGTTTTGGAGGCAGCCCCCACGTTGAGCCCAGGGGCTTTCACATCCAACTTAACA  960
              | | |||||||||| ||||  |||| ||||||||| ||||||||||||||||||||||||
B-M-2   653   TGC-CAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCC-GGGGCTTTCACATCCAACTTAACA  596
```

ภาพที่ 4.41 ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SSWC 110 (เส้นบน) ที่มีความเหมือนกับเบสของ *Pseudomonas putida* strain BM2 (GenBank No.: DQ989291) (เส้นล่าง) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SW110   961   AACCACCTGGACGCGCGCTGGAAAACCAGTAATTCCGAGGAACCCTTGCACCGCTTCTGG  1020
              ||||||||  |||||||||  |  ||||||||||||  |||  |||||||  | ||||
B-M-2   595   AACCACCT--ACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCAC--CCTCTGT   540

SW110  1021   ATTACCGCGGGTGCTGGCACAAAATGATCCGGTGCGTGTTCTGTCGGGAATGTGAGGACA  1080
              ||||||||||  ||||||||||  | | | |||||||  | |||||||||  ||  ||  |  |||
B-M-2   539   ATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAAACA   480

SW110  1081   GCAGGGTATTAACTTACGAGCGTTCCGACCAAGTTAAAGGGATTTACAATCCGAAGACGT  1140
              |||  ||||||||||||||   | ||||  ||||  ||||||  | ||||||||||||||| |
B-M-2   479   GCAAGGTATTAACTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCT   420

SW110  1141   TCTTCACACGCGAGGCAGGAAGGGATCGAGCTTTCACCCATTGTCCAATATTCCCCAGTG  1200
              |||||||||  ||  ||||  |   |||||  ||||||  ||||||||||||||||||||  ||
B-M-2   419   TCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTG   360

SW110  1201   CTGCGTCCGGTAGGAGTCTGGAGCGGGTATCAGAGGCAGTGTGACTGATCATCGGGTCGG  1260
              ||||  |||  ||||||||||||||  ||  ||  ||||   ||||||||||||||||   ||  |
B-M-2   359   CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAG   300

SW110  1261   GCCAGTTACGCATCGTATCCGAGGTAAGCCATTACCTCGGCAACAAAGTAATCCGACCTA  1320
               |||||||||  |||||  ||  ||||  ||||||||||  |  ||||  |  ||||||||||||
B-M-2   299   ACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCCACCAACTAGCTAATCCGACCTA   240

SW110  1321   AGCTCATCGGATAGGTCAAGGCCGGGGAGGT-CCCAGCTTTCTCAAGTAGGAAGTGGAAG  1379
              |||||||  |||||  |||||||  |  ||||  |||  ||||||||  ||||||  ||    |
B-M-2   239   GGCTCATCTGATAGCGCAAGGCC-CGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCG   181

SW110  1380   GTATTAACGTTCCTGACGAAACGTTGTCCCCCAGGACCAGGCAGATTCATAGGCATTAAT  1439
              ||||||  |||||||  ||||||||||||||||||  ||||||||||||  |||||||||  |
B-M-2   180   GTATTAGCGTTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATTACT   121

SW110  1440   GCACCCGTCGGGCGGGGAATCAAGGAGCAAGCTCGCGTCATAGGCTGGACTGACATGTGT  1499
              ||||||||  | ||  ||||||||||||||||||  ||||||  |||  ||||  |||||||
B-M-2   120   -CACCCGTCCGCCGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTTGCATGTGT   62

SW110  1500   TAGGCCTGCGACCAGCG-TCAATGTGAGGCAGGATCAAACTCTAATCT--AGAGCATC  1554
              |||||||||  ||||||  |||||  ||||  ||||||||||||||||||||  ||||  |||
B-M-2    61   TAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACTCTAATCTCCAGAGGATC  4
```

ภาพที่ 4.41 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์มาการจัดหมวดหมู่ของเชื้อตั้งแต่ระดับ domain จนถึง genus โดยโปรแกรม Classifier (Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, release 7.8) ในฐานข้อมูล Ribosomal Database Project (http://rdp.cme.msu.edu; Cole *et al*. 2007) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์อยู่ใน domain: Bacteria จากนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ (ตารางที่ 4.32)

Phylum Proteobacteria, class Gammaproteobacteria, order Pseudomonadales, family Pseudomonadaceae, genus Pseudomonas คือแบคทีเรียสายพันธุ์ ECO 001 และ SSWC 110

Phylum: Firmicutes, class"Bacilli", order Bacillales, family Bacillaceae, Subfamily Bacillaceae, Supergenus Bacillus, genus Bacillus a คือแบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSMIX 025

เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของประชากรแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษากับฐานข้อมูล NCBI ได้เลขทะเบียนดังนี้คือ ECO008 (GQ926880), SSWC110 (GQ926881), ERO001 (GQ926882), EWC065 (GQ926883), RCO010 (GQ926884), RWC021 (GQ926885), SSMIX013 (GQ926886), SSMIX020 (GQ926887), SSMIX023 (GQ926888) และ SSMIX025 (GQ926889)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.32 การจัดหมวดหมู่ของเชื้อตั้งแต่ระดับ domain จนถึง genus จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Ribosomal Database Project

สายพันธุ์	Assignment Detail (for Confidence threshold: 95%)							
	domain	phylum	class	order	family	subfamily	supergenus	genus
ECO 008	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Pseudomonadales [100%]	Pseudomonadaceae [100%]	-	-	*Pseudomonas* [100%]
ERO 001	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	"Bacilli" [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [100%]	"Bacillaceae 1" [100%]	*Bacillus* [100%]	*Bacillus* a [100%]
EWC 065	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	"Bacilli" [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [100%]	"Bacillaceae 1" [100%]	*Bacillus* [100%]	*Bacillus* a [100%]
RCO 010	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	"Bacilli" [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [100%]	"Bacillaceae 1" [100%]	*Bacillus* [100%]	*Bacillus* a [100%]
RWC 021	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	"Bacilli" [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [100%]	"Bacillaceae 1" [100%]	*Bacillus* [100%]	*Bacillus* a [100%]
SSMIX 013	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	"Bacilli" [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [100%]	"Bacillaceae 1" [100%]	*Bacillus* [100%]	*Bacillus* a [100%]
SSMIX 020	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	"Bacilli" [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [100%]	"Bacillaceae 1" [100%]	*Bacillus* [100%]	*Bacillus* a [100%]
SSMIX 023	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	"Bacilli" [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [100%]	"Bacillaceae 1" [100%]	*Bacillus* [100%]	*Bacillus* a [100%]
SSMIX 025	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	"Bacilli" [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [88%]	"Bacillaceae 1" [73%]	*Bacillus* [73%]	*Bacillus* a [49%]
SSWC 110	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Pseudomonadales [100%]	Pseudomonadaceae [100%]	-	-	*Pseudomonas* [100%]

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การแยกเชื้อ และความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคจากเชื้อ *Pythium* spp.

ผลการแยกเชื้อ *Pythium* spp. จากผักกินใบที่แสดงอาการของโรครากเน่าที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยใช้อาหาร CMA+BNPRA สามารถพบเชื้อ *Pythium* spp. ที่มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ได้หลากหลายรูปแบบคือ การเจริญในรูปแบบ cottony การเจริญในรูปแบบ chrysanthemum การเจริญในรูปแบบ rosette และการเจริญในรูปแบบ radiate แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Pythium* spp. มีความหลากหลายในสายพันธุ์ของเชื้อ จึงทำการสุ่มเชื้อ *Pythium* spp. ที่แยกได้ตามความแตกต่างของโคโลนีไปทดสอบความรุนแรงในการเกิดโรค จากการทดลองพบเพียงลักษณะโคโลนีแบบ cottony จำนวน 2 สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรครากเน่ารุนแรงในพืช *L. sativa* cv. butter head และ *L. sativa* cv. Red coral ที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ solution culture เมื่อนำ *Pythium* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าไปจัดจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นเชื้อ *Pythium* ชนิด *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum*

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อที่ทำให้เกิดโรครากเน่าคือเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* ที่มีลักษณะการเจริญแบบ cottony บนอาหาร PDA อีกทั้งการรายงานของ Plaats-Niterink (1981) ยังพบว่าการเจริญในรูปแบบ cottony ของเชื้อ *Py. aphanidermatum* สามารถพบได้บนอาหาร potato-carrot agar และ อาหาร cornmeal agar อีกด้วย ส่วนเชื้อ *Py. myriotylum* เมื่อเจริญบนอาหาร potato-carrot agar พบเจริญในรูปแบบ radiate ซึ่งสรุปได้ว่าลักษณะการเจริญบนอาหารของเชื้อ *Pythium* spp. มีความแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของอาหารที่เชื้อเจริญ จากนั้นจึงทำการตรวจสอบลักษณะโคโลนี กับการเกิดโรคในพืชเมื่อเปรียบเทียบกับการรายงานในหนังสือ Monograph of The Genus *Pythium*. พบว่าเชื้อ *Pythium* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่ามีลักษณะโคโลนีอยู่หลากหลายรูปแบบได้แก่ รูปแบบ rosette, chrysanthemum และ radiate เมื่อพิจารณาถึงการเกิดโรครากเน่าจากเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* ในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่าเชื้อทั้งสองชนิด สามารถทำให้เกิดโรครากเน่าได้ในอีกหลายประเทศเช่นประเทศแคนาดา (Gull *et al.* 2004; Sutton *et al.* 2006) ทางตอนใต้ของแอฟริกา (Gutierrez and Melton. 2001; Mondal and Hyakumachi. 1999) ประเทศไต้หวัน (Huang and Lin. 1998) ประเทศญี่ปุ่น (Yamasaki *et al.* 2006) และอีกหลายประเทศรวมไปถึงการรายงานในประเทศไทยโดย Koohakan (2007) และยังพบเชื้อ *Pythium* spp. ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินชนิดอื่นด้วย เช่น *Py.*

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

irregulare (Gutierrez and Melton. 2001; Gull *et al*., 2004), *Py. acanthicum* (Gull *et al*., 2004), *Py. ultimum* (Huang and Lin. 1998) และ *Py. volutum* (Gutierrez and Melton. 2001)

5.2 แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช

แยกแบคทีเรียเขตรากพืชได้แบคทีเรียทั้งหมด 741 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ อัญชิกา สวัสดิ์วนิช. (2546) พบว่าจากการแยกแบคทีเรียเขตรากพืชในพืชสมุนไพร 3 ชนิดคือ ว่านน้ำ หนอนตายหยาก และ ดองดึง พบเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ โดยเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มากที่สุด รองมาคือ *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Streptococcus*, *Nocardia*, *Alcaligenes* และ *Leuconostoc* ตามลำดับ ในขณะที่ Atlas and Bartha (1981) รายงานว่าส่วนใหญ่ในบริเวณเขตรากพืชจะพบแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแบบแท่ง (rod shape) และไม่สร้างสปอร์ (non-spore) เป็นจำนวนมาก เช่น แบคทีเรียจำพวก *Pseudomonas*, *Flavobacterium* และ *Alcaligenes*

เมื่อบันทึกลักษณะของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด stereoscopic microscope พบว่าลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้มีความหลากหลายอยู่มากเช่น สีโคโลนีพบทั้งสีขาว ส้ม ใส และ เหลืองอ่อน ลักษณะโคโลนีมีทั้งแบบ round, L-form, complex และ filamentous ผิวหน้าโคโลนีพบรูปแบบ umbonate, raised, hilly และ convex และขอบโคโลนีมีทั้งแบบ irregular, branching และ lobate ทั้งนี้ Chantratita *et al.* (2007) ได้รายงานถึงลักษณะโคโลนีที่ปรากฏของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จำนวน 212 samples ว่ามีลักษณะที่แตกต่างกันได้ถึง 7 ลักษณะ

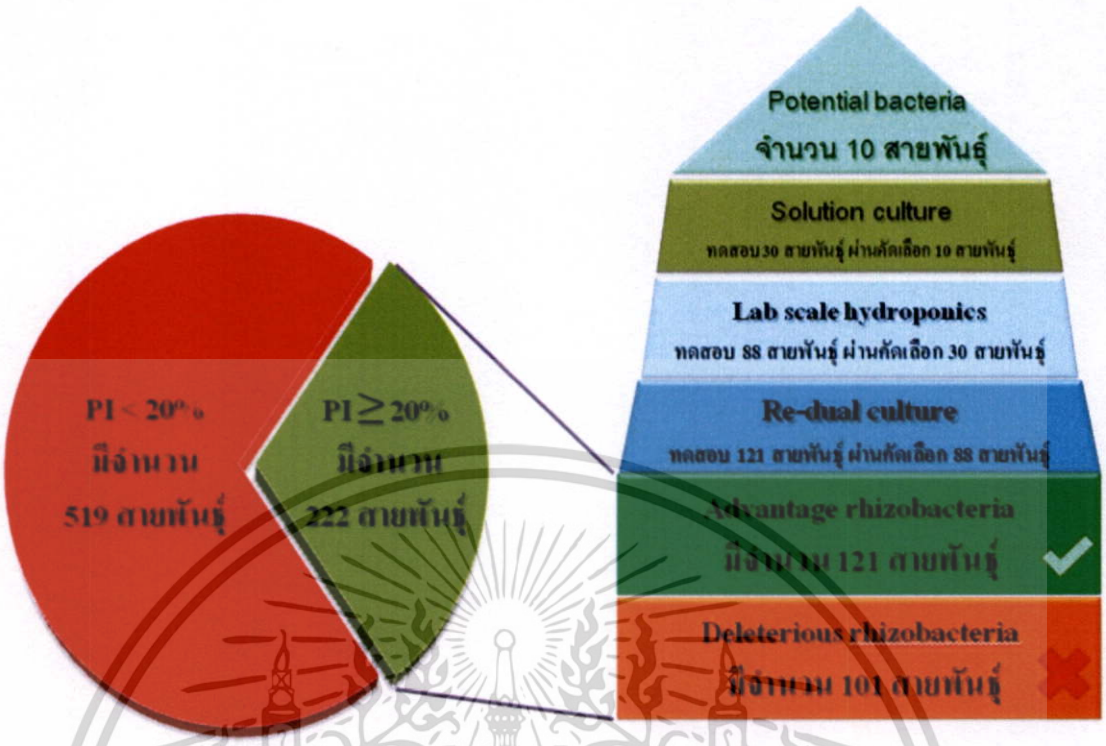
อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบลักษณะโคโลนีหลายรูปแบบจึงน่าจะแสดงถึงความหลากหลายของแบคทีเรียเขตรากพืชด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Germida *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณเขตรากผักกาดก้านขาว (*Brassica napus*)จากการสุ่มเลือก rhizosphere bacteria 300 สายพันธุ์ และ endophytic bacteria 200 สายพันธุ์ แล้วนำไปจัดจำแนก พบแบคทีเรียทั้งหมด 18 สกุลโดยเป็น *Bacillus* 29 เปอร์เซ็นต์ *Flavobacterium* 12 เปอร์เซ็นต์ *Micrococcus* 20 เปอร์เซ็นต์ และ *Rathayibacter* 12 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังพบว่า endophytic bacteria มีปริมาณน้อยกว่า rhizosphere bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การคัดเลือกแบคทีเรียเขตรากพืชในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* spp.

