

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง
เชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด

Potential Microbes Selection to Control Mushroom
Pathogens in Mushroom Farm

ธิติยา รัตนะเควิล

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง
เชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด

Potential Microbes Selection to Control Mushroom
Pathogens in Mushroom Farm

ธิติยา รัตนะเควิล

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

Potential Microbes Selection to Control Mushroom
Pathogens in Mushroom Farm

THITIYA RATTANAKAVIL

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF APPLIED BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อสหกิจศึกษา	การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธิตยา รัตนะเควิต
รหัสประจำตัว	57050835
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ (สจล.) และ ดร.ต้นติมา กำลัง (วว.)

บทคัดย่อ

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างและคัดแยกศัตรูเห็ดในโรงเพาะเห็ดมารยาทฟาร์ม อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี คัดแยกเชื้อก่อโรคได้ 9 ไอโซเลทแบ่งเป็น fluorescent *Pseudomonas* 4 ไอโซเลทเชื้อ *Trichoderma* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการก่อเกิดโรคในดอกเห็ดพบว่าก่อให้เกิดโรคในดอกเห็ด จากนั้นคัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคจำนวน 28 ไอโซเลท ด้วยวิธี “T-streak” และ วิธี dual culture พบว่ามีเชื้อปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้ง fluorescent *Pseudomonas* และ 1 ไอโซเลท ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Trichoderma* spp. มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อทั้งสองโดยใช้เทคนิค colony PCR วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rRNA ของเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยใช้ไพรเมอร์ forward และ reverse คือ 6F: 5’GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG3’ และ 1510R: 5’GTGCTGCAGGGTTACCTTGTTACGACT3’ ตามลำดับ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacers region (ITS) ของเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยใช้ไพรเมอร์ forward และ reverse คือ ใช้ไพรเมอร์ ITS1: 5’CTTGGTCATTTAGAG GAAGTAA3’ และ ITS4: 5’TCCTCCGCTTATTGATATGC3’ ตามลำดับ และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit และสามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas entomophila*, *Trichoderma longibrachiatum* และ *Trichoderma viride*

คำสำคัญ : แบคทีเรียปฏิปักษ์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โรงเพาะเห็ด พืชอาหาร

Title	Potential Microbes Selection to Control Mushroom Pathogens in Mushroom Farm
Student Name	Miss Thitiya Rattanakavil
Student ID	57050835
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology Program)
Department	Biology
Faculty	Science
Year	2017
Advisor	Dr.Khanungkan Klanbut (KMITL) and Dr. Tantima Kumlung (TISTR)

Abstract

The randomised of mushroom pathogens were isolated from Marayat farm Thanyaburi Pathumthani. Nine isolates were collected and four of them classified by King's medium B under fluorescent light, four isolates classified to be *Pseudomonas* spp. and five isolates were classified to be *Trichoderma* spp. Pathogenicity tests were conducted by inoculating fresh mushrooms with pathogen, then examined the ability to create brown spot on the mushrooms. 28 isolates of bacterial were examined against pathogens by "T-streak" method and dual culture method. There were 2 isolates from 28 isolates againsted fluorescent *Pseudomonas* and only 1 isolate has percentage of inhibition more than 50% againsted *Trichoderma* spp.. The amplification of *Pseudomonas* spp. could be detected by colony PCR of the 16s rRNA and performed with forward and reverse primers which are 6F: 5'GGAGAGTTAGATCTTGCC TCAG3' and 1510R: 5'GTGCTGCAGGGTTACCTTGTTACGACT3' and the amplification of *Trichoderma* spp. could be detected by colony PCR of the Internal Transcribed Spacers region (ITS) and performed with forward and reverse primers which are ITS1: 5'CTTGCT CATTAGAGGAAGTAA3' and ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'. The analysis of DNA sequences were aligned using BioEdit software, and the taxonomic identification of the strains was carried out and propose to be Genus *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas entomophila*, *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma viride*.

Keywords : bacterial antagonism, bioactive compound, cultivated mushroom, PCR

กิตติกรรมประกาศ

สหกิจศึกษาสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์อย่างสูงจาก ดร.ต้นติมา กำลิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่กรุณาให้คำปรึกษา เรื่องการค้นคว้าข้อมูลงานวิจัย การปฏิบัติงาน การจัดทำรูปแบบโครงการพิเศษ ตลอดจนข้อปรับปรุงแก้ไข ข้อบกพร่องด้วยความใส่ใจ ดิฉันตระหนักถึงความใส่ใจและความทุ่มเทของ อาจารย์และกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำแนะนำ ในการปรับปรุงแก้ไขโครงการพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์จน ประสบผลสำเร็จ และ ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการสอบสหกิจศึกษา

ขอขอบพระคุณพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการ ครอบครัว เพื่อนๆ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำข้อเสนอแนะ ต่างๆ ตลอดจนรายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

หวังว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคคลากรทางการศึกษาและผู้ที่เกี่ยวข้องทั่วไป ตลอดจน เป็นประโยชน์แก่ผู้ที่ศึกษาและนำไปพัฒนาต่อไป

ชิตติยา รัตน์ะเควิล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ความสำคัญของเห็ด	4
2.1.1 การเพาะเห็ดในประเทศไทย	4
2.2 เชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคในโรงเพาะเห็ด	5
2.2.1 การปนเปื้อนจากเชื้อรา	5
2.2.2 การปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย	12
2.3 การควบคุมโรคโดยชีววิธี	13
2.3.1 เชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	13
2.3.2 แอคติโนมัยซีท	14
2.3.3 Thermophilic และ Thermotolerant actinobacteria	16
2.3.4 สารสกัดจากแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	19
3.1 อุปกรณ์	19
3.2 เครื่องมือ	20
3.3 สารเคมี	20
3.4 เชื้อที่ใช้ในงานวิจัย	21
3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
3.5.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อจากก้อนเห็ด	22
3.5.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp.	22
3.5.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Trichoderma</i> spp.	23
3.6 แอคติโนมัยซีท	23
3.6.1 การเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยการเตรียม spore suspension	23
3.6.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท	23
3.6.3 การเทียบสีมาตรฐานตามระบบ NBS/IBCC color system	24
3.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	24
3.8 ตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)	25
3.8.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp. วิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)	25
3.8.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)	26
3.9 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น	27
3.9.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Pseudomonas</i> spp. โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	27
3.9.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. โดยเชื้อแอคติโนมัยซีท	28
3.9.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	29
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด	29
4.1.1 ลักษณะการเรืองแสงภายใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์	29
4.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp.	30
4.1.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค	33
4.1.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp.	34
4.2 แอคติโนมัยซีท	39
4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท	39
4.3 แบคทีเรียปฏิปักษ์	53
4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	53