การคัดเลือกแบคทีเรียเขตรากพืชจำนวน 741 สายพันธุ์ที่แยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* สาเหตุโรครากเน่า โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหาร PDA พบว่ามีแบคทีเรียเขตรากพืชจำนวน 222 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งครั้งนี้ มาทดสอบผลกระทบต่อพืช โดยการเพาะเมล็ดใน bacterial suspension พบว่ามีจำนวน 121 สายพันธุ์ที่ทำให้พืชทดสอบมีค่าดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าเทียบเท่าหรือสูงกว่ากลุ่มทดลองควบคุม แบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบนี้ ได้ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C เป็นเวลา 1 ปี แล้วนำมาทดสอบซ้ำถึงความสามารถในการคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* ในครั้งนี้ได้แบคทีเรียเขตรากพืชที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวจำนวน 88 สายพันธุ์ ซึ่งผลจากการที่ประสิทธิภาพของแบคทีเรียลดลงนี้อาจเนื่องมาจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C ไม่สามารถหยุดกิจกรรมของแบคทีเรียได้สมบูรณ์ จึงทำให้แบคทีเรียตาย หรือ ลดความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ จากนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินขนาดเล็ก พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 30 สายพันธุ์ที่ให้ค่าดัชนีการเกิดโรค น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งไปในแนวทางที่ดี จึงนำไปทดสอบต่อในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ solution culture เพื่อคัดเลือกให้ได้แบคทีเรียที่มีศักยภาพจำนวน 10 สายพันธุ์ซึ่งแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจะพิจารณาจากค่าดัชนีการเกิดโรค ค่าเฉลี่ยของความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งต้น และน้ำหนักแห้งราก ที่ให้ผลในทุกค่าสังเกตไปในทิศทางที่ดี และมีศักยภาพที่จะศึกษาต่อไป (ภาพที่ 5.1) เมื่อนำแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp. ไปทำการจัดจำแนก (ดูหัวข้อ 5.8) พบว่าประกอบไปด้วยสกุล *Bacillus* และ สกุล *Pseudomonas* ซึ่งมีการรายงานถึงกลุ่มของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล โดย Nielsen and Sorensen (1997) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียบริเวณรอบรากและ ผิวราก พบว่าเป็นแบคทีเรีย *B. pumilus* ถึง 13 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แมนาเนส ไซลาเนส เคซีเนส และไคติเนส ในการยับยั้งเชื้อ *Py ultimum* และ Garvel *et al.* (2005) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ปลูกมะเขือเทศในระบบปลูกพืชแบบไม่ใช้ดินสภาพ greenhouse พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 237 ชนิด และพบว่ามี 40 ชนิด สามารถควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า โดยจุลินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ *Ps. corrugate* สายพันธุ์ 1-2, *Ps. subgroup F* และ *G* สายพันธุ์ 1, 2, 3, 4, และ 5, *Ps. syringae* สายพันธุ์ 1 และ *Ps.viridiflava* ซึ่งมีความสำคัญในการลดการเกิดรากเน่าโคนเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Py. ultimum* หรือ *Py. aphanidermatum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5.1 จำนวนสายพันธุ์การคัดเลือกแบคทีเรียเขตรากพืชในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp.

5.4 กลไกของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp.

5.4.1 Antibiosis

นำแบคทีเรียที่มีศักยภาพทั้งหมด 10 สายพันธุ์คือ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025, ECO 008 และ ECO 110 มาศึกษากลไกการเข้าทำลายเชื้อ *Py. myriotylum* โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NB และ PDA แล้วเตรียมส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียทั้งหมด 4 ส่วนคือ 1) purified cell หรือ ตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการปั่นตกตะกอน 2) purified sterile cell หรือ ส่วนของ purified cell ที่ฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที 3) cell–free culture filtrate หรือ ส่วนของเหลว (supernatant) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และนำมากรองเซลล์แบคทีเรียด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน และ 4) cell culture หรือสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยมีส่วนปรียบเทียบอีก 2 ส่วนคือ 1) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และ 2) สารเคมีกำจัดเชื้อรา metalaxyl ซึ่งจะหยอดแต่ละส่วนลงในหลุมที่เจาะไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการทดสอบด้วยเทคนิค agar disk diffusion เมื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง และบริเวณยับยั้ง พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Py. myriotylum* เมื่อใช้ส่วนของ purified cell และ cell culture เท่านั้น แต่ในส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อได้ ทั้งนี้ส่วน purified sterile cell เป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจึงไม่สามารถเจริญ หรือเกิดกระบวนการต่างๆ ภายในแบคทีเรียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนของ cell–free culture filtrate ซึ่งมีเพียงสารที่ได้จากกระบวนการเมตาโบไลท์ที่แบคทีเรียปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อได้เช่นกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่สารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยไม่ถูกผลิตออกมาหากไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งเหตุผลนี้ได้รับการสนับสนุนจาก Cha *et al.* (1998) รายงานว่าสาร xanthobaccin ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lysobacter* sp. SB-K88 จะผลิต xanthobaccin ได้ก็ต่อเมื่อเชื้อสายพันธุ์ SB-K88 ได้รับการกระตุ้นโดย เชื้อสาเหตุโรค damping-off และแบคทีเรียมีการสร้าง biofilms ที่ผิวของรากพืช

ในการทดลองนี้พบว่า *Bacillus* sp. RCO 010 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่า *Pseudomonas* sp. ECO 008 และ SSWC 110 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Baker and Cook (1983) รายงานถึงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่พบในบริเวณ rhizosphere นั้นมีแนวโน้มในยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคที่เกิดโรคในระบบรากพืชได้ดีกว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Pseudomonad

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อ *Pythium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เกิดความผิดปกติขึ้นหลายรูปแบบคือบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเริ่มมีการแตกแขนงตรงส่วนปลายของเส้นใยมากขึ้น และในบางครั้งเริ่มมีการเจริญงอในทางด้านข้าง และ/หรือ สวนทางกับการเคลื่อนที่เดิมของเส้นใยปกติ การที่ cytoplasm ภายในเส้นใยของเชื้อ *Py. myriotylum* มีการเคลื่อนที่ผิดปกติได้แก่มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และหยุด สลับกันไปมา โดยทิศทางการเคลื่อนที่จะไปรวมกันในส่วนปลายของเส้นใย และไหลย้อนกลับอย่างรวดเร็วจนเกิดการแตกของเส้นใยบริเวณต่างๆ โดยเฉพาะส่วนปลายของเส้นใยที่น่าจะเป็นบริเวณที่มีความบางที่สุดของผนังเส้นใย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Nelson *et al.* (1986) พบว่าเซลล์ของแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สามารถส่งผลให้เส้นใยเชื้อ *Py. ultimum* เกิดการสลายตัว (lysis) และ การแตกสลาย (degradation) ซึ่งเหตุการณ์เช่นนี้ก็ยังพบในเชื้อ *Py. debaryanum* โดยผลจากแบคทีเรีย Arthrobacter อีกด้วย (Mitchell and Hurwitz. 1965 อ้างโดย Jayamani. 2006) ซึ่งการสลายตัวของเซลล์ของเชื้อราอาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารจำพวก cell wall-degrading enzymes โดยแบคทีเรียจะต้องมีความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับเชื้อราสาเหตุโรค และจะถูกกระตุ้นให้ผลิตสารดังกล่าวมากในบริเวณเขตรากพืช เช่นการที่ *Micromonospora carbonacea* ได้รับการกระตุ้นจาก *Phytophthora cinnamomi* ให้มีการผลิต cellulase ทำให้เกิดการยับยั้งโรครากเน่าสาเหตุจากเชื้อ *Phytophthora cinnamomi* (El-Tarabily et al. 1996 อ้างโดย Jayamani. 2006) และการรายงานผลของ Budi *et al.* (1999) และ Budi *et al.* (2000) พบว่า *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ B 2 ซึ่งแยกจาก mycorrhizosphere ของต้น *Sorghum bicolor* มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โปรตีเอส ไคติเนส และเพคติเนส ที่สามารถยับยั้งราโรคพืช *Phytophthera parasitica* และ *Fusarium oxysporum* ได้บนอาหารแข็ง โดยยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา การเกิด sporangium การงอกของ zoospore และการยืดตัวของ germ tube องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ เกิด vesicle สะสมที่บริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ของเชื้อราบิดเบี้ยวเสียรูปอย่างรุนแรง ผนังเซลล์ของราโรคพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกทำลายโดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนส ทำให้เกิดรูรั่วบนผนังเซลล์ นอกจากนี้ *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ B 2 ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *F. culmorum*, *Aphanomyces euteiches*, *Chalara elegans*, *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* ได้อีกด้วย ส่วน Paul *et al.* (1998) ได้รายงานถึงเชื้อ *Bacillus* sp. สามารถยับยั้ง *Botrytis cinerea* บนอาหาร PDA เมื่อเลี้ยงร่วมกัน ซึ่งความผิดปกติของเส้นใยเกิดขึ้นบริเวณขอบของบริเวณยับยั้ง โดยเส้นใยมีสีเข้มและอัดตัวกันแน่น เส้นใยบวม การงอกของโคนิเดียถูกยับยั้ง ก้านชูโคนิเดียมีรูปร่างผิดปกติ

ในการทดลองครั้งนี้คาดว่าแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการทำให้เกิดความผิดปกติของเส้นใยในลักษณะที่สอดคล้องกับรายงานดังกล่าวได้แก่สายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025 และ ECO 008

5.4.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Red coral และ *L. sativa* L. cv. Butter head โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ พบว่าแบคทีเรียสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตได้โดยความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งต้น และน้ำหนักแห้งราก เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Manoranjitham *et al.* (2001) ถึงการใช้ talc-based ของ *Trichoderma viride* และ *Ps. fluorescens* ใส่ลงในแปลงอนุบาลกล้าก่อนทำการหว่านเมล็ดมะเขือเทศ สามารถเพิ่มความยาวราก ความยาวปลายราก และมวลชีวภาพของกล้ามะเขือเทศ และการรายงานของ Chang *et al.* (2007) พบว่าเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ QQ 308 เจริญในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของเปลือกกุ้งและเปลือกปู ไปรดต้นกะหล่ำปลี พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักของผลผลิต และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งการรายงานของ Chen *et al.* (2000) ในการใช้ *Ps. corrugata* 13 หรือ *Ps. aureofaciens* 63-28 ทำการกระตุ้นรากเป็นเวลา 2 วัน พบว่าที่บริเวณรากจะมี peroxidase (PO) และ polyphenol oxidase (PPO) เพิ่มขึ้น หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ (2548) รายงานถึงการผลิต สาร indole-3-acetic acid (IAA) indole-3-propionic acid (IPA) indole-3-butyric acid (IBA) indole-3-lactic acid (ILA) และ gibberellic acid (GA3) โดยเชื้อ *Pseudomonas* หลายสายพันธุ์ จะสร้างสารจำพวก auxin, gibberellins และ cytokinin ซึ่งเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นพัฒนาการของพืช และเป็นฮอร์โมนให้แก่พืช การรายงานของ Ramos *et al.* (2002) พบว่าการใช้ *B. licheniformis* สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีกับการปลูกต้นกล้า *Alnus glutinosa* เมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะระบบรากที่สมบูรณ์ พื้นที่ใบมีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งมีการรายงานว่าเชื้อ *B. licheniformis* CECT 5106 สามารถผลิตสารประกอบ auxin (Gutierrez *et al.* 1996 อ้างโดย Ramos *et al.* 2002) และ gibberellins (Gutierrez *et al.* 2001อ้างโดย Ramos *et al.* 2002) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณเขตรากพืชหลายชนิดมีความสามารถในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็น plant growth substances ที่ส่งเสริมหรือกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตของพืชอาศัยโดยตรง นอกจากนี้ Khan (2005) ได้รายงานว่า กิจกรรมของ *Nitrobacter* และ *Thiobacillus* สามารถผลิตกรดพวก formic acetic lactic ซึ่งจะทำให้ pH ลดต่ำลง จึงเกิดการสลายตัวของฟอสฟอรัสมากขึ้นทำให้พืชได้รับฟอสฟอรัสในปริมาณที่มากขึ้นอีกด้วย

ในการทดลองนี้คาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในทางส่งเสริมการเจริญเติบโตได้แก่ สายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025, ECO 008 และ SSWC 110

5.4.3 อื่นๆ

การยับยั้งโรครากเน่าสาเหตุจากเชื้อ *Pythium* sp. โดยแบคทีเรียที่มีศักยภาพด้วยวิธี split-root technique โดยใช้ *L. sativa* L. cv. Butter head เป็นพืชทดสอบ ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์คือ EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSWC 110 มีแนวโน้มในการยับยั้งโรครากเน่าในพืช *L. sativa* L. cv. Butter head แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งนั้นมีระยะเวลา 2 วันหลังจากพืชได้รับเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งผลดังกล่าวอาจจะเกิดจาก secondary metabolite ที่มีผลในการชักนำให้เกิดความต้านทาน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อจะยืนยันถึงความสามารถในการชักนำให้เกิดความต้านทานได้นั้นควรจะมีการตรวจสอบสารที่ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำพืชร่วมด้วย ตามการรายงานของ Han *et al.* (2000) พบว่า เชื้อ *Ps. fluorescens* สายพันธุ์ 89B-27 และ *Serratia marcescens* สายพันธุ์ 90-166 สามารถกระตุ้นความต้านทานติดเชื้อโรคพืชได้หลายชนิดโดยการใช้ seed treatments ซึ่งการชักนำที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากสารจำพวก phenolic compound และการรายงานของ Chen *et al.* (2000) การใช้ *Ps. corrugata* 13 หรือ *Ps. aureofaciens* 63-28 ทำการกระตุ้นรากเป็นเวลา 2 วัน พบว่าที่บริเวณรากจะมี peroxidase (PO) และ polyphenol oxidase (PPO) เพิ่มขึ้น ซึ่งเอ็นไซม์ดังกล่าวจะมีผลต่อการยับยั้งขบวนการพัฒนาการเกิดโรคของเชื้อ *Py. aphanidermatum* ในแตงกวา และการทดสอบโดย Chen *et al.* (1999) พบว่าเชื้อ *Ps. corrugate* สายพันธุ์ 63-28 สามารถผลิตสาร Salicylic acid ชักนำให้รากของแตงกวาต้านทานต่อ *Py. aphanidermatum* จากรายงานข้างต้นผลการยับยั้งโรครากเน่าด้วยวิธี split-root technique จากการทดลองอาจจะเป็นผลมาจาก secondary metabolite ที่สามารถดูดซึมผ่านรากด้านหนึ่งไปสู่รากอีกด้านหนึ่งจนสามารถยับยั้งโรครากเน่าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Pythium* sp.