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 ตรวจสอบลักษณะทางจีโนมไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)	56
4.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp. และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)	56
4.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)	57
4.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น และการสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ	60
4.5.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Pseudomonas</i> spp.	60
4.5.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp.	64
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	78
เอกสารอ้างอิง	80
ภาคผนวก	85
ภาคผนวก ก	86
ภาคผนวก ข	88
ภาคผนวก ค	110
ภาคผนวก ง	111
ภาคผนวก จ	148
ประวัติผู้วิจัย	149

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 Temperature cycling ของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp.	25
3.2 Temperature cycling ของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp.	26
4.1 แสดงลักษณะสีมาตรฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 22 ไอโซเลท ด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System	51
4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ ของ <i>Pseudomonas</i> spp.	57
4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.	59
4.4 แสดงผลการทดสอบของเชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp. ด้วยวิธี T-streak	61
4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ด้วยเชื้อปฏิปักษ์โดยใช้วิธี dual culture	65
ข แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)	88
ง (1) แสดงภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Pseudomonas</i> spp. PS1 โดยเชื้อปฏิปักษ์ ด้วยวิธี T-streak	111
ง (2) แสดงภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Pseudomonas</i> spp. PS3.2 โดยเชื้อปฏิปักษ์ ด้วยวิธี T-streak	114
ง (3) แสดงภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Pseudomonas</i> spp. PS6 โดยเชื้อปฏิปักษ์ ด้วยวิธี T-streak	117
ง (4) แสดงภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Pseudomonas</i> spp. PS7 โดยเชื้อปฏิปักษ์ ด้วยวิธี T-streak	120
ง (5) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM1 ด้วยวิธี dual culture	123
ง (6) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้ง การเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM1 ด้วยวิธี dual culture	126
ง (7) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM3 ด้วยวิธี dual culture	128
ง (8) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้ง การเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM3 ด้วยวิธี dual culture	131

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง (9) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM4 ด้วยวิธี dual culture	133
ง (10) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้ง การเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM4 ด้วยวิธี dual culture	136
ง (11) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM5 ด้วยวิธี dual culture	138
ง (12) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้ง การเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM5 ด้วยวิธี dual culture	141
ง (13) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM6 ด้วยวิธี dual culture	143
ง (14) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้ง การเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. TM6 ด้วยวิธี dual culture	146

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดง <i>Trichoderma</i> sect. <i>Trichoderma</i>	7
2.2 แสดง <i>Trichoderma</i> sect. <i>Pachybasium</i>	9
2.3 แสดง <i>Trichoderma</i> sect. <i>Pachybasium</i>	9
2.4 แสดง <i>Trichoderma</i> sect. <i>Pachybasium</i>	10
2.5 แสดง <i>Trichoderma</i> sect. <i>Longibrachiatum</i>	10
3.1 แสดงรูปแบบการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยซีทในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp.	27
3.2 แสดงรูปแบบการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยซีทในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp.	28
4.1 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp. บนอาหาร King's medium B (KB)	29
4.2 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp. ไอโซเลท PS1	31
4.3 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp. ไอโซเลท PS3.2	31
4.4 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp. ไอโซเลท PS6	32
4.5 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp. ไอโซเลท PS7	32
4.6 แสดงการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp.	33
4.7 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท TM1	34
4.8 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท TM3	35
4.9 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท TM4	36
4.10 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท TM5	37
4.11 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท TM6	38
4.12 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 00431	39
4.13 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 222	39
4.14 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 431	41
4.15 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 521	41
4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 731	42
4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 1322	42
4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 1922	43
4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 1941	43
4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 2032	44

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 00722	44
4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 00723	45
4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 01730	45
4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 232	46
4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 241	46
4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 1731	47
4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 2023	47
4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 01722	48
4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 01724	48
4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 02030	49
4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 422	49
4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 2024	50
4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 2026	50
4.34 แสดงลักษณะของเชื้อ TISTR 412	53
4.35 แสดงลักษณะของเชื้อ TISTR 8411	53
4.36 แสดงลักษณะของเชื้อ TISTR 612	54
4.37 แสดงลักษณะของเชื้อ TISTR BCALg2	54
4.38 แสดงลักษณะของเชื้อ TISTR BCA002	55
4.39 แสดงลักษณะของเชื้อ TISTR p13A1	55
4.40 แสดงภาพ Gel electrophoresis ของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> spp.	56
4.41 แสดงภาพ Gel electrophoresis ของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp.	58
4.42 แสดงการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Pseudomonas</i> spp.	60
4.43 แสดงรูปผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ	64
4.44 แสดงการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp.	77
ค (1) แสดงภาพถ่ายตัวอย่างดอกเห็ดที่มีเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. และ <i>Pseudomonas</i> spp. ปนเปื้อน	110
จ (1) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อ <i>Trichoderma viride</i>	148
จ (2) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อ <i>Trichoderma longibrachaitum</i>	148

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เห็ด (Mushroom) หรือ ฟังไจ (Fungi) เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ ให้ประโยชน์ด้านอาหารและยาสมุนไพร ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับเห็ดอย่างเป็นทางการปี พ.ศ. 2479 และในปี พ.ศ. 2480 มีการนำความรู้เกี่ยวกับการเพาะเห็ดมาเผยแพร่ และในปี พ.ศ. 2481 มีการจำหน่ายเชื้อเห็ดฟาง และพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ ได้พระราชทานพระราชดำริ ให้กรมวิชาการเกษตรจัดหาอุปกรณ์และดำเนินการสาธิตฝึกอบรมการเพาะเชื้อเห็ดให้ราษฎร ปี พ.ศ. 2493 มีการจัดพิมพ์เอกสารเผยแพร่เป็นภาษาอังกฤษชื่อ “Culture of Mushroom in Thailand” ในปี พ.ศ. 2505 แผนกโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ได้มีการเริ่มทดลองเพาะเห็ดนางรมโดยอาจารย์พันธุ์ทวี ภัคดีแดนดิน โดยร่วมมือกับ ดร. บล็อก ปรากฏว่าประสบความสำเร็จและได้มีการพยายามปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมในระยะเวลาต่อมาจนประเทศไทยสามารถเพาะเห็ดนางรมได้ตลอดทั้งปี หลังจากนั้นได้ทำการอบรมเผยแพร่แก่เกษตรกร ปี พ.ศ. 2507 มีผู้นำเห็ดหูหนูจากไต้หวันมาทดลองเพาะที่จังหวัดเพชรบูรณ์และเป็นผลสำเร็จ กรมวิชาการเกษตรโดย ดร. วนิดา แจ่มศรี ได้ทำการศึกษาและทดลองจนสามารถเพาะและให้ผลผลิตเต็มที่ จึงเผยแพร่วิธีการเพาะเห็ดหูหนูแก่เกษตรกร ปี พ.ศ. 2514 บริษัทฟาร์มเอกชนที่จังหวัดลำปางได้ทดลองเพาะเห็ดแชมปิยองหรือเห็ดฝรั่งจนเป็นผลสำเร็จ 2 ปี ต่อมาอาจารย์นุชนารถ จงเลขา ได้ทำการวิจัยและเผยแพร่ผลการวิจัยสู่เกษตรกรจนเป็นที่แพร่หลายกันในเวลาต่อมา ปี พ.ศ. 2515 บริษัทสากลได้นำเห็ดเป๋าฮื้อมาทดลองเพาะเพื่อแปรรูปเป็นเห็ดกระป๋อง และในปี พ.ศ. เดียวกันนั้นได้มีการจัดตั้งชมรมเห็ดขึ้นในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.สกลนคร, 2555)

เห็ดที่พบในท้องตลาดไม่ว่าจะเป็นเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางรมฮังการี เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดยานางิ เห็ดนางรมวอล เห็ดลม เห็ดบด เห็ดกระด้าง เห็ดหัวลิง เห็ดหลินจือ เป็นต้น เห็ดที่กล่าวมาเป็นเห็ดที่เพาะอยู่ในถุงพลาสติกจึงเรียกกันสั้นๆ ว่า “เห็ดถุง” ซึ่งการเพาะเห็ดถุงมักเกิดปัญหาการปนเปื้อนก่อให้เกิดโรคและส่งผลกระทบต่อความปลอดภัย โรคของเห็ดถุงที่มักพบมีดังนี้ เชื้อราดำกลุ่ม *Aspergillus* พบว่าบางส่วนของถุงเห็ดจะมีสีเขียวเข้มเกือบดำ อาจเกิดที่ส่วนบนใกล้ปากถุงแล้วลามลงไปข้างล่างหรืออาจเกิดจากด้านล่างขึ้นไปก็ได้ บางส่วนของถุงเห็ดมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นติดกับบริเวณที่มีสีเขียวเข้ม เชื้อราดำ *Botrydipodia* ทำให้เชื้อเลื้อยในถุงเห็ดมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ในช่วงแรกเชื้อราจะมีสีขาวและขยายกว้างขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อทิ้งไว้นานจะสังเกตเห็นก้อนเล็กๆ สีดำบนผิวของถุงพลาสติก

เชื้อราในกลุ่มราเขียวลักษณะการปนเปื้อนของถุงเห็ดเนื่องมาจากราเขียว จะสังเกตเห็นได้ง่ายเนื่องจากสปอร์ของเชื้อราสีเขียวอ่อนใสเมื่อเกิดรวมกันหนาแน่นจึงทำให้เห็นเป็นหย่อมสีเขียวใน ถุงเห็ด ราสีส้ม มักเกิดเป็นกระจุกบริเวณปากถุงมีลักษณะเป็นแผลสีชมพูอมส้ม หรือเป็นก้อนติดกันสีชมพู บางถุงอาจมีราสีส้มเกิดที่ก้นถุงได้ ราเมือก พบว่าเกิดกับถุงเห็ดที่เปิดถุงเก็บดอกไปแล้วหลายรุ่น และเป็นถุงที่อยู่ด้านล่างสุดหรือมีความชื้นมาก จะสังเกตเห็นเส้นสีเหลืองชัดเจนที่บริเวณด้านข้างถุงหรือบริเวณปากถุง โรคจุดสีน้ำตาลของเห็ดเป่าฮื้อและโรคเน่าเหลืองของเห็ดสกุลนางรมเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เริ่มแรกสังเกตได้จากดอกเห็ดไม้โผล่พ้นคอขวด บางดอกสีเหลืองซีดหรือมีลักษณะมีวงอไม่สมบูรณ์ดอกไม่พัฒนา ส่วนดอกที่เจริญออกมาได้ หมวกไม่บานเต็มที่ หมวกดอกด้านบนและด้านล่างรวมทั้งก้นดอก มีจุดสีน้ำตาลอ่อนประปราย

การควบคุมโดยชีววิธี ถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย เป็นหนึ่งในวิธีการควบคุมศัตรูพืชแบบผสมผสาน ร่วมกับการควบคุมโดยวิธีกล วิธีกายภาพ การใช้สารจากธรรมชาติ และการใช้สารเคมี ปัจจุบันมีความตระหนักถึงผลกระทบทางด้านสิ่งแวดล้อมและความเสี่ยงต่อสุขภาพที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีในการเกษตร (ศิริพรรณ, 2560) ดังนั้นแนวทางการควบคุมทางชีวภาพที่พบมากที่สุดคือการเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ควบคุมทางชีวภาพ มีการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมเชื้อก่อโรคหลายเรื่องโดยมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในพื้นที่เพาะปลูก จุลินทรีย์ที่ใช้ส่วนมากได้แก่ *Trichoderma* spp., *Streptomyces* spp. และ *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อก่อโรคอย่างกว้างขวาง และในประเทศไทยได้มีการศึกษาและนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาประยุกต์ใช้