การศึกษาลักษณะโคโลนี และคุณสมบัติเบื้องต้นบนอาหารชนิดต่างๆ สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้ 6 กลุ่ม และการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มคือ 1) แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน มี flagella เป็นแบบ peritrichous สามารถสร้างสปอร์ได้ ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพ anaerobes และ สามารถมีชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับ Brown (2005) ที่อ้างถึงการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่าเป็นแบคทีเรียใน Group I เช่นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolacobacillus* แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSMIX 025 และ2) แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน มี Flagella มากกว่า 1 เส้นแบบ Lophotrichous ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพ anaerobes และ สามารถมีชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Brown (2005) ที่อ้างถึงการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่าเป็นแบคทีเรียใน Group VIII เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Halobacterium* และ *Flavobacterium* แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพโดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และลักษณะทางสรีรวิทยาพบว่าสามารถจำแนกได้ 3 กลุ่มคือ 1) *Bacillus subtilis* ได้แก่แบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSMIX 025 2) *Pseudomonas fluorescens* ได้แก่แบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสายพันธุ์ ECO 008 และ 3) *Pseudomonas putida* ได้แก่แบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสายพันธุ์ SSWC 110

การจัดจำแนกโดยอาศัยของลำดับเบสของยีน 16S rRNA สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ดังนี้คือ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ECO 008 (GQ926880) และ SSWC 110 (GQ926881), *Bacillus* sp. สายพันธุ์ ERO 001 (GQ926882), EWC 065 (GQ926883), RCO 010 (GQ926884), RWC 021 (GQ926885), SSMIX 013 (GQ926886), SSMIX 020 (GQ926887), SSMIX 023 (GQ926888) และ SSMIX 025 (GQ926889)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ ลักษณะการเจริญบนอาหารบางชนิด คุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการ คุณสมบัติทางชีวเคมี และลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการ และการจัดจำแนกด้วยวิธี 16s rRNA พบว่าการจำแนกในระดับสกุลให้ผลไปในทางเดียวกันคือ *Bacillus* 8 สายพันธุ์และ *Pseudomonas* 2 สายพันธุ์ แต่ในระดับ species พบว่ามี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสายพันธุ์ RCO 010 และ ECO 008 ที่ผลของคุณสมบัติทางชีวเคมีบ่งบอกว่าเป็น *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas fluorescens* ตามลำดับแต่ผลการวิเคราะห์ของ 16s rRNA ให้ผลในการจัดจำแนกเป็น *Bacillus licheniformis* RCO 010 (ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์) และ *Pseudomonas putida* ECO 008 (ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งจากผลที่ปรากฏจะใช้ผลการยืนยันการจัดจำแนกเชื้อจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA แต่ยังไม่ควรระบุถึงระดับ species เนื่องจากควรมีการตรวจสอบซ้ำด้วย primer ที่เฉพาะเจาะจง และควรจะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน ไม่ต่ำกว่า 99.9 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกน่าจะให้ความสำคัญกับผลการวิเคราะห์ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เนื่องจาก rRNA เป็นหน่วยในองค์ประกอบไรโบโซม ซึ่งออร์แกเนลล์ชนิดนี้มีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิด มีหน้าที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิต โดยมีการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ อีกทั้งมีการอนุรักษ์และความผันแปรเพียงพอสำหรับจัดกลุ่ม ซึ่งหากยีนมีความผันแปรสูง หรือ มีการกลายพันธุ์สูง จะทำให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สูญหายไป และทำให้การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถบ่งบอกวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ (Madigan and Martino. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

6.1 การคัดเลือกแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp.ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

แยกเชื้อ *Pythium* spp. ได้จากผักสลัดที่แสดงอาการโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ได้ทั้งสิ้น 82 สายพันธุ์ที่มีลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนอาหาร PDA คือ รูปแบบ cottony รูปแบบ chrysanthemum รูปแบบ rosette และ รูปแบบ radiate เมื่อสุ่มไปทดสอบความรุนแรงในการเกิดโรค พบว่าเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* ทำให้เกิดโรครากเน่าอย่างรุนแรงใน *L. sativa* cv. Butter head และ *L. sativa* cv. Red coral ที่ปลูกในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบ solution culture

แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจำนวน 741 สายพันธุ์ที่แยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินระบบต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* สาเหตุโรครากเน่า โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วม พบว่ามีแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจำนวน 222 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้

แบคทีเรียที่มีความสามารถเมื่อนำมาทดสอบผลกระทบต่อพืช โดยการเพาะเมล็ดในสารละลายแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 121 สายพันธุ์ที่ทำให้พืชทดสอบมีค่าดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าเทียบเท่าหรือสูงกว่ากลุ่มทดลองควบคุม แบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบนี้ ได้ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี แล้วนำมาทดสอบซ้ำถึงความสามารถในการคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Py. aphanidermatum* และ *Py. myriotylum* ในครั้งนี้ได้แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวจำนวน 88 สายพันธุ์

การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินขนาดเล็ก (lab scale hydroponics) ซึ่งแบคทีเรีย 88 สายพันธุ์พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 20 สายพันธุ์ให้ค่าเฉลี่ยของความรุนแรงการเกิดโรคในระดับต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และในจำนวนนี้พบว่ามีบางสายพันธุ์ได้แก่ ECO 008, RFI 001 และ SSMIX 020 ให้ค่าเฉลี่ยความรุนแรงการเกิดโรคเท่ากับศูนย์เทียบเท่ากับกลุ่มการทดลองควบคุมที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. เมื่อพิจารณาโดยเน้นเฉพาะค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด-แห้งเป็นเกณฑ์ จะพบว่ามีประมาณ 30 สายพันธุ์ที่มีค่าเฉลี่ยเทียบเท่าหรือสูงกว่ากลุ่มการทดลองที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การควบคุมโรคในการปลูกพืชในแบบ solution culture พบว่าจากทั้งหมด 30 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรค และให้ค่าการเจริญของพืชไปในทางที่ดี ได้แก่สายพันธุ์ ECO 008, ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025 และ SSWC 110 โดยมีค่าดัชนีความรุนแรงการเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรครากเน่า ค่าเฉลี่ยความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งต้น และ น้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มการทดลองที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ *Py. myriotylum*

6.2 กลไกของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* spp.

กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *Py. myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ที่มีศักยภาพเป็นแบบ antibiosis และพบว่าส่วน purified cell และ cell culture ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อได้ อีกทั้งพบการเป็นปฏิปักษ์โดยทำให้เส้นใยเชื้อสาเหตุโรคแตก ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการทำลายเชื้อ *Py. myriotylum* โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพเป็นผลมาจากสาร secondary metabolite ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากเชื้อ *Py. myriotylum*

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. sativa* L. cv. Red coral และ *L. sativa* L. cv. Butter head โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ERO 001, EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 013, SSMIX 020, SSMIX 023, SSMIX 025, ECO 008 และ SSWC 110 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ โดยทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในส่วนต่างๆ เพิ่มมากขึ้น

แบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ได้แก่ EWC 065, RCO 010, RWC 021, SSMIX 020, SSMIX 023 และ SSWC 110 อาจจะมีการส่งผ่านสาร secondary metabolite ผ่านทางรากจนส่งผลให้ยับยั้งอาการรากเน่าจากเชื้อ *Pythium* spp.

6.3 การจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพได้ดังนี้คือ *Pseudomonas* sp. 2 สายพันธุ์คือ ECO 008 (GQ926880) และ SSWC 110 (GQ926881) และ *Bacillus* sp. 2 สายพันธุ์คือ ERO 001 (GQ926882), EWC 065 (GQ926883), RCO 010 (GQ926884), RWC 021 (GQ926885), SSMIX 013 (GQ926886), SSMIX 020 (GQ926887), SSMIX 023 (GQ926888) และ SSMIX 025 (GQ926889)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2550. "การทดสอบประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ K3 ในการควบคุมเชื้อ *Pythium aphanidermatum*." หน้า 232-233. ใน **การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8** พิษณุโลก.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ**. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ. 2547. "การระบุชนิดเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ และการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2539. "เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับเชื้อ *Pythium* (ตอนที่ 1)." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**. 14 : 41-45.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2548. "ศักยภาพของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Pythium myriotylum* ในระบบ NFT." หน้า 1082-1092 ใน **การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7** เชียงใหม่.

พรหมมาศ คูหากาญจน์, ศุภชัย รตโนภาส และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2539. "การแพร่กระจายของเชื้อราบางชนิดในสารละลายหมุนเวียนของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**. 14 : 26-37.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. **ราวิทยาเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชัย โฆสิตรัตน. 2549. **แบคทีเรียโรคพืช**. นครปฐม : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรนันท์ ตีระวัฒนพงษ์ และ อรทัย กังวาลชิรธาดา. 2539. **ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี; วิทยาภูมิคุ้มกันเบื้องต้น**. กรุงเทพ : หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

หนึ่ง เตียอำรุง กมลลักษณ์ เทียมไธสง และ นันทกร บุญเกิด. 2548. "ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)." **วารสารเทคโนโลยีสุรนารี**. 12 : 249-258.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัญฑิกา สวัสดิ์วนิช. 2546. "ความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์ของ *Acorus gramineus* Sol.ex W.A.T. *Stemona* sp. และ *Gloriosa uperb* Linn." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Abad, J.A. and Moyer, J. W. 1992. "Detection and distribution of sweet potato feathery mottle virus in sweet-potato by *in vitro*-transcribed RNA probes (riboprobes), membrance immunobinding assay and direct blotting." **Phytopathology**. 82 : 300-305.

Agrios, G.N. 2005. **Plant Pathology 5th Edition**. California. : Elsevier Academic Press.

An ,D. Dong, X. and Dong, Z. 2005. "Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses." **Anaerobe**. 4 : 207-215.

Atlas, R.M. and Bartha, R. 1981. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. Philippines: Addison-Wesley Publishing Company.

Bais, P.H. Weir, L.T. Perry, G.L. Gilroy, S. and Vivanco, M.J. 2006. "The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms." **Annual Review of Plant Biology**. 57 : 233-66.

Baker, K.F. and Cook, R.J. 1983. **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco. : W.H. Freeman and Company.

Bakker, P.A. Raaijmakers, J.M. and Schippers, B. 1993. "Role of iron in the suppression of bacterial plant pathogens by fluorescent pseudomonads." pp. 269-281. In L.L. Barton and B.C. Gemming (eds.). **Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms**. California : Academic Press. Inc.

Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A. (ed.). 2004. **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd edition**. Cambridge : Cambridge University Press.

Benoit, F. 1992. **Pratical Guide for Simple Soilless Culture Techniques**. European vegetable R&D Center. Sint-Katelijne-Waver. Belgium.

bioMérieuxSA. 2009. "bioMérieux launches VITEK 2 compact to complete its VITEK 2 range" [online] Available : http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/CP_VITEK_2_COMPACT_FINAL_ GB9.pdf.

Brenner, D.J. Krieg, N.R. and Staley, J.T. 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition**. New York : Springer.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Brien, R.G.O. Hare, P.J.O. and Glass, R.J. 1991. "Cultural practices in the control of bean root." **Australian Journal of Experimental**. 30 : 551-555.

Brown, A. 2005. **Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology 9th edition**. New York : McGraw-Hill.

Budi, S.W. Van Tuinen, D. Martinotti, G. and Gianinazzi, S. 1999. "Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium conpatible with arbuscular mycorrhiza develoment and antagonistic towards soilborne fungal pathogens." **Apply Environment of Microbiology**. 65 : 5148-5150.

Budi, S.W. Arnould, C. Dumas-Gaudot, E. Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. 2000. "Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi." **Apply Soil Ecology**. 15 : 191-199.

Calvo-Bado, L.A. Petch, G. Parsons, N.R. Morgan, J.A.W. Pettitt, T.R. and Whipps, J.M. 2006. "Microbial community responses associated with the development of oomycete plant pathogens on tomato roots in soilless growing systems." **Journal of Applied Microbiology**. 100 : 1194-1207.

Cha, C. Gao, P. Chen, Y.C. Shaaw, P.D. and Farrand, S.K. 1998. "Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria." **Molecular of Plant Microbe Interaction**. 11 : 1119-1129.

Chang, W.T. Chen, Y.C. and Jao, C.L. 2007. "Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes." **Bioresearch Technology**. 98 : 1224-1230.

Chantratita, N. Wuthiekanun, V. Boonbumrung, K. Tiyawisutsri, R. Vesaratchavest, M. Chierakul, W. Limmathurotsakul, D. Wongratanacheewin, S. Pukritiyakamee, S. White, N.J. Day, N.P.J. and Peacock S.J. 2007. "Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei.*" **Journal of Bacteriology**. 189 : 807-817.

Chen, C. Belanger, R.R. Benhamou, N. and Paulitz, T.C. 1999. "Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots." **European Journal of Plant Pathology**. 105: 477-486.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chen, C. Belanger, R.R. Benhamou, N. and Paulitz, T.C. 2000. "Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*." **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 56 : 13-23.