Bacillus spp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับการศึกษาเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคหลายในประเทศไทย ตัวอย่างเช่น มีการใช้ *Bacillus* spp. ยับยั้งเชื้อราเขียว *Trichoderma harzianum* มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 30.00-43.75 เปอร์เซ็นต์ (พรศิลป์ และ วุฒิชัย, 2551)

Streptomyces spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคจำนวนมากเช่น *Streptomyces philanthi* RL-1-178 สามารถยับยั้ง *Sclerotium* ได้ (Boukaew et al., 2011) นอกจากนี้ เพชรรัตน์ และ สุดารัตน์ (2552) รายงานว่า *Streptomyces*-15, *Streptomyces*-22, *Streptomyces*-84 และ *Streptomyces*-87 สามารถยับยั้ง *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* และ *Ralstonia solanacearum* โดยการทดสอบทางชีวภาพ (เพชรรัตน์ และ สุดารัตน์, 2552)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) คัดแยกเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ดและทดสอบความสามารถในการก่อโรค
- 2) ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ดที่ทำการสุ่มเก็บจากมารยาทฟาร์ม อำเภอ ธิญบุรี จังหวัดปทุมธานี ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา, จัดจำแนกลักษณะจีโนมไทป์โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA (16S rDNA gene sequence) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacers region (ITS) และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) และทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อที่คัดแยกได้ ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค สำหรับแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี T-streak และราด้วยวิธี dual culture สกัดสารสกัดจากจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในโรงเพาะเห็ด
- 2) ได้สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของเห็ด

เห็ดจัดเป็นราชั้นสูง มีวิวัฒนาการสูงสุด และวงจรชีวิตที่สลับซับซ้อนกว่าเชื้อราทั่วไป เริ่มจากสปอร์ ซึ่งเป็นอวัยวะหรือส่วนที่สร้างเซลล์ขยายพันธุ์ เมื่อตกไปในสภาพแวดล้อมเหมาะสม จะงอกเป็นกลุ่มใยรา (mycelium) เจริญเป็นกลุ่มก้อนเกิดเป็นดอกเห็ด บนพื้นดิน ต้นไม้ ขอนไม้ ซากพืช ฯลฯ เมื่อดอกเห็ดเจริญสามารถสร้างสปอร์ปลิวไปงอกเป็นใยรา และเกิดเป็นดอกเห็ดดอกใหม่ได้เรื่อยๆ นอกจากนี้เห็ดถูกจัดเป็นพืชชั้นต่ำกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากเห็ดไม่มีคลอโรฟิลล์ สังเคราะห์แสงไม่ได้ สร้างอาหารเองไม่ได้ ต้องอาศัยอาหารจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยการเป็นปรสิต (Parasite) หรือขึ้นบนรากพืชที่ตายแล้ว (Saprophyte) หรืออาศัยอาหารจากรากพืชอื่นๆ (Mycorrhiza) (พิมพ์กานต์, 2544)

เห็ดมีประโยชน์ทั้งทางด้านอาหาร ยา สภาพแวดล้อม ตลอดจนความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถแยกได้จากธรรมชาติ แม้เห็ดราบางชนิดก่อให้เกิดโทษโดยเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจ และเห็ดหลายชนิดจัดเป็นเห็ดพิษ (toadstools หรือ poisonous fungi) เห็ดเป็นทรัพยากรที่สำคัญต่อความเป็นอยู่และคุณภาพชีวิตของมนุษย์ โดยมักนำมาใช้ประโยชน์เช่น เป็นแหล่งอาหารโดยตรง, ผลิตผลของเห็ดบางชนิดนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและยารักษาโรค (สุวลักษณ์, 2544)

2.1.1 การเพาะเห็ดในประเทศไทย

การทำเชื้อเห็ดในประเทศไทย ได้พัฒนามาตั้งแต่การเริ่มต้นทำหัวเชื้อเห็ดฟางของอาจารย์กาน ชลวิจารณ์ เมื่อปี พ.ศ. 2481 จนกระทั่งปัจจุบันมีการเพาะเห็ดเพิ่มขึ้นหลายชนิด โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นวัสดุเพาะ เช่น ฟางข้าว ชี้เลื่อย ไม้ยางพารา เปลือกมันสำปะหลัง เปลือกถั่วเขียว เปลือกถั่วเหลือง ผักตบชวา ฯลฯ อย่างไรก็ตามการทำเชื้อเห็ดหรือเชื้อขยายนี้ในประเทศไทยจะอยู่ในรูปของเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวฟ่าง จึงเรียกเชื้อขยายว่า เชื้อข้าวฟ่าง ซึ่งใช้เรียกรวมแม่เชื้อของเห็ดที่เพาะในถุงพลาสติกทั้งหมด ส่วนในกรณีของเห็ดฟางจะขยายแม่เชื้อลงในปุ๋ยหมัก จึงเรียกว่า หัวเชื้อเห็ดฟาง หรือเชื้อเห็ดฟาง ประเภทของการเพาะเห็ด เห็ดที่เกษตรกรเพาะในปัจจุบันสามารถแบ่งเป็น สองประเภทใหญ่ๆ คือ ประเภทแรกคือ เห็ดถุง ได้แก่ เห็ดสกุลนางฟ้า นางรม เห็ดหูหนู เห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดลม เห็ดเป่าฮื้อ เห็ดตีนแรด และเห็ดหลินจือ เป็นต้น ประเภทที่สองคือ เห็ดกองเตี้ย หรือเห็ดฟาง เป็นเห็ดยอดนิยม และเปรียบเสมือนเห็ดที่อยู่คู่กับวิถีชีวิตของเกษตรกร ซึ่งส่วนใหญ่ทำนา และนำฟางมาเพาะเห็ดหลังเสร็จสิ้นฤดูทำนา (ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.สกลนคร, 2555)

2.2 เชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคในโรงเพาะเห็ด

2.2.1 การปนเปื้อนจากเชื้อรา

โดยปกติจะไม่สามารถบ่งบอกได้ถึงลักษณะการปนเปื้อนของเชื้อราในระยะแรก อาจสังเกตเห็นเพียงเส้นใยเชื้อเห็ดเจริญช้ากว่าปกติ หรือเจริญไม่สม่ำเสมอ แต่หลังจากนั้น 5 – 7 วัน จะปรากฏเชื้อราสีเขียวหม่น หรือสีเทาดำ เจริญร่วมกับเส้นใยเชื้อเห็ด (อภิรัชต์, 2544)

- เชื้อราดำ กลุ่มแอสเพอร์จิลลัส (*Aspergillus* spp.)

พบปนเปื้อนจากวัสดุเพาะที่ประกอบไปด้วยวุ้น และธัญพืช มักเกิดในโรงเพาะปลูกที่ใช้ชั้นวางเป็นไม้ และทำให้ลักษณะบางส่วนของถุงเห็ดหรือก้อนเชื้อเห็ดมีสีเขียวเข้มเกือบดำ หรือสีน้ำตาล เกิดติดกับบริเวณที่มีสีเขียวเข้ม อาจเกิดที่ส่วนบนใกล้ปากถุงแล้วลามลงไปข้างล่าง หรืออาจเกิดจากด้านล่างขึ้นไปก็ได้ *Aspergillus* ส่วนใหญ่มีสีเขียวคล้ายกับ *Penicillium* โดย *Aspergillus niger* มีสีดำ *A. flavus* มีสีเขียวเหลือง *A. clavatus* มีสีเขียวแถมเงิน *A. fumigatus* มีสีเขียวเทา และ *A. versicolor* มีสีที่หลากหลายตั้งแต่เขียวอมชมพูถึงเหลือง มีหลายสปีชีส์ที่ทนความร้อนและสร้างสารพิษ เช่น *A. flavus* และ *A. parasitica* สามารถสร้าง aflatoxin มักพบในข้าวกล้อง ถั่วลิสง และเมล็ดธัญพืชอื่นๆ ที่เก็บในสภาวะแวดล้อมที่ร้อนขึ้น *A. flavus* สามารถเจริญได้ในเมล็ดธัญพืชทุกชนิด และมักทำลายเชื้อเห็ด (Mwangi *et al.*, 2015)

- เชื้อราเขียวเพนิซิลเลียม (*Penicillium* spp.)

สร้างสปอร์สีเขียวแถมเงิน มักปนเปื้อนบริเวณพื้นผิวของวัสดุเพาะเลี้ยง คล้ายกับ *Aspergillus* มีรายงานเกี่ยวกับ *Penicillium* หลายชนิด ประกอบด้วย *P. citrinum*, *P. funiculosum*, *P. chrysogenum*, *P. cyclopium*, *P. palladium*, *P. digitatum* และ *P. italicum* สภาพที่เกิดการปนเปื้อนของ *Penicillium* มักจะเกิดควบคู่กับราสีดำ ที่เกิดจาก *Doratomyces* spp. มักพบในเชื้อเห็ดขยายที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบและบ่งชี้ได้ว่าฟางได้รับความร้อนไม่ทั่วถึงในช่วงแรกในการฆ่าเชื้อ *Penicillium* spp. ใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบอย่างง่าย รวมทั้งเซลลูโลส แป้ง ไขมัน และลิกนิน เชื้อราเหล่านี้พบมากและเป็นหนึ่งที่ต้องระวังในการเตรียมวัสดุเพาะเลี้ยงที่มีวุ้น และธัญพืชเป็นองค์ประกอบ (Pani, 2011)

- ราสีส้ม หรือราร้อน (*Neurospora* spp.)

ลักษณะเป็นผงสีชมพูอมส้ม หรือเป็นก้อนติดกันสีชมพู บางถุงอาจมีราสีส้มเกิดที่ก้นถุงได้ ราสีส้มมักเกิดเป็นกระจุกบริเวณปากถุง ราสีส้มทำให้เส้นใยเห็ดเจริญไม่ได้ เนื่องจากเชื้อรานี้เจริญเร็วกว่าเชื้อเห็ดเสียก่อน สปอร์ของ *Neurospora* เจริญได้ดีในที่ที่มีอุณหภูมิสูง ราสีส้มส่วนใหญ่ที่พบคือ *Neurospora sitophila* ซึ่งเป็นเชื้อปนเปื้อนที่อันตรายและกำจัดได้ยาก ควรกำจัดเชื้อให้หมดไปโดยเร็วที่สุด ถ้ายังพบมีการปนเปื้อนอยู่ควรกำจัดหัวเชื้อเห็ดทั้งหมดและเริ่มต้นเพาะใหม่

- ราเมือก (Slime Mould)