Chillemi, G. and Lazzarin, R. 1998. "Lettuce: adversities and defence." **Informatore Agrario Supplemento**. 54 : 17-21.

Christensen-Weniger, C. Groneman, A.F. and van Veen, J.A. 1992. "Associative N_2 fixation and root exudation of organic acids from wheat cultivars of different aluminium tolerance." **Plant soil**. 139 : 167-174.

Clark, M. F. 1981. "Immunosorbent assays in plant pathology." **Annual Reviews of Phytopathology**. 19 : 83-106.

Cole, J.R. Chai, B. Farris, R.J. Wang, Q. Mohideen, K.S. McGarrell, A.S. Bandelal, D.M. Cardenas, A.M. Garrity, E. and Tiedje, J.M. 2007. "The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data." **Nucleic Acids Research**. 35 : D169-D172.

Compant, S. Duffy, B. Nowak, J. Clement, C. and Barka, E.A. 2005. "Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects." **Applied and Environmental Microbiology**. 71 : 4951-4959.

Dandurand, L.M. Schotzko, D.J. and Knudsen, G.R. 1997. "Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*." **Applied and Environmental Microbiology**. 63 : 3211-17.

Danhorn, T. and Fuqua, C. 2007. "Biofilm formation by plant-associated bacteria." **Annual Review of Microbiology**. 61 : 401-22.

Defago, G. 1993. "2,4-Diacetylphloroglucinol a promising compound in biocontrol." **Plant Pathology**. 42 : 311-312.

Desh, P.S.V. 1992. **Molecular Signal in Plant-Microbe Communication**. Florida : CRC press, Inc.

Djibaoui, R. and Bensoltane, A. 2005. "Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*." **African Journal of Biotechnology**. 4 : 697-702.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Farah, A. Iqbal, A. and Khan, M.S. 2008. "Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities." **Microbiological Research**. 163 : 173-181.

Folman, L.B. De Klein, M.J.E.M. Postma, J. van Veen, J.A. 2004. "Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber." **Biological Control**. 31 : 145-154.

Fray, R.G. 2002. "Altering plant-microbe interaction through artificially manipulating bacterial quorum sensing." **Annual Reviews of Botanical**. 89 : 245-253.

Germida, J.J. Siciliano, S.D. de Freitas, J.R. and Seib, A.M. 1998. "Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Bassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.)." **FEMS Microbiology Ecology**. 26 : 43-50.

Gravel, V. Martinez, C. Antoun, H. and Tweddell, R.J. 2005. "Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool." **BioControl**. 50 : 771-786.

Gravel, V. Martinez, C. Antoun, H. and Tweddell, R.J. 2006. "Control of greenhouse tomato root rot (*Pythium ultimum*) in hydroponic systems, using plant-growth-promoting microorganisms." **Canadian Journal of Plant Pathology**. 28 : 475-483.

Grote, D. Bucsi, C. and Schmidt, R. 1992. "Studies on the control of *Pythium aphanidermatum* in NFT cultures of tomatoes and cucumbers." **Gartenbauwissenschaft**. 57 : 278-283.

Gull, C. Labuschagne, N. and Botha, W.J. 2004. "*Pythium* species associated with wilt and root rot of hydroponically grown crops in south africa." **African Plant Protection**. 10 : 109-116.

Gutierrez, W.A. and Melton, T.A. 2001. "Pythium root rot in tobacco greenhouses." **Plant Disease and Insect Clinic**. 8 : 7.

Hall, T.A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT." **Nucleic Acids Symposium Series**. 41 : 95-98.

Han, D.Y. Coplin, D.L. Bauer, W.D. and Hoitink, H.A.J. 2000. "A rapid bioassay for screening rhizosphere microorganisms for their ability to induce systemic resistance." **Phytopathology**. 90 : 327-332.

Hanafi, A. and Fellah, K. 2006. "Does the PGPR *Bacillus subtilis* induce plant resistance to whiteflies and *Phythium* spp. in greenhouse tomato?" **Bulletin OILB/SROP**. 29 : 4.

Harveson, R.M. and Rush, C.M. 2002. "The influence of irrigation frequency and cultivar blends on the severity of multiple root diseases in sugar beets." **Plant Disease**. 86 : 901-908.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Holt, J.G. Krieg, N.R. Sneath, P.H.A. Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition.** Baltimore : The Williams and Wilkins Co.

Hon-Hing, H. 2009. "The genus *Pythium* in Taiwan, China (1) - a synoptic review." **Front Biology China**. 4 : 15-28.

Hsu, H.T. and Lawson, R.H. 1991. "Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in impatiens." **Plant Disease**. 75 : 292-295.

Huang, J.H. and Lin, Y.S. 1998. "Root rot of vegetable pea seedlings in soilless cultural system caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium ultimum*." **Plant Protection Bulletin (Taipei)**. 40 : 397-408.

Idris, H.A. Labuschagne, N. and Korsten, L. 2008. "Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa." **Biological Control**. 45: 72-84.

Islam, Md.T. Hashidoko, Y. Deora, A. Toshiaki, I. and Tahara, S. 2005. "Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne *Peronosporomycetes*." **Applied and Environmental Microbiology**. 71 : 3786-3796.

Jayamani A. 2006. "Studies on the antagonistic effect of rhizobacteria against soilborne *Phytophthora* species on strawberry. Ph.D. in Plant Disease and Plant Protection. Institute of Plant Disease and Plant Protection. University of Hannover Germany.

Johnstone, M. Yu-Hai, L.W. Leonardos, E. Sutton, J. and Grodzinski, B. 2004. "Physiological changes associated with Pythium root rot in hydroponic lettuce." **Acta Horticulturae**. 635 : 67-71.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporeing gram-positive rod pp. 1208-1234. In Sneath, P.H.A. ed. **Bergey's Manual of systermatic Bacteriology Vol. 2.** Baltimore : Williams and Wilkins.

Kanokratana, P. Chanapan, S. Pootanakit, K. and Eurwililaichitr, L. 2004. "Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand." **Journal of Basic Microbiology**. 44:430-444.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khalil, S. 2005. "Microflora in the root environment of hydroponically grown tomato: Methods for assessment and effects of introduced bacteria and *Pythium ultimum*." [online] Available:http://proquest.umi.com/pqdweb?did=920862651&sid=1&Fmt=2&clientId=61842&RQT=309&VName=PQD.

Khan, G.A. 2005. "Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation." **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 18 : 355-364.

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

Kloepper, J.W.T. 1992. "Proposed definitions related to induced disease resistance." **Biocontrol Science and Technology**. 2 : 349-351.

Koohakan, P. 2007. "Occurrence and distribution of *Pythium* spp. in NFT facilities." pp. 418-422. In **Proceedings of the International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development**. Bangkok : King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

Koohakan, P. Ikeda, H. Jeanaksorn, T. Motoaki, T. Kusakari, S.I. Okada, K. and Sato, S. 2004. "Evaluation of the indigenous microorganisms in soilless culture: occurrence and quantitative characteristics in the different growing systems." **Scientia Horticulturae**. 101 : 179-188.

Krober, H. and Sauthoff, W. 1999. "*Pythium mastophorum* on parsley and celery in Germany." **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**. 51 : 165-169.

Labuschagne, N. Thompson, A.H. and Botha, W.J. 2003. "First report of stem and root rot of tomato caused by *Phytophthora capsici* in South Africa." **Plant Disease**. 87 : 1540.

Latour, X. Delorme, S. Mirleau, P. and Lemanceau, P. 2003. "Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: Description of a strategy based on population and model strain studies." **Agronomies**. 23 : 397-405.

Laville, J. Voisard, C. Keel, C. Maurhofer, M. Defago, G. and Haas, D. 1992. "Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco." pp. 1562-1566. In **Proceedings of National Academic Science**. USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Lynch, J.M. 1984. The rhizosphere-form and function. **Applied Soil Ecology**. 1 : 193.

Madigan, M. T. and Martino, J.M. 2006. **Brock Biology of Microorganism 11th edition**. New Jersey: Pearson Education Inc.

Malin, E.M. Roth, D.A. and Belden, E.L. 1983. "Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed." **Plant Disease**. 67 : 645-647.

Manoranjitham, S.K. Prakasam, V. and Rajappan, K. 2001. "Biological of damping off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum*." **Indian Phytopathology**. 54 : 59-61.

Marschner, P. Yang, C.H. Lieberei, R. and Crowley, D.E. 2001. "Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere." **Soil biology and biochemistry**. 33 : 1437-1445.

Meharg, A.A. and Killham, K. 1995. "Loss of exudates from the root of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms". **Plant Soil**. 170 : 345.

Metling, F.B. 1993. **Soil Microbial Ecology.** Washington: Dekker Inc.

Miller, H.J. Lijeroth, E. Henken, G. and Van Veen, J.A. 1989. Variation and composition of bacterial population in the rhizosphere of Maize, Wheat and Grass Cultiva." **Canadian Journal of Microbiology**. 36 : 254-258.

Molina, L. Ramos, C. Duque, E. Ronchel, M.C. Garca, J.M. Wyke, L. and Ramos, J.L. 2000. "Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions." **Soil Biology and Biochemistry**. 32 : 315-321.

Mondal N.S. and Hyakumachi, M. 1999. "Soil factors affecting carbon loss and pathogenecity of oospores of *Pythium aphanidermatum*." **Soil Biology and Biochemistry**. 32: 111-118.

Morton, D.J. and Stroube, W.H. 1955. "Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*." **Phytopathology**. 45 : 417-420.

Moss, C.W. Lambert, M.A. and Merwin, W.H. 1994. "Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids." **Applied Microbial**. 28 : 80-85.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mostapha, N.K. 2004. "Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistics bacteria in greenhouse and field conditions." **Plant Pathology Journal**. 3 : 88-96.

Nealson, K.H. and Hastings, J.W. 1979. "Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance." **Microbiology Reviews**. 43 : 496-518.

Nelson, E.B. 2004. "Microbial dynamics and interactions in the spermosphere." **Annual Review of Phytopathology**. 42 : 271-309.

Nelson, E.B. Chao, W.L. Norton, J.M. Nash, G.T. and Harman, G.E. 1986. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimun*: possible role in biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off. **Phytopathology**. 76 : 327-335.

Nielsen, M. N. and Sorensen, J. 1999. "Chitinolytic activity of *Pseudomonas fuorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere." **FEMS Microbiology Ecology**. 30 : 217-227.

Nielsen, P. and Sorensen, J. 1997. "Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere." **FEMS Microbiology Ecology**. 22 : 183-192.

Nielsen, T.H. and Sorensen, J. 2003. "Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere." **Applied and Environmental Microbiology**. 69 : 861-868.

Nyochembeng, L.M. Pacumbaba, R.P. and Beyl, C.A. 2002. "Calcium enhanced zoospore production of *Pythium myriotylum in vitro*." **Journal of Phytopathology**. 150 : 396-398.

Omura, T. Hibino, H. Ussgi, T. Inoue, H. Morinaka, T. Tsurumachi, S. Ong, S. Putta, C.A. Tsuchizaki, M. and Saito, Y. 1984. "Detection of rice viruses in plants and individual insect vector by latex flocculation test." **Plant Disease**. 68 : 374-378.

Pagliaccia, D. Ferrin, D. and Stanghellini, M.E. 2007. "Chemo-biological suppression of root-infecting zoosporic pathogens in recirculating hydroponic systems." **Plant Soil**. 299 : 163-179.

Parry, J.M. Turnbull, P.C.B. and Gibson, J.R. 1988. **A Colour Atlas of Bacillus species**. Medical Pulication Ltd. England.

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 Lettuce**. 165 : 5-70.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paulitz, T.C. 1997. "Biological control of root pathogens in soilless and hydroponic system." **HortScience**. 32 : 193-196.

Plaats-Niterink Van Der A.J. 1981. **Monograph of the Genus *Pythium***. Studies in Mycology. 21 : 242.

Pinton, R. Varanini, Z. and Nannipieri, P. 2007. **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-plant Interface**. Baco Raton : CRC Press.

Postma, J. Luc, H.S. Gerrie, L.W. Evert, D. and Els, H.N. 2009. "Biological control of *Pythium aphanidermatum* in cucumber with a combined application of *Lysobacter enzymogenes* strain 3.1T8 and Chitosan" **Biological Control**. 48 : 301-309.

Postma, J. Willemsen-De. Klein, M.J. and Van Elsas, J.D. 2000. "Effect of the indigenous microflora on the development of root and crown rot caused by *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown on rockwool." **Phytopathology**. 90 : 125-133.

Pot, B. Ludwig, W. Kersters K. and Schleifer K.H. 1994. "Toxonomy of lactic acids bacteria: Microbiology genetics and application." pp. 13-90. In Vuyst, L.D. and Vandamme E.L. eds. **Bacteriocins of Lactic acid bacteria**. Glasgow : Chapman and Hall.

Prathuangwong, S. and Chankhan, N. 2002. "Isolation and identification of termite associated bacteria upon promotion of plant growth and cause of plant disease." pp. 26-27. In **Proceedings of International Symposium Biorecyle Research on Termites and Their Symbiotic Microorganisms**. Tokyo.

Prathuengwong, S. Kasem, S. and Thowthampitak, J. 2004. "Multiple plant response to bacterial mediated protection against various diseases." pp. 10-12. In **Proceedings of the International Society for Southeast Asian Agricultural Science (Scientific Meeting)**. Hanoi : Agricultural University (HAU).

Priha, O. Grayston, S.J. Pennanen, T. and Smolander, A. 1999. "Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizosphere of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedings in an organic and mineral soil." **FEMS Microbiol Ecology**. 30 : 187-199.

Raja, A.R. Shah, K.H. Aslam, M. and Memon, M.Y. 2002. "Response of phosphobacterial and mycorrhizal inoculation in wheat." **Asian Journal of Plant Science**. 1 : 322-323.

Raftoyannis, R. and Dick, M.W. 2006. "Effect of oomycete and plant variation on zoospore cover and disease severity" **Journal of Plant Pathology**. 88 : 95-101.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ramos, B. Garcia, J.A. Probanza, A. Barrientos, M.L. and Guterrrez, M.F.J. 2002. "Alterations in the rhizobacterial community associated with european alder growth when inoculated with PGPR Strain *Bacillus licheniformis*." **Environmental and Experimental Botany**. 49 : 61-68.