ราเมือกที่พบเข้าทำลายเห็ดที่เพาะเป็นการค้า มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มเรียกว่าพลาสโมเดียม (plasmodium) สีเหลือง ส่วนใหญ่จะมีสีเหลืองตั้งแต่เหลืองเข้ม เหลืองสด จนถึงเหลืองอ่อนเกือบขาวแผ่ขยายหรือเจริญในลักษณะคล้ายรากพืช หรือบางทีพบเป็นรูปพืด บางครั้งพบระยะที่สร้างระยะสปอร์แรงเจียม (sporangium) เป็นกลุ่มก้อนชุกชุมสปอร์ สีเทา สีน้ำตาลดำ หรือสีน้ำตาลอมม่วงเข้ม มีลักษณะคล้ายหัวไม้ขีดไฟ หรือคล้ายรูป หรือ บางชนิดเป็นกลุ่มคล้ายขนมคุกก็สีเหลือง หรือสีครีม ภายในเป็นกลุ่มของสปอร์แห้ง ราเมือกหรือ slime mold เป็นราที่จัดอยู่ใน Division myxomycota ราเมือกสามารถแพร่กระจายภายในโรงเรือนเพาะเห็ดได้โดยสปอร์แห้งจากสปอร์แรงเจียมโดยปลิวไปในอากาศ (อภิรัชต์ และคณะ, 2552) การจัดหมวดหมู่สิ่งมีชีวิตศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถมองเห็นได้จากภายนอก นักวิทยาศาสตร์จึงจัดให้ราเมือก (slime mold) เป็นรา เนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกับรา คือมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์หรือสปอร์แรงเจียม (sporangium) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายฟรุตติงบอดี้ (fruiting body) ของสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ แต่ในช่วงหนึ่งของวัฏจักรชีวิต ราเมือกมีการเคลื่อนที่และกินอาหารคล้ายอะมีบา ทำให้มีลักษณะบางประการที่คล้ายสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรโพรทิสตาด้วย (Baldauf and Doolittle, 1997) จากการที่ราเมือกมีลักษณะที่คล้ายทั้งรา และโพรทิสต์ จึงมีข้อสงสัยว่าควรจัดราเมือกอยู่ในอาณาจักรฟังไจ หรืออาณาจักรโพรทิสตา อย่างไรก็ตามในปัจจุบันจากการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตนอกจากจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว ยังใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA เพื่อหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วย พบว่าราเมือกมีสายวิวัฒนาการแยกออกมาจากสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ แต่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรโพรทิสตามากกว่า จึงจัดราเมือกให้เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในอาณาจักรโพรทิสตา ราเมือกมีมากกว่า 900 สปีชีส์ พบมากในเขตร้อนแต่ก็สามารถพบในเขตอบอุ่นด้วย สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. ราเมือกชนิดพลาสโมเดียม (plasmodial slime molds) เป็นราเมือกที่เซลล์มีหลายนิวเคลียส ในวัฏจักรชีวิตจะพบระยะพลาสโมเดียมและระยะสร้างสปอร์ เมื่อสปอร์งอกแล้ว จะกลายเป็นราเมือกเซลล์เดี่ยว (unicellular) ที่มีลักษณะคล้ายอะมีบา (amoeboid cell) ซึ่งไม่มีผนังเซลล์ สามารถเคลื่อนที่และกินอาหารโดยการล้อมจับหรือฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เช่นเดียวกับอะมีบา ในบางกรณีเซลล์ที่เกิดจากสปอร์อาจเป็นเซลล์ที่มีแฟลเจลลา (flagellated cell) ซึ่งจะเป็นเซลล์แบบไดนิวขึ้นกับความชื้นของสิ่งแวดล้อมที่ราเมือกอาศัยอยู่ ถ้าความชื้นมากจะเป็นเซลล์ที่มีแฟลเจลลาซึ่งสามารถว่ายน้ำได้ แต่ถ้าความชื้นน้อยจะเป็นเซลล์คล้ายอะมีบา เซลล์เดี่ยวเหล่านี้จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid ; n) เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมและมีอาหารจำนวนมากราเมือกก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนได้ จากนั้นจะจับคู่เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มีการปฏิสนธิได้เป็นไซโกตที่มีโครโมโซม 2 ชุด (diploid ; 2n) และแบ่งเซลล์เจริญเป็นพลาสโมเดียม ซึ่งอาจมีขนาดใหญ่มากได้ เกิดจากการที่เซลล์จำนวนมากเคลื่อนที่มารวมกลุ่มกัน จากนั้นไซโทพลาซึม

ของแต่ละเซลล์จะรวมตัวกันได้เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ 1 เซลล์ที่มีนิวเคลียสจำนวนมาก พลาสโมเดียม มักจะมีสีสดใส เช่น เหลือง ส้ม ชมพู มีลักษณะเป็นเมือก (slime) ซึ่งเป็นที่มาของชื่อราเมือก และสามารถเคลื่อนที่บนพื้นผิวของวัตถุที่พลาสโมเดียมนั้นอาศัยอยู่ได้ แต่เมื่อสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตในระยะพลาสโมเดียม เช่น ขาดความชื้นหรือขาดอาหาร ราเมือกจะเปลี่ยนไปเป็นระยะที่สร้างสปอร์ โดยสร้างสปอร์ในอับสปอร์ที่อยู่บนก้าน (stalk) สปอร์เหล่านี้จะมีผนังแข็งแรงทนต่อความแห้งแล้งได้ดี และเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมหรือได้รับความชื้นก็จะงอกและเจริญต่อไป (Anonymous, 2018)

2. ราเมือกชนิดเซลล์ลูลาร์ (cellular slime molds) เป็นราเมือกที่เซลล์มี 1 นิวเคลียส ส่วนใหญ่ของ วัฏจักรชีวิตจะดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีลักษณะคล้ายอะมีบา อยู่เป็นอิสระ แต่เมื่อสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ขาดแคลนอาหาร จะมีการปล่อยสารเคมีออกมาเป็นสัญญาณเพื่อให้เซลล์มารวมกลุ่ม เรียกว่ากลุ่มของเซลล์นี้ว่า slug ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมาเกาะกลุ่มกันเท่านั้น ส่วนของไซโทพลาซึมของแต่ละเซลล์จะไม่รวมตัวกันได้เป็นเซลล์ขนาดใหญ่เช่นเดียวกับราเมือกชนิดพลาสโมเดียม slug ที่เกิดขึ้นมีลักษณะคล้าย fruiting body ของฟังไจ จะสร้างสปอร์ผนังแข็งแรงทนต่อความแห้งแล้งได้ดี และเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมหรือได้รับความชื้นก็จะงอกและเจริญต่อไป (สุนันดา, 2557)

- เชื้อราในกลุ่มราเขียว *Trichoderma* spp.