Ronald, M.A. 1995. **Handbook of media for environmental microbiology**. Boca Raton : CRC Press.

Sacherer, P. Defago, G. and Haas, D. 1994. "Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO." **FEMS Microbiology Letters**. 116 : 155-160.

Sambrook, J. Fritsch, E. and Maniatis, F. 1989. **Molecular Cloning a Laboratory Cold Spring Harbor**. New York: Cold Spring Habor Press.

Saravanakumar, D. Charles, V. Kumar, N. and Samiyappan, R. 2007. "PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease." **Crop Protection**. 26 : 556-565.

Schaad, N.W. and Forstor, R. L. 1985. "A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds." **Phytopathology**. 75 : 260-263.

Schonfeld, J. Costa, R. and Odnca H.L. 2001. "Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis." **Plant Soil**. 233 : 167.

Seal, S. E. and Elphinstine, J.G. 1994. "Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*" . In : Hayward A. C., and Hartman G. L. (ed.) :bacterial wilt ; The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* . CAB international, Walingford, UK.

Shang, H. Chen, J. Handelsman, J. and Goodman, M.R. 1999. "Behavior of *Pythium torulosum* zoospores during their interaction with tobacco roots and *Bacillus cereus*." **Current Microbiology**. 38 : 199-204.

Sheng, L.Y. Jinhsing, H. and YuHuey, G. 2002. "Control of Pythium root rot of vegetable pea seedlings in soilless culture system." **Plant pathology Bulletin**. 11 : 221-228.

Spadaro, D. and Gullino, M.L. 2005. "Improving the efficacy of biocontrol agents soilborne pathogens." **Crop Protection**. 24 : 601-613.

Stanghellini, M.E and Rasmussen, S.L. 1994. "Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens." **Plant Disease**. 78 : 1129-38.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. "Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy." **International of Food Microbiology**. 36 : 1-29.

Sutton, C.J. Sopher, C.R. Owen-Going, T.N. Liu, W. Grodzinski, B. Hall, J.C. and Benchimol, R.L. 2006. "Etiology and epidemiology of Pythium root rot in hydroponic crops: Current knowledge and perspective." **Summa Phytopathology Botucatu**. 32 : 307-321.

Tajima K., Aminov, R.I. Nagamine, T. Ogata, K. Nakamura, M. and Benno, Y. 1999. "Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries." **FEMS. Microbiology Ecology**. 29 : 159-169.

Travis, S.W. Harsh, P.B. Erich, G. and Jorge, M.V. 2003. "Root exudation and rhizosphere biology." **Plant Physiology**. 132 : 44-51.

Tu, J.C. 2002. "An integrated control of Pythium root rot of greenhouse tomato." In **Proceedings of** 54th International Symposium on Crop Protection, Belgium.

Ulrich, K. Ulrich, A. and Ewald, D. 2008. "Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions." **FEMS Microbiology Ecology**. 63 : 169-180.

van West, P. Appiah, A.A. and Gow, N.A.R. 2003. "Advances in research on oomycete root pathogens." **Plant Pathology**. 62 : 99-113.

Vancura, V. 1998. "Plant Metabolites in soil." pp. 57-132 *In* Vancura, V. and Kunc, C. (edition.). **Soil Microbial association**, Elsevier Amsterdam.

Walker, S. Travis, H.P.B. Erich, G. and Vivanco, J.M. 2003. "Root exudation and rhizosphere biology." **Plant Physiology**. 132 : 44-51.

Wang, X. Wu, P. Xia, M. Wu, Z. Chen, Q. and Lin, F. 2002. "Identification of genes enriched in rice root of the local nitrate treatment and their expression patterns in split-root treatment." **Gene**. 297 : 93-102.

Weild, V. Paiva, I. Nobrega, E. Elsas, A. and Seldin, L. 2000. "Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from the rhizosphere of maize planted in cerrado soil." **Research in Microbiology**. 151 : 369-381.

Whipps, J.M. 2001. "Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere." **Journal of Experimental Botany**. 52 : 487-511.

Yamasaki, M. Kusakari, S. Narita, K. Osamura, K. and Nagai, M. 2006. "Control of root rot disease of tomatoes by using weak acidic electrolyzed water (WAEW) in the hydroponic culture solution." **Journal of Antibacterial and Antifungal Agents**. 34 : 543-549.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yang, J. Kharbanda, P.D. and Mirza, M. 2004. "Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* PKB 1 for biocontrol of Pythium disease of cucumber in a hydroponic system." **Acta Horticulturae**. 635 : 59-66.

Zhao, Z.H. Kusakari, S.I. Okada, K. Miyazaki, A. and Osaka, T. 2002. "Control of Pythium root rot on hydroponically grown cucumber with silvercoated cloth. Biodcience." **Biotechnology and biochemistry**. 64 : 1515-1518.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลปฐมภูมิของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 1

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[u]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
Control Inoculation	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Control Healthy	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

[u]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 2

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[µ]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Control Inoculation	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
Control Healthy	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

[µ]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 3

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[1/]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Control Inoculation	2	1	1	1	0	3	1	1	2	1
Control Healthy	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

[1/]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 4

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[u]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Control Inoculation	2	1	1	1	0	4	1	1	4	1
Control Healthy	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

[u]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 5

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[1/]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Control Inoculation	2	1	1	1	0	4	1	1	4	1
Control Healthy	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

[1/]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 1

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[µ]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas sp. ECO 008	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. SSWC 110	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Control Inoculation	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1
Control Healthy	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

[µ]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 7 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 2

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[µ]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. ECO 008	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. SSWC 110	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Control Inoculation	1	2	0	1	2	2	0	1	1	1
Control Healthy	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

[µ]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 3

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[u]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. ECO 008	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. SSWC 110	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Control Inoculation	2	2	0	2	2	2	0	1	1	1
Control Healthy	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

[u]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 9 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 4

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[µ]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. ECO 008	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. SSWC 110	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Control Inoculation	2	2	0	2	2	3	0	0	1	1
Control Healthy	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

[µ]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 10 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT บันทึกผลวันที่ 5

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[1/]									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. ECO 008	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas sp. SSWC 110	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Control Inoculation	2	2	0	2	2	4	1	0	1	1
Control Healthy	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

[1/]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

ตารางภาคผนวกที่ 11 ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 24 ชั่วโมง

Treat.	ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
ERO 001	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.8	1.7	1.8	1.7	1.7	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.8	1.7	1.5	1.5	1.8
EWC 065	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.5	1.2	1.4	1.4	1.2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.1	1.0	0.8	0.9	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.6	1.2	1.3	1.2	1.1
RCO 010	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.7	0.8	0.8	0.7	0.8	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.7	0.8	0.8	0.7	0.5
RWC 021	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.8	1.7	1.7	1.7	1.7	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.4	1.4	1.5	1.5	1.7
SSMIX 013	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.6	1.2	1.3	1.3	1.2
SSMIX 020	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.4	1.4	1.3	1.4	1.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	0.9	0.8	1.0	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3
SSMIX 023	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	1.4	1.5	1.4	1.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	1.0	1.2	1.1	1.2
SSMIX 025	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.4	1.3	1.3	1.4	1.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.5	1.3	1.4	1.4	1.3
ECO 008	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.9	1.6	1.9	1.8	1.6	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.5
SSWC 110	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.9	1.9	1.5	1.6	1.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.6	1.6	1.5	1.5	1.5

ตารางภาคผนวกที่ 12 ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 24 ชั่วโมง

Treat.	ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell						Metalaxyl			Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1
ERO 001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.8	2.7	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.8	3.0	3.0	2.7
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	2.4	2.5	0.4	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.5	3.2	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.8	2.8	3.1	3.2
EWC 065	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.3	3.1	3.1	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.5	3.7	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.3	3.2	3.3	3.4
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.5	3.5	3.6	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.2
RCO 010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	3.7	3.7	3.8	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.6	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	3.7	3.7	3.8	4.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	3.7	3.7	3.8	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.6	3.5	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	4.2	4.1	4.0	4.0
RWC 021	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.8	2.8	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.6	3.6	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.0	3.0	2.8
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.9	3.0	3.1	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.4	3.6	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.2
SSMIX 013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.2	3.1	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.7	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.3	3.2	3.2	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.0	3.1	3.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	2.6	2.4	2.3
SSMIX 020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.6	3.7	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.2	3.1	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.2	3.5	3.3	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.0	3.2	3.2
SSMIX 023	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.1	3.0	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.6	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.5	3.3	3.4	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6
SSMIX 025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.2	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.6	3.5	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.2	3.1	3.1	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.5	3.6	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.7	2.7	2.8
ECO 008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.2	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.6	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	2.9	2.9	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.7	3.7	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	2.9	3.0	3.0
SSWC 110	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.6	3.0	2.9	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.6	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3.0	3.0	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.9	3.0	2.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.5	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	3.0	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 13 ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 48 ชั่วโมง

Treat.	ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
ERO 001	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.8	1.8	1.7	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.5	1.6	1.5	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.5	1.7	1.5	1.4
EWC 065	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.7	1.6	1.5	1.8	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.5	1.6	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.6	1.5	1.5
RCO 010	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.6	1.6	1.5	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.5
RWC 021	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.7	1.8	1.7	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.5	1.6	1.6	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.6	1.5	1.5	1.5
SSMIX 013	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.7	1.6	1.4	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.6	1.5	1.5	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.6	1.5	1.5
SSMIX 020	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.3	1.4	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.7	1.5	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.0	1.5	1.4	1.4
SSMIX 023	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.5	1.5	1.4	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.4	1.6	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0
SSMIX 025	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.3	1.4	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.6	1.5	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.5	1.5	1.7	1.7
ECO 008	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.9	1.7	2.0	2.0	2.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.8	1.4	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
SSWC 110	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.9	2.0	1.9	1.9	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.4	1.6	1.6	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.5	1.5	1.6

ตารางภาคผนวกที่ 14 ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 48 ชั่วโมง

Treat.	ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																													
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell						Metalaxyl				Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1
ERO 001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	2.9	3.0	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.0	2.8	3.0	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	2.4	2.5	0.4	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.5	3.2	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.8	2.8	3.1	3.2
EWC 065	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	2.7	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3.0	2.9	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.0	2.9	3.0	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.5	3.5	3.6	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.2
RCO 010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.7	3.7	3.8	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	2.9	3.0	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.0	4.0	4.1	4.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	3.7	4.0	3.8	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.6	3.5	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	4.2	4.1	4.4	4.3
RWC 021	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.8	2.7	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	2.9	2.9	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	2.9	3.0	3.0	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.9	3.0	3.1	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.4	3.6	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.2
SSMIX 013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.8	2.9	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	2.9	3.0	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.0	3.1	3.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	2.6	2.4	2.3
SSMIX 020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.0	2.8	3.0	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.5	3.0	3.1	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.2	3.5	3.3	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.0	3.2	3.2
SSMIX 023	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.0	3.0	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3.1	2.9	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.5
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6
SSMIX 025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.0	2.9	3.0	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.0	2.8	2.8
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.5	3.6	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.7	2.7	2.8
ECO 008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.0	2.7	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.7	3.7	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	2.9	3.0	3.0
SSWC 110	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.5	2.6	2.6	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.1	2.9	2.9	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3.0	3.0	2.9
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.9	3.0	2.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.5	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	3.0	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 15 ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 96 ชั่วโมง

Treat.	ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
ERO 001	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.8	1.8	1.7	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.0	3.0	3.1	3.1	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.7	1.7	1.7	1.5	1.8
EWC 065	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.2	1.4	1.2	1.3	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.0	3.0	3.2	3.1	2.9	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.1	1.2	1.2	1.5
RCO 010	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2
RWC 021	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.7	1.8	1.7	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.1	3.0	3.0	3.0	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5
SSMIX 013	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.4	1.3	1.4	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.1	3.2	3.0	3.0	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.2	1.2	1.4	1.5
SSMIX 020	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.3	1.4	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.0	3.0	3.0	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4
SSMIX 023	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.5	1.5	1.4	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.1	3.0	2.9	2.9	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1	1	1	0.9	1
SSMIX 025	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.3	1.4	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.1	3.0	3.0	3.0	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.8	1.8	1.7	1.7
ECO 008	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.9	1.7	2	2	2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.0	3.1	3.2	3.0	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
SSWC 110	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.9	2	1.9	1.9	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.1	3.0	3.0	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.5	1.5	1.6

ตารางภาคผนวกที่ 16 ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 96 ชั่วโมง

Treat.	ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl				Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1
ERO 001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.5	1.4	1.4	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.8	3	2.7
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	2.4	2.5	0.4	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.4	1.0	1.2	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3	2.8	2.8	3.1	3.2
EWC 065	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.3	3.1	3.3	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.5	1.3	1.4	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.4	3.3	3.3	3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.5	1.2	1.5	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3	2.9	3	3	3.2
RCO 010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	4.4	4.4	4.3	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.3	4.3	4.2	4.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	4.4	4.3	4.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.4	1.2	1.2	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	4.2	4.4	4.4	4.3
RWC 021	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.8	2.7	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3	3	3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.9	3	3.1	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.4	1.3	1.2	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3	3	3.1	3.2
SSMIX 013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.2	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.3	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.3	3.1	3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3	3.1	3	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.2	1.4	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	2.6	2.4	2.3
SSMIX 020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.5	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.1	3.1	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3	3	3.1	3	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3	3.2	3.2
SSMIX 023	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3	3	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.4	1.5	1.6	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.5
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3	3	3.1	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.3	1.3	1.4	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6
SSMIX 025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3	3	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.4	1.3	1.2	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.7	2.7	2.8
ECO 008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.4	1.3	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1	3	3	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.3	1.3	1.3	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3	2.9	2.9	3	3
SSWC 110	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.5	2.6	2.6	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.4	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3	3	2.9
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.9	3	2.6	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.3	1.5	1.5	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3	3	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 17 ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 192 ชั่วโมง

Treat.	ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
ERO 001	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.8	1.8	1.7	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.7	1.7	1.7	1.5	1.8
EWC 065	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.6	1.5	1.5
RCO 010	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2
RWC 021	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.7	1.8	1.7	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5
SSMIX 013	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.4	1.3	1.4	1.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.6	1.5	1.5
SSMIX 020	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.3	1.4	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4
SSMIX 023	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.5	1.5	1.4	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1	1	1	0.9	1
SSMIX 025	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.3	1.4	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.8	1.8	1.7	1.7
ECO 008	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.9	1.7	2	2	2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
SSWC 110	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.9	2	1.9	1.9	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.5	1.5	1.6