สกุล (Genus) *Trichoderma* เป็นหนึ่งในโรคที่พบมากที่สุดและเป็นอันตรายต่อการเพาะเห็ด ซึ่งเป็นราสีเขียวในแหล่งธรรมชาติมักพบในบริเวณที่มีสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ และมักจะส่งผลกระทบต่อในการเพาะเห็ด *Trichoderma* spot, *Trichoderma* blotch, *Trichoderma* mildew, Green mould

Kligman (1950) รายงานว่าพบ *Trichoderma* ในเห็ดถั่ง *Trichoderma* ที่แตกต่างกันซึ่งมีรายงานว่าเชื้อก่อโรคในเห็ดได้แก่ *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. pseudokoningii*, *T. logibrachiatum* ทั้งหมดที่กล่าวมานั้น *T. harzianum* เป็นสาเหตุสำคัญที่สุด (Sharma. et al., 2007)

2.2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Gary and Parkash, 2015)

การจัดจำแนก *Trichoderma* อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้

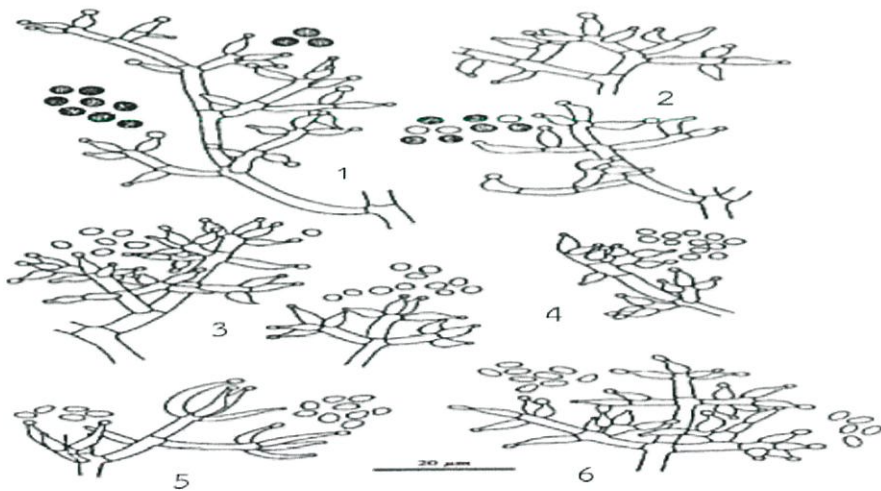
รัศมีการเจริญ (colony radius) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* sp. ส่วนใหญ่มีอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียสและส่วนใหญ่ไม่เจริญเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส การวัดอัตราการเจริญพิจารณาจากการเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้อาหาร PDA หรือ SNA มีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้าอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มในที่มืดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

โคโลนี (colony) ศึกษาจากการเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA), Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA) หรือ Corn Meal Dextrose Agar (CMD) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน มีการขยายขนาดอย่างรวดเร็ว กระจายทั่วไป โดยทั่วไปสร้างรงควัตถุสีเหลือง สีน้ำตาลเหลือง สีแดงเข้ม และสีเขียวเหลือง รงควัตถุสีเหลืองใช้ในการคัดแยกบางสปีชีส์

โคนิเดีย (conidia) ของ *Trichoderma* ส่วนใหญ่มีความยาว 2.0-3.5 ไมโครเมตร กว้าง 2.0-3.0 ไมโครเมตร ในการพิจารณาขนาดโคนิเดียควรพิจารณาอย่างน้อย 30 โคนิเดียต่อตัวอย่าง โคนิเดียเป็นเซลล์เดี่ยวและเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนกลม (globose) หรือค่อนข้างกลม (subglobose) มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง (L/W) ที่ 1.0-1.2 วงรี (ellipsoidal) หรือเป็นรูปกลมรี (oblong) มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง (L/W) ที่ 1.5 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โคนิเดียมีผนังเรียบถึงขรุขระ โดยทั่วไปมีสีเขียว เขียวเหลืองหรือไม่มีสี ความแตกต่างของสีตั้งแต่สีเขียวจนถึงสีเทา มีความสำคัญในการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา

คลาไมโดสปอร์ (chlamydospores) มีลักษณะเป็นก้อนกลมหรือค่อนข้างกลม พบกระจายทั่วไปที่บริเวณปลายเส้นใยที่แตกแขนงหรือที่ปลายกิ่งก้านที่แตกสั้นๆ ของเส้นใยเจริญ ผิวเรียบ ผนังหนา มีสีเขียวมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 20 ไมโครเมตร การศึกษาว่ามีคลาไมโดสปอร์หรือไม่มีนั้น จะพิจารณาจากการเลี้ยงบนอาหาร CMD หรือ SNA บ่มไว้ไม่เกิน 10 วัน นำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

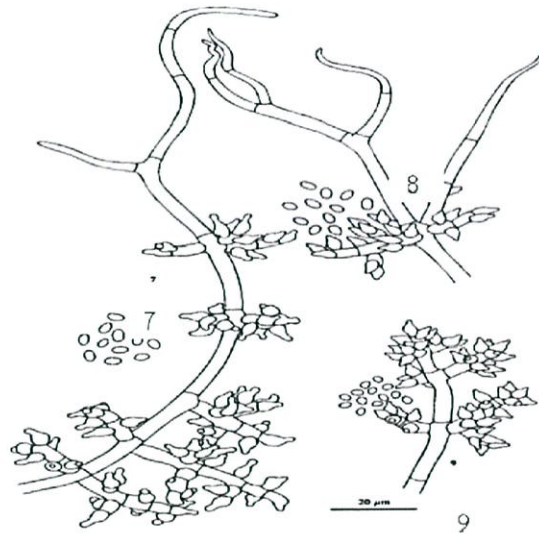
โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ที่แตกกิ่งออกจากก้านหลัก โดยที่ปลายโคนิดิโอฟอร์มีโครงสร้างกำเนิดโคนิเดียหรือสปอร์ เรียกว่า โฟอะไลด์ (phialide) โคนิเดียซึ่งเกิดจากปลายโฟอะไลด์จะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (slime head) เห็นเป็นสีเขียวหรือใส (hyaline)



รูปที่ 2.1 *Trichoderma* sect. *Trichoderma*

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *T. viride* (1), *T. atroviride* (2), *T. harzianum* (3), *T. inhamatum* (4), *T. aureoviride* (5), *T. koningii* (6)