ตารางภาคผนวกที่ 18 ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร NB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 192 ชั่วโมง

Treat.	ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																												
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell						Metalaxyl				Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1
ERO 001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.8	3.0	2.7
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	2.4	2.5	0.4	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.8	2.8	3.1	3.2
EWC 065	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.4	3.3	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.0	2.9	3.0	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.2
RCO 010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	4.4	4.4	4.3	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.3	4.3	4.2	4.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	4.4	4.3	4.3	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	4.2	4.4	4.4	4.3
RWC 021	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.8	2.7	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.0	3.0	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.9	3.0	3.1	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.2
SSMIX 013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.2	3.1	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	2.9	3.0	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.0	3.1	3.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	2.6	2.4	2.3
SSMIX 020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.1	3.1	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.0	3.2	3.2
SSMIX 023	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.0	3.0	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.5
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6
SSMIX 025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.7	2.7	2.8
ECO 008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.2	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	2.9	3.0	3.0
SSWC 110	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.5	2.6	2.6	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3.0	3.0	2.9
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.9	3.0	2.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	3.0	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 19 ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 24 ชั่วโมง

Treat.	ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ (เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
ERO 001	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.5	1.5	1.4	1.6	1.6	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2
EWC 065	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.2	1.1	1.2	1.6	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.1	0.9	1.0	1.0	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2
RCO 010	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.1	0.9	0.9	1.0	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.4	0.4	0.5	0.5	0.4
RWC 021	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.1	1.2	1.1	1.1	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	0.9	0.9	0.9	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.3	1.2	1.2	1.0	1.2
SSMIX 013	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.3	1.3	1.2	1.3	1.1	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.1	1.2	1.0	1.0	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.4	1.1	1.3	1.1	1.3
SSMIX 020	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.3	1.2	1.2	1.1	1.2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	1.2	1.1	1.1	1.3
SSMIX 023	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	1.2	1.3	1.1	1.4
SSMIX 025	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.4	1.4	1.4	1.3	1.2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	1.1	1.2	1.2	1.4
ECO 008	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.4	1.6	1.6	1.4	1.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.6	1.6	1.4	1.3	1.4
SSWC 110	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.5	1.6	1.5	1.4	1.3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.0	0.9	1.2	0.9	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.5	1.4	1.4	1.4	1.5

ตารางภาคผนวกที่ 20 ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 24 ชั่วโมง

Treat.	ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl			Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1
ERO 001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	2.9	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.3	3.2	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	2.4	2.5	0.4	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.5	3.2	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.8	2.8	3.1	3.2
EWC 065	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.3	3.4	3.3	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.6	3.5	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.4	3.3	3.4	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.5	3.5	3.6	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.2
RCO 010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.1	4.1	4.0	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.6	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.1	4.0	4.0	4.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	3.7	3.7	3.8	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.6	3.5	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	4.2	4.1	4.0	4.0
RWC 021	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.3	3.4	3.4	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.6	3.6	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.3	3.3	3.5	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.9	3.0	3.1	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.4	3.6	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.2
SSMIX 013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.3	3.2	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.3	3.5	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.4	3.2	3.4	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.0	3.1	3.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	2.6	2.4	2.3
SSMIX 020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.3	3.3	3.4	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.4	3.5	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.4	3.4	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.2	3.5	3.3	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.0	3.2	3.2
SSMIX 023	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.3	3.3	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.4	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.2	3.4	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6
SSMIX 025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.1	3.2	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.6	3.5	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.4	3.3	3.3	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.5	3.6	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.7	2.7	2.8
ECO 008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.1	3.2	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3.1	3.2	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.7	3.7	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	2.9	3.0	3.0
SSWC 110	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.1	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.6	3.3	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.1	3.1	3.1	3.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.9	3.0	2.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.5	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	3.0	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 21 ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 48 ชั่วโมง

Treat.	ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																													
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
ERO 001	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.5	1.4	1.6	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.6	1.6	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2
EWC 065	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.0	1.2	1.1	1.2	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.7	1.6	1.5	1.6	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.4	1.2	1.0	1.4
RCO 010	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.7	1.6	1.6	1.7	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.4	0.3	0.5	0.5	0.3
RWC 021	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.1	1.2	1.1	1.1	1.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.7	1.6	1.4	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.1	1.2	1.2	1.0	1.2
SSMIX 013	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.3	1.2	1.3	1.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.6	1.5	1.7	1.7	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.1	1.3	1.2	1.3
SSMIX 020	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.2	1.2	1.1	1.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.7	1.7	1.8	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.0	1.2	1.1	1.3	1.3
SSMIX 023	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.8	1.7	1.8	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.2	1.3	1.1	1.0
SSMIX 025	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.4	1.3	1.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.6	1.7	1.8	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.1	1.2	1.2	1.4
ECO 008	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.6	1.5	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.8	1.8	1.5	1.8	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.4	1.5	1.4
SSWC 110	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.6	1.5	1.5	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.8	1.8	1.4	1.5	1.8	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.3	1.5	1.6	1.7

ตารางภาคผนวกที่ 22 ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 48 ชั่วโมง

Treat.	ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell						Metalaxyl			Cell–free culture filtrate				Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1
ERO 001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	2.9	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.0	2.9	2.9	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.3	3.2	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	2.4	2.5	0.4	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.5	3.2	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.8	2.8	3.1	3.2
EWC 065	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.3	3.4	3.3	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	2.9	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.1	3.3	3.5	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.5	3.5	3.6	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.2
RCO 010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.1	4.1	4.2	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	2.9	2.8	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.2	4.0	4.0	4.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	3.7	3.7	3.8	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.6	3.5	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	4.2	4.1	4.0	4.0
RWC 021	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.3	3.4	3.4	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.8	2.9	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.3	3.3	3.5	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.9	3.0	3.1	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.4	3.6	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.2
SSMIX 013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.3	3.2	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.4	3.2	3.3	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.0	3.1	3.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	2.6	2.4	2.3
SSMIX 020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.3	3.3	3.4	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.8	2.8	2.7	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.3	3.4	3.2	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.2	3.5	3.3	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.0	3.2	3.2
SSMIX 023	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.3	3.3	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	2.7	2.8	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.2	3.4	3.5
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6
SSMIX 025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.1	3.2	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.0	2.9	2.8	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.4	3.3	3.3	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.5	3.6	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.7	2.7	2.8
ECO 008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.1	3.2	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.7	2.7	3.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3.1	3.0	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.7	3.7	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	2.9	3.0	3.0
SSWC 110	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.7	3.1	3.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.0	2.9	2.8
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.9	3.0	2.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	3.6	3.5	3.6	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	3.0	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 23 ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 96 ชั่วโมง

Treat.	ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
ERO 001	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.5	1.4	1.6	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.2	3.1	3.2	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2
EWC 065	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.2	1.4	1.4	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.3	3.2	3.2	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.5	1.4	1.5	1.4
RCO 010	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.0	3.2	3.4	3.0	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.4	0.4	0.2	0.1	0.3
RWC 021	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.2	1.2	1.3	1.3	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.1	3.0	3.3	3.4	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.2	1.2	1.3	1.2
SSMIX 013	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.3	1.2	1.3	1.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.1	3.2	3.0	3.4	3.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.2	1.3	1.1	1.3
SSMIX 020	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.2	1.2	1.1	1.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.0	3.0	3.4	3.3	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.1	1.2	1.1	1.3	1.3
SSMIX 023	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.2	3.4	3.1	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.1	1.3	1.1	1.0
SSMIX 025	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.4	1.4	1.3	1.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.1	3.2	3.2	3.1	3.3	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.1	1.2	1.2	1.4
ECO 008	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.6	1.5	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.1	3.2	3.3	3.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.6	1.4	1.5	1.4
SSWC 110	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.6	1.5	1.5	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.2	3.1	3.2	3.2	3.3	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.1	1.5	1.6	1.7

ตารางภาคผนวกที่ 24 ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 96 ชั่วโมง

Treat.	ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																											
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell						Metalaxyl			Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1
ERO 001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	2.9	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.4	1.3	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.3	3.2	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	2.4	2.5	0.4	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.4	1.0	1.2	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.8	2.8	3.1	3.2
EWC 065	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.3	3.1	3.1	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.2	1.3	1.3	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.5	1.2	1.2	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.2
RCO 010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.1	4.1	4.2	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.3	1.1	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	4.1	4.3	4.4	4.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	3.7	3.7	3.8	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.1	1.1	1.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	4.3	4.3	4.5	4.0
RWC 021	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.3	3.3	3.2	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.5	1.2	1.1	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.3	3.3	3.2	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.9	3.0	3.1	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	1.0	1.3	1.2	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.2
SSMIX 013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.3	3.2	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.3	1.5	1.1	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.3	3.2	3.4	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.0	3.1	3.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.2	1.2	1.2	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	2.6	2.4	2.3
SSMIX 020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.3	3.3	3.4	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.5	1.5	1.1	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.3	3.4	3.2	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.1	1.2	1.2	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.0	3.2	3.2
SSMIX 023	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.3	3.3	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.1	1.4	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.4	3.2	3.4	3.5
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.1	1.3	1.3	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6
SSMIX 025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.1	3.2	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.3	1.3	1.4	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.4	3.3	3.3	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.3	1.3	1.2	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.8	2.7	2.7	2.8
ECO 008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.1	3.1	3.2	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.4	1.3	1.2	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	2.9	3.1	3.0	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.3	1.3	1.3	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	2.9	3.0	3.0
SSWC 110	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.4	1.3	1.3	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.4	3.0	2.9	2.8
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.9	3.0	2.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.3	1.3	1.3	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	3.0	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 25 ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 192 ชั่วโมง

Treat.	ค่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ (เซนติเมตร)																										
Isolates	Control					Purified cell					Purified sterilize cell					Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
ERO 001	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.5	1.4	1.5	1.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2
EWC 065	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.0	1.2	1.1	1.2	1.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1
RCO 010	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3
RWC 021	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.1	1.3	1.0	1.1	1.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.0	1.2	1.2	1.1	1.2
SSMIX 013	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.3	1.2	1.2	1.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.0	1.3	1.0	1.3
SSMIX 020	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.1	1.2	1.1	1.0	1.3
SSMIX 023	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.1	1.2	1.2	1.2	1.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.2	1.0	1.1	1.1
SSMIX 025	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.3	1.4	1.4	1.3	1.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.2	1.1	1.2	1.2	1.4
ECO 008	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.5	1.6	1.5	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.4	1.5	1.4	1.5	1.4
SSWC 110	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.6	1.3	1.5	1.5	1.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1.5	1.6	1.4	1.1	1.7

ตารางภาคผนวกที่ 26 ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพที่เจริญบนอาหาร PDB ด้วยวิธี agar diffusion method จากการบันทึกค่าที่ 192 ชั่วโมง

Treat.	ค่าบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* ในแต่ละซ้ำ(เซนติเมตร)																													
Isolates	Control					Purified cell						Purified sterilize cell						Metalaxyl					Cell–free culture filtrate					Cell culture				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r1	r2	r3	r4	r5	r1
ERO 001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.3	3.2	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	2.4	2.5	0.4	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.3	3.1	3.1	3.2
EWC 065	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.3	3.4	3.3	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.4	3.4	3.3	3.4
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	3.5	3.6	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.2
RCO 010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	4.5	4.4	4.4	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.4	4.4	4.3	4.4	4.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.4	4.4	4.5	4.4	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.4	4.3	4.3	4.5	4.4
RWC 021	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.2	3.5	3.4	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.3	3.3	3.4	3.3
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	2.9	3.0	3.1	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.3	3.2	3.2	3.2
SSMIX 013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	3.3	3.3	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.5	3.2	3.5	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.0	3.1	3.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.0	3.2	3.1	3.2
SSMIX 020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.3	3.4	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.3	3.4	3.5	3.2
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.0	3.2	3.2
SSMIX 023	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	3.3	3.3	3.3	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3	3.5	3.4	3.4
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.0	3.0	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	3.5	3.6	3.6
SSMIX 025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.1	3.2	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	3.4	3.3	3.3	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.2	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.2	3.1	3.1
ECO 008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	3.1	3.1	3.2	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	3.0	3.1	3.0	3.1
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.1	3.0	3.0
SSWC 110	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	3.2	3.0	3.0	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.9	3.1	3.4	2.8
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.9	3.0	2.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	3.0	3.0	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 27 ค่าการเจริญเติบโตในด้านจำนวนใบจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	จำนวนใบในแต่ละซ้ำ (ใบ)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	13	12	13	13	12	24	16	22	21	22
Bacillus sp. ERO 001	16	12	13	11	11	23	22	23	18	20
Bacillus sp. EWC 065	16	12	13	12	10	21	21	24	24	23
Bacillus sp. RCO 010	12	13	17	10	11	20	21	24	25	23
Bacillus sp. RWC 021	16	13	12	15	11	23	25	24	25	19
Bacillus sp. SSMIX 013	12	13	15	15	15	20	21	18	22	23
Bacillus sp. SSMIX 020	14	15	15	6	13	25	13	22	19	27
Bacillus sp. SSMIX 023	13	14	15	16	15	21	21	16	27	26
Bacillus sp. SSMIX 025	15	14	15	17	13	21	20	25	22	19
Pseudomonas sp. ECO 008	13	16	15	12	12	22	25	21	28	21
Pseudomonas sp. SSWC 110	15	18	14	19	12	24	24	23	20	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 28 ค่าการเจริญเติบโตในด้านจำนวนใบจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	จำนวนใบในแต่ละซ้ำ (ใบ)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	8.0	9.0	8.0	7.0	9.0	17	13	14	13	14
Bacillus sp. ERO 001	9.0	9.0	8.0	8.0	7.0	16	17	14	16	15
Bacillus sp. EWC 065	8.0	9.0	10.0	7.0	7.0	11	17	16	17	10
Bacillus sp. RCO 010	7.0	8.0	8.0	8.0	9.0	17	15	17	14	13
Bacillus sp. RWC 021	9.0	12.0	8.0	9.0	10.0	17	13	16	20	10
Bacillus sp. SSMIX 013	9.0	9.0	9.0	10.0	11.0	20	12	17	11	23
Bacillus sp. SSMIX 020	9.0	13.0	13.0	7.0	11.0	11	17	23	20	19
Bacillus sp. SSMIX 023	8.0	7.0	9.0	10.0	10.0	18	15	14	17	16
Bacillus sp. SSMIX 025	8.0	10.0	12.0	9.0	8.0	17	18	11	17	16
Pseudomonas sp. ECO 008	7.0	11.0	18.0	9.0	8.0	22	17	16	17	16
Pseudomonas sp. SSWC 110	10.0	11.0	11.0	12.0	10.0	17	19	19	13	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 29 ค่าการเจริญเติบโตในด้านความกว้างทรงพุ่มจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	ความกว้างทรงพุ่มในแต่ละซ้ำ (เซนติเมตร)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	17.5	21.0	21.5	18.0	20.0	16.0	15.0	13.5	16.5	13.0
Bacillus sp. ERO 001	18.5	19.5	20.5	20.5	19.0	14.5	13.0	17.5	14.5	16.5
Bacillus sp. EWC 065	20.5	21.0	22.5	20.5	20.0	15.5	14.5	15.5	15.0	18.0
Bacillus sp. RCO 010	17.0	20.0	23.5	23.5	22.0	18.0	15.5	15.0	16.0	15.0
Bacillus sp. RWC 021	21.5	21.0	20.5	22.5	20.0	18.0	16.0	17.0	14.0	17.0
Bacillus sp. SSMIX 013	17.5	20.0	22.5	21.0	24.5	16.5	18.5	17.5	13.5	15.0
Bacillus sp. SSMIX 020	23.5	22.5	22.0	23.0	23.5	14.5	14.5	17.0	15.5	14.0
Bacillus sp. SSMIX 023	20.0	19.0	18.0	19.0	23.0	15.0	14.5	14.5	18.0	16.5
Bacillus sp. SSMIX 025	20.0	23.0	20.5	19.5	21.5	16.5	18.0	16.5	17.5	15.5
Pseudomonas sp. ECO 008	24.0	23.0	21.0	21.0	21.5	15.5	17.5	15.0	18.5	17.0
Pseudomonas sp. SSWC 110	22.0	23.0	20.0	26.0	22.5	17.0	17.0	16.0	15.5	15.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 30 ค่าการเจริญเติบโตในด้านความกว้างทรงพุ่มจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	ความกว้างทรงพุ่มในแต่ละซ้ำ (เซนติเมตร)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	13.0	17.0	12.0	15.5	16.5	14.5	14.0	12.5	14.5	13.5
Bacillus sp. ERO 001	17.0	18.5	16.0	15.5	17.5	14.0	15.0	15.5	15.5	14.5
Bacillus sp. EWC 065	18.5	19.5	12.5	16.0	17.5	11.5	15.0	16.0	19.5	16.0
Bacillus sp. RCO 010	15.0	18.5	19.0	16.0	19.0	14.5	16.5	16.0	16.5	15.0
Bacillus sp. RWC 021	18.5	21.0	15.5	17.0	15.5	14.5	16.0	15.0	15.5	16.0
Bacillus sp. SSMIX 013	15.5	15.0	16.5	20.0	19.0	15.5	15.0	17.0	18.0	10.5
Bacillus sp. SSMIX 020	18.0	20.0	21.5	14.0	18.0	14.5	12.0	15.5	13.5	14.5
Bacillus sp. SSMIX 023	14.0	14.5	17.0	19.0	17.5	16.0	13.0	13.0	12.5	15.0
Bacillus sp. SSMIX 025	16.0	16.5	20.5	17.0	17.0	15.0	14.0	16.0	16.0	15.5
Pseudomonas sp. ECO 008	19.0	20.5	17.5	18.0	18.5	16.5	14.5	17.0	17.5	17.0
Pseudomonas sp. SSWC 110	21.5	17.0	18.0	20.5	18.0	15.5	15.5	16.0	18.0	13.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 31 ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักสดต้นจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	น้ำหนักสดต้นในแต่ละซ้ำ (กรัม)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	45.14	45.90	40.70	35.43	35.85	92.14	64.10	82.43	72.50	74.65
Bacillus sp. ERO 001	41.86	40.51	43.22	41.33	39.20	73.70	95.17	84.63	96.08	68.91
Bacillus sp. EWC 065	54.67	43.20	59.34	55.76	36.99	106.52	84.56	87.86	97.19	118.50
Bacillus sp. RCO 010	37.45	45.71	50.26	37.73	37.43	87.43	68.23	94.67	99.00	83.54
Bacillus sp. RWC 021	46.36	46.38	48.84	50.52	38.15	73.84	111.98	69.98	100.29	103.50
Bacillus sp. SSMIX 013	36.89	40.04	43.89	40.54	43.80	70.41	84.86	77.69	84.92	76.42
Bacillus sp. SSMIX 020	46.65	55.63	48.94	52.36	47.51	130.94	107.74	115.23	52.71	119.16
Bacillus sp. SSMIX 023	42.71	51.40	52.87	45.67	50.19	104.83	79.90	46.80	97.35	88.18
Bacillus sp. SSMIX 025	34.86	52.36	45.81	52.71	39.06	79.56	116.31	82.63	76.38	47.30
Pseudomonas sp. ECO 008	57.46	53.51	48.60	56.34	46.30	105.40	116.78	141.88	83.62	80.71
Pseudomonas sp. SSWC 110	53.59	57.96	46.78	63.31	43.70	123.39	105.71	96.18	127.42	70.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 32 ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักสดต้นจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	น้ำหนักสดต้นในแต่ละซ้ำ (กรัม)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	11.42	14.21	13.53	9.65	12.14	49.44	37.26	38.42	42.51	58.37
Bacillus sp. ERO 001	12.21	16.90	12.41	17.85	13.71	64.80	63.39	52.57	49.98	64.90
Bacillus sp. EWC 065	16.50	11.23	10.60	9.83	12.94	27.46	54.58	67.80	58.21	38.65
Bacillus sp. RCO 010	9.66	14.95	19.18	13.74	21.86	64.13	63.49	76.02	39.75	44.83
Bacillus sp. RWC 021	15.19	25.11	12.68	15.18	9.99	50.98	39.51	47.38	85.54	41.43
Bacillus sp. SSMIX 013	15.81	10.52	14.29	17.60	16.78	60.27	20.38	67.54	25.58	84.03
Bacillus sp. SSMIX 020	17.67	23.05	25.64	12.59	11.59	17.40	68.67	81.08	56.58	68.11
Bacillus sp. SSMIX 023	14.88	9.69	18.20	10.51	8.52	37.46	53.38	45.59	48.51	45.75
Bacillus sp. SSMIX 025	10.34	12.77	18.45	12.11	11.02	48.90	40.63	41.89	78.51	60.82
Pseudomonas sp. ECO 008	21.52	17.03	14.72	17.31	18.35	86.95	53.89	50.21	53.23	60.75
Pseudomonas sp. SSWC 110	17.68	16.23	20.78	19.48	17.05	57.32	60.82	61.61	79.59	52.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 33 ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักสดรากจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	น้ำหนักสดรากในแต่ละซ้ำ (กรัม)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	10.94	12.45	13.15	10.76	9.08	15.32	13.91	13.48	13.96	18.65
Bacillus sp. ERO 001	10.94	13.32	12.72	12.64	12.62	15.84	16.52	12.54	19.31	12.83
Bacillus sp. EWC 065	16.14	18.12	17.35	14.70	17.43	19.50	17.78	19.97	17.07	16.22
Bacillus sp. RCO 010	14.11	14.75	12.80	16.05	13.13	18.28	16.85	19.23	18.67	16.73
Bacillus sp. RWC 021	13.93	15.92	17.43	17.58	12.78	15.84	21.62	14.71	20.39	17.26
Bacillus sp. SSMIX 013	9.06	12.25	11.01	14.95	17.10	11.89	18.45	16.65	15.68	16.16
Bacillus sp. SSMIX 020	17.22	17.15	15.50	18.82	15.01	23.63	22.61	20.63	14.96	20.48
Bacillus sp. SSMIX 023	13.25	14.04	15.69	13.60	14.62	17.02	18.86	16.58	19.38	17.65
Bacillus sp. SSMIX 025	9.45	12.24	17.79	18.75	12.32	15.66	20.02	18.60	17.17	21.12
Pseudomonas sp. ECO 008	18.72	14.33	18.72	16.98	15.24	17.39	19.15	20.49	21.47	26.84
Pseudomonas sp. SSWC 110	17.32	13.57	15.74	19.43	19.58	18.34	20.56	25.39	17.70	16.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 34 ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักสดรากจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	น้ำหนักสดรากในแต่ละซ้ำ (กรัม)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	4.43	5.21	4.15	7.18	4.93	11.23	10.89	8.10	9.63	13.54
Bacillus sp. ERO 001	5.70	6.69	6.48	8.52	6.89	17.54	19.81	11.80	8.34	10.68
Bacillus sp. EWC 065	4.13	5.33	4.20	4.18	8.13	6.83	14.02	13.95	12.39	11.10
Bacillus sp. RCO 010	4.15	5.28	5.04	5.82	6.81	12.21	11.90	14.91	17.78	8.34
Bacillus sp. RWC 021	7.24	8.56	5.71	7.11	3.16	14.17	10.66	11.54	15.63	10.23
Bacillus sp. SSMIX 013	5.76	4.26	6.11	4.96	5.16	13.01	7.57	12.30	11.74	14.98
Bacillus sp. SSMIX 020	6.46	7.74	9.76	5.86	4.49	13.95	14.18	10.62	15.36	15.48
Bacillus sp. SSMIX 023	6.60	5.66	8.39	5.59	4.93	11.53	9.84	13.32	8.66	16.84
Bacillus sp. SSMIX 025	3.84	5.84	6.89	5.57	7.68	11.44	11.03	17.32	9.95	12.54
Pseudomonas sp. ECO 008	7.54	7.12	8.59	8.22	9.33	14.18	15.12	10.62	13.65	13.57
Pseudomonas sp. SSWC 110	6.44	5.30	7.48	9.01	7.54	12.19	15.98	12.47	11.96	10.74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 35 ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักแห้งต้นจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละซ้ำ (มิลลิกรัม)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	1200.9	1133.3	863.1	1171.7	817.8	1021.2	1109.8	1515.5	1829.2	1701.0
Bacillus sp. ERO 001	1198.6	1784.5	1214.5	1221.5	1236.4	1492.6	1909.8	1534.6	1964.5	933.6
Bacillus sp. EWC 065	1341.5	1356.5	1264.5	1031.6	1411.7	2016.9	2002.1	2011.4	2310.4	2077.1
Bacillus sp. RCO 010	1109.4	965.3	1255.7	996.9	863.1	1581.4	1564.5	1684.5	1314.9	1652.5
Bacillus sp. RWC 021	1109.9	1190.3	976.7	1016.1	963.6	1059.0	2064.1	1775.7	1462.8	1223.2
Bacillus sp. SSMIX 013	1211.1	1273.9	941.1	819.3	978.4	1480.8	1687.4	2452.5	1390.5	1869.5
Bacillus sp. SSMIX 020	1175.0	1252.3	911.1	1083.6	1056.6	1389.6	2053.8	1564.3	1610.9	1343.7
Bacillus sp. SSMIX 023	1321.5	1499.2	1607.3	1522.4	960.4	1365.3	1425.2	1467.8	1765.6	1365.2
Bacillus sp. SSMIX 025	1277.9	1295.6	1215.2	1516.8	1060.3	1865.3	1468.4	2071.7	1639.4	1486.7
Pseudomonas sp. ECO 008	1231.5	1615.4	1108.9	1645.4	1845.4	2212.1	1652.5	2054.2	2192.7	2084.7
Pseudomonas sp. SSWC 110	1754.0	1446.4	1348.5	2169.8	1544.3	2242.3	2354.5	2553.6	1895.6	1579.6

ตารางภาคผนวกที่ 36 ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักแห้งต้นจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละซ้ำ (มิลลิกรัม)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	796.5	467.8	911.5	912.7	577.9	1027.9	1162.3	1266.7	1186.7	537.9
Bacillus sp. ERO 001	704.5	778.8	843.9	990.4	778.8	1094.6	1206.0	1174.0	1233.8	1134.9
Bacillus sp. EWC 065	505.9	942.3	684.5	1164.5	1020.5	964.3	1301.9	1518.3	396.5	1056.5
Bacillus sp. RCO 010	806.2	1186.2	711.2	527.7	989.7	1199.1	1387.6	756.9	1366.0	949.5
Bacillus sp. RWC 021	1006.4	754.1	1358.8	950.1	766.2	1027.5	1053.4	1296.1	1017.3	1100.3
Bacillus sp. SSMIX 013	826.0	865.4	594.3	919.1	882.4	998.6	1301.5	1382.3	869.7	903.5
Bacillus sp. SSMIX 020	1365.0	727.6	947.9	1393.0	977.0	1228.4	1086.5	1220.9	1051.7	805.2
Bacillus sp. SSMIX 023	862.9	1081.3	654.0	540.7	581.2	1132.5	1123.1	1514.9	894.0	986.5
Bacillus sp. SSMIX 025	575.9	674.3	926.5	661.8	956.6	1186.5	1616.8	956.2	1443.8	621.2
Pseudomonas sp. ECO 008	1076.5	914.7	1175.7	763.3	1140.6	1197.5	1172.0	1492.2	1349.4	1108.7
Pseudomonas sp. SSWC 110	1007.0	946.9	1024.9	1202.4	1170.4	1346.5	1435.2	1137.9	1459.6	1585.4

ตารางภาคผนวกที่ 37 ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักแห้งรากจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	น้ำหนักแห้งรากในแต่ละซ้ำ (มิลลิกรัม)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	164.5	134.7	143.3	218.8	214.1	317.4	298.4	291.3	195.8	213.5
Bacillus sp. ERO 001	198.3	180.3	245.1	164.3	209.2	265.4	345.2	437.6	322.6	279.5
Bacillus sp. EWC 065	153.2	281.6	208.6	232.4	208.3	349.7	391.7	398.2	252.2	331.7
Bacillus sp. RCO 010	198.2	142.3	227.4	200.4	225.1	265.4	271.6	232.6	259.3	323.0
Bacillus sp. RWC 021	241.9	206.2	216.3	107.5	279.0	216.1	343.0	346.4	237.2	247.9
Bacillus sp. SSMIX 013	245.7	188.6	200.2	234.1	274.8	270.0	425.2	418.8	248.3	357.8
Bacillus sp. SSMIX 020	163.8	166.8	217.0	277.3	229.5	204.7	347.0	291.5	290.1	195.8
Bacillus sp. SSMIX 023	297.7	72.0	213.8	274.1	160.7	212.8	253.5	283.7	376.4	198.9
Bacillus sp. SSMIX 025	303.5	198.9	296.0	176.4	217.2	283.6	245.4	307.4	364.4	201.7
Pseudomonas sp. ECO 008	318.6	286.5	243.1	115.9	312.4	375.4	398.5	321.2	394.5	435.1
Pseudomonas sp. SSWC 110	308.8	241.5	330.7	273.6	104.9	386.2	342.1	308.7	370.5	456.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 38 ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักแห้งรากจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	น้ำหนักแห้งรากในแต่ละซ้ำ (มิลลิกรัม)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	82.4	100.2	119.7	104.4	110.1	138.9	142.4	212.0	199.6	144.5
Bacillus sp. ERO 001	196.2	123.6	159.9	110.4	83.6	163.2	167.9	207.1	218.7	190.9
Bacillus sp. EWC 065	173.2	79.5	66.1	152.7	144.3	206.7	224.0	136.9	134.2	214.5
Bacillus sp. RCO 010	154.5	125.3	99.3	118.0	100.2	274.3	203.4	134.5	158.0	252.5
Bacillus sp. RWC 021	110.4	73.4	76.1	125.8	154.2	175.6	135.5	184.8	226.5	159.7
Bacillus sp. SSMIX 013	161.4	112.4	111.7	114.7	188.4	172.8	143.6	194.6	132.1	292.3
Bacillus sp. SSMIX 020	115.5	104.0	116.2	151.7	99.0	144.6	215.7	177.3	216.9	188.9
Bacillus sp. SSMIX 023	96.9	182.7	125.6	100.7	102.1	172.7	203.0	147.9	191.0	136.4
Bacillus sp. SSMIX 025	146.5	100.9	134.4	83.8	73.4	106.1	140.8	267.6	181.4	165.8
Pseudomonas sp. ECO 008	155.0	92.8	108.2	205.5	177.0	320.3	195.2	186.7	196.7	200.1
Pseudomonas sp. SSWC 110	156.0	118.3	152.9	143.2	121.7	138.6	169.3	285.9	253.8	194.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 39 ค่าการเจริญเติบโตในด้านความยาวรากรากจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Butter head ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	ความยาวรากในแต่ละซ้ำ (เซนติเมตร)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	36.5	25.6	27.8	42.6	28.7	32.5	25.6	27.8	42.6	28.7
Bacillus sp. ERO 001	36.5	30.3	29.7	33.6	36.1	34.5	38.1	31.4	29.6	33.4
Bacillus sp. EWC 065	32.9	43.5	31.2	38.5	30.4	37.4	37.6	34.7	36.5	33.2
Bacillus sp. RCO 010	30.4	29.2	37.6	34.9	30.6	32.5	24.9	30.8	41.2	42.3
Bacillus sp. RWC 021	40.2	48.6	38.9	39.3	35.1	48.6	36.5	34.6	33.2	39.5
Bacillus sp. SSMIX 013	40.6	43.9	46.2	35.1	41.9	33.5	28.4	28.6	34.3	33.2
Bacillus sp. SSMIX 020	31.5	34.7	44.5	47.8	42.6	30.7	43.5	40.1	44.6	42.3
Bacillus sp. SSMIX 023	31.2	29.8	39.6	26.3	37.6	33.5	31.4	33.5	46.2	39.7
Bacillus sp. SSMIX 025	30.7	36.5	29.8	34.9	39.6	41.2	37.6	50.6	37.5	33.6
Pseudomonas sp. ECO 008	41.1	39.4	43.1	46.4	41.8	39.6	36.4	46.6	40.5	38.1
Pseudomonas sp. SSWC 110	41.5	40.3	41.0	39.6	34.2	46.6	34.8	43.3	43.2	39.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 40 ค่าการเจริญเติบโตในด้านความยาวรากจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชจากการปลูก *Lactuca sativa* L. cv. Red coral ในระบบ NFT

ชื่อสายพันธุ์	ความยาวรากในแต่ละซ้ำ (เซนติเมตร)									
	การปลูกครั้งที่ 1					การปลูกครั้งที่ 2				
	r1	r2	r3	r4	r5	r1	r2	r3	r4	r5
Control Healthy	25.1	27.6	26.7	31.4	22.0	31.0	30.6	32.5	28.9	28.7
Bacillus sp. ERO 001	26.5	29.5	29.3	28.8	22.7	34.6	41.3	33.1	32.5	33.1
Bacillus sp. EWC 065	26.4	28.1	25.1	30.4	24.6	28.6	34.2	34.1	30.2	24.9
Bacillus sp. RCO 010	19.8	28.5	30.4	31.5	30.4	31.2	32.5	37.5	33.5	30.1
Bacillus sp. RWC 021	41.5	39.4	34.6	27.5	28.5	40.1	34.2	33.2	39.2	24.8
Bacillus sp. SSMIX 013	28.4	36.7	27.5	34.6	42.8	33.2	23.5	27.9	36.8	36.6
Bacillus sp. SSMIX 020	37.5	39.4	33.4	29.5	28.4	16.8	30.5	39.4	28.7	37.7
Bacillus sp. SSMIX 023	27.6	32.5	25.7	21.5	34.6	32.1	30.1	28.7	33.3	31.6
Bacillus sp. SSMIX 025	28.6	35.4	24.9	27.6	30.4	34.5	29.8	39.6	32.1	38.4
Pseudomonas sp. ECO 008	33.5	30.4	36.7	37.5	36.3	34.5	33.5	40.1	34.6	33.2
Pseudomonas sp. SSWC 110	36.4	30.5	32.7	31.7	32.5	31.6	32.6	33.3	33.4	36.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 41 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช ด้วยวิธี split root technique บันทึกผลวันที่ 1

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[1]				
	1	2	3	4	5
Control Healthy	0	0	0	0	0
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	1	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	1	0	0	0	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	0	0	0	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	0	1	0	0	0

[1]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 42 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตราก พืช ด้วยวิธี split root technique บันทึกผลวันที่ 2

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[1/]				
	1	2	3	4	5
Control Healthy	1	0	0	0	0
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	0	0
Bacillus sp. EWC 065	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	0
Bacillus sp. RWC 021	1	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 023	1	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	1	1	0	0	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	0	0	0	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	1	0	1	1	0

[1/]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 43 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตราก พืช ด้วยวิธี split root technique บันทึกผลวันที่ 3

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[1/]				
	1	2	3	4	5
Control Healthy	0	1	0	0	0
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	1	0
Bacillus sp. EWC 065	0	1	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	1
Bacillus sp. RWC 021	1	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	1	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	1	0
Bacillus sp. SSMIX 023	0	1	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	1	1	0	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	1	0	0	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	1	2	2	1	0

[1/]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 44 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตราก พืช ด้วยวิธี split root technique บันทึกผลวันที่ 4

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[1/]				
	1	2	3	4	5
Control Healthy	1	1	0	0	0
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	1	0
Bacillus sp. EWC 065	0	1	0	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	0	1
Bacillus sp. RWC 021	1	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	1	0
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	1	0
Bacillus sp. SSMIX 023	1	1	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	0	1	1	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	1	1	0	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	1	2	2	1	0

[1/]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 45 ค่าความรุนแรงของการเกิดโรคจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช ด้วยวิธี split root technique บันทึกผลวันที่ 5

ชื่อสายพันธุ์	ความรุนแรงของการเกิดโรคในแต่ละซ้ำ[1]				
	1	2	3	4	5
Control Healthy	1	2	0	0	0
Bacillus sp. ERO 001	0	0	0	1	0
Bacillus sp. EWC 065	0	1	1	0	0
Bacillus sp. RCO 010	0	0	0	1	1
Bacillus sp. RWC 021	1	0	0	0	0
Bacillus sp. SSMIX 013	0	0	0	1	1
Bacillus sp. SSMIX 020	0	0	0	1	1
Bacillus sp. SSMIX 023	2	1	1	0	0
Bacillus sp. SSMIX 025	0	1	1	0	0
Pseudomonas sp. ECO 008	0	1	2	1	0
Pseudomonas sp. SSWC 110	2	2	3	1	1

[1]สเกลค่าความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ซึ่ง 0 = ไม่ปรากฏอาการ, 1 = ปรากฏอาการ 1–25 เปอร์เซ็นต์ 2 = ปรากฏอาการ 26–50 เปอร์เซ็นต์ 3 = ปรากฏอาการ 51–75 เปอร์เซ็นต์ และ 4 = ปรากฏอาการ 76–100 เปอร์เซ็นต์ ของอาการรากเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ- นามสกุล นายจักรพงษ์ หรั่งเจริญ

วัน เดือน ปีเกิด 23 พฤษภาคม 2526

ที่อยู่ 22/231 หมู่ 13 โชคชัยสี่ แยก 68 เขตลาดพร้าว แขวงลาดพร้าว
กรุงเทพฯ 10230 โทร 089-8279939

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2540 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสตรีวิทยา2 มัธยมศึกษาตอนต้น

พ.ศ. 2543 มัธยมศึกษาตอนปลาย(สายวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) โรงเรียนสตรีวิทยา2

พ.ศ. 2547 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงาน การอบรม

พ.ศ. 2549

: ตำแหน่งนักวิจัยและพัฒนา บริษัท เคมิคัล เซ้นจ์ จำกัด 258 ซอยพัฒนาการ 29 ถนนพัฒนาการ แขวงสวนหลวง เขตสวนหลวง กรุงเทพฯ 10250 ตั้งแต่วันที่ 3 มกราคม ถึง 30 เมษายน 2549

: ตำแหน่งนักวิจัยและพัฒนา: part time (ร่วมกับที่ปรึกษางานผลิตและตรวจสอบคุณภาพ) บริษัท บริษัท อโกร โซลูชั่น จำกัด (บริษัทในเครือเดียวกับ บริษัท เคมิคัล เซ้นจ์ จำกัด) 258 ซอยพัฒนาการ 29 ถนนพัฒนาการ แขวงสวนหลวง เขตสวนหลวง กรุงเทพฯ 10250 ตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม 49 ถึง 30 เมษายน 50

พ.ศ. 2550

: Participant of the International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development. KMITL, Bangkok, Thailand. April 26-27, 2550

พ.ศ. 2551

: Participant of Organic symposium and regional workshop, Bangkok 2008. "Organic Symposium and Bangkok Organic" to be held in The Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand. 8 September 2008 and "Regional Workshop and Organic Symposium" to be held in Asian Institute of Technology, Pathumthani, Thailand. 9-10 September 2008.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

: เข้าร่วมสัมนาวิชาการเรื่อง "ความปลอดภัยทางชีวภาพ ลาดกระบังพร้อมแล้วหรือยัง" วันที่ 30 กรกฎาคม 2551.ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

พ.ศ. 2552

: ฝึกปฏิบัติงานด้านแบคทีเรียทั่วไป กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี ระหว่างวันที่ 7 เมษายน ถึง 30 เมษายน 2552

: เข้าร่วมสัมนาวิชาการเรื่อง "วิธีการกำจัดขยะพิษในห้องปฏิบัติการทางเคมี/ชีวภาพ" วันที่ 18 มิถุนายน 2552. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

ผลงานการวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ. 2547. ประสิทธิภาพของเมธิลยูจีนอลจากสารสกัด และจากน้ำมันหอมระเหยของกะเพราขาว,กะเพราแดงในการดึงดูดแมลงวันทอง, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [Diptera: Tephritidae]. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทวีศักดิ์ พจน์กระจ่าง **จักรพงษ์ หรั่งเจริญ** และพรหมมาศ คูหากาญจน์. 2549. ประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดที่แยกได้จากระบบการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน.วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37(6) (พิเศษ):983-986.

พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ **จักรพงษ์ หรั่งเจริญ**. 2550. กลไกของแบคทีเรียเขตรากพืชไอโซเลท R10 ในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าของพืชผักที่ปลูกในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ณ. โรงแรมอัมรินทร์ลากูล อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างวันที่ 20-22 พฤศจิกายน 2550: 66-67.

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2550. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ K3 ในการควบคุมเชื้อ *Pythium aphanidermatum*. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ณ. โรงแรมอัมรินทร์ลากูล อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างวันที่ 20-22 พฤศจิกายน 2550: 232-233.

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ. 2550. การศึกษาคุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท R10/1, R10/2, R10/3, K3 และ K16 ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp. ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติพัธน์ สมนึก, **จักรพงษ์ หรั่งเจริญ** และ มานพ นชะพงษ์. 2551. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการควบคุมเชื้อ *Aspergillus* spp. การประชุมวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 34. ณ.ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์, กรุงเทพ, ประเทศไทย. ระหว่างวันที่ 31 ตุลาคม ถึง 2 พฤศจิกายน 2551.

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ, นงลักษณ์ เภรินทวงค์, ถนิมนันต์ เจนอักษร และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2551. การแยกแบคทีเรียเขตรากพืชจากผักสลัดในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินเพื่อใช้การควบคุมเชื้อ*Pythium* spp. การประชุมวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34. ณ.ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์, กรุงเทพ, ประเทศไทย. ระหว่างวันที่ 31 ตุลาคม ถึง 2 พฤศจิกายน 2551.

Chakrapong Rangjaroen, Tanimnun Jaenaksorn, Nonglak Painthawong and Prommart Koohakan. 2009. Study on Some Characteristics of Selected Rhizosphere Bacteria in Hydroponics for Their Controlling of *Pythium* spp. Proc. of TRF-Master Research Congress III. Apr. 1-3, 2009. Jomtien Plam Beach Resort, Pattaya, Chonburi. p 526.

จักพงษ์ หรั่งเจริญ และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2552. การยับยั้งโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินขนาดเล็ก. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8 ณ. โรงแรม ดิเอ็มเพลส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 5 – 8 พฤษภาคม 2552.

ประกาศเกียรติคุณ / เกียรติบัตรที่ได้รับ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

: ได้รับเกียรติบัตรการเป็นอนุกรรมการ (STAFF) ในการประชุมวิชาการนานาชาติ The 1st KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development held at King Mougkut's Institute of Technology Ladkrabung. ระหว่างวันที่ 25-26 สิงหาคม 2547

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

: ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ประจำปี 2551 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

: ทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี-สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้