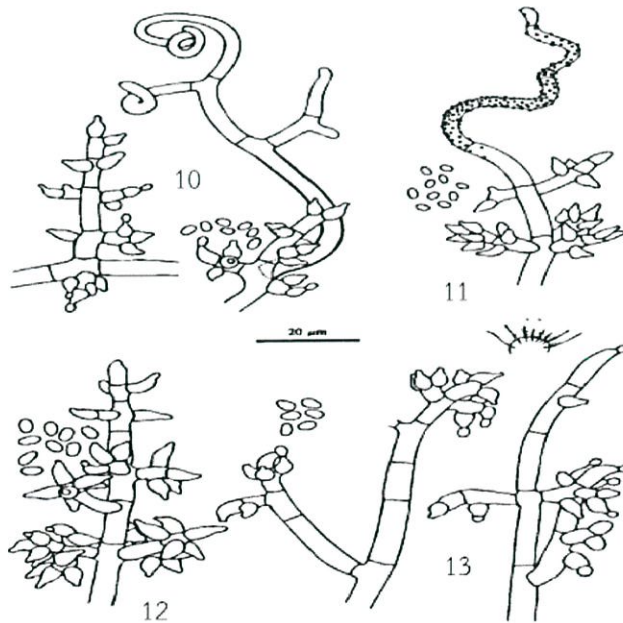
ที่มา: Gary, 1996



รูปที่ 2.2 *Trichoderma* sect. *Pachybasium*

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของเชื้อ *T. hamatum* (7) และ (8), *T. minutisporum* (9)

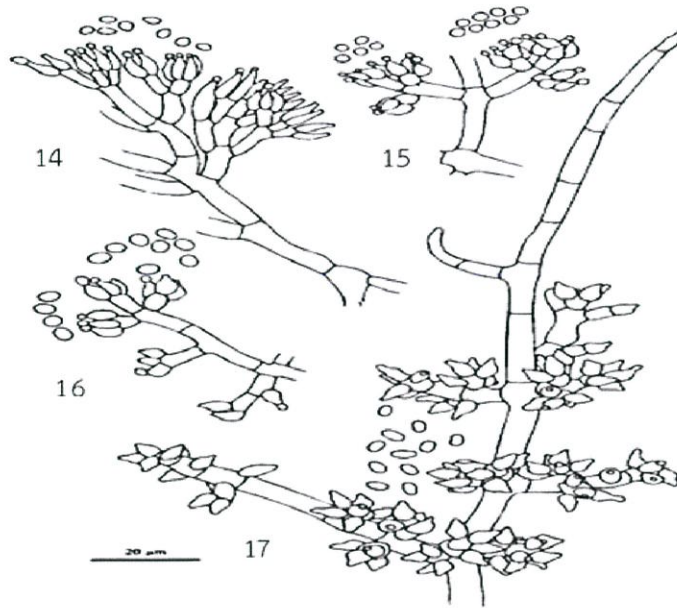
ที่มา: Gary, 1996



รูปที่ 2.3 *Trichoderma* sect. *Pachybasium*

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของเชื้อ *T. polysporum* (10) และ (11), *Hypocrea semiorbis* (12), *T. fertile* (13)

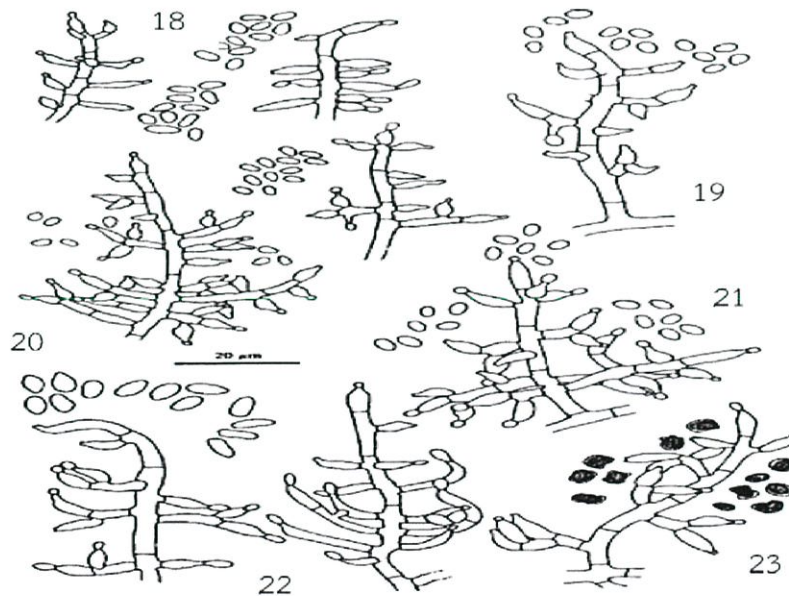
ที่มา: Gary, 1996



รูปที่ 2.4 *Trichoderma* sect. *Pachybasium*

รูปที่ 2.4 (14) แสดงลักษณะของเชื้อ *H. gelatinosa* (14), *T. piluliferum* (15), *T. virens* (16), *T. oblongisporum* (17)

ที่มา: Gary, 1996



รูปที่ 2.5 *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของเชื้อ *T. longibrachiatum* (18), *T. reesei* (19), *T. citrinoviride* (20), *T. pseudokoningii* (21), *T. parceramosum* (22), *T. saturnisporum* (23)

ที่มา: Gary, 1996

นอกจากนี้ยังพบการสร้างกลิ่น (odors) สามารถพบการสร้างกลิ่นในอาหาร การศึกษาที่ผ่านมาพบกลิ่นเดียวเท่านั้นคือกลิ่นคล้ายมะพร้าว ซึ่งเป็นกลิ่นของ 6-pentyl- α -pyrone (6-PAP) เป็นกลิ่นที่ไม่เป็นพิษ การสร้างกลิ่นนั้นพบในเฉพาะอาหาร PDA การศึกษาจนถึงปัจจุบันสายพันธุ์ที่สร้างกลิ่นมะพร้าวพบเฉพาะใน เคลด (clade) *Viride* เท่านั้น (Gary, 1996)

2.2.1.2 สาเหตุการเกิดโรค

Trichoderma หลายสายพันธุ์เกี่ยวข้องกับโรคราสีเขียวในโรงเพาะเห็ด อนุกรมวิธานของสกุลนี้ทำให้เกิดความสับสนและสับสนเนื่องจากนักราวิทยาได้มีการตรวจสอบตั้งแต่ช่วงปี 1939 A. R. Bisby ได้ทบทวนข้อมูลและได้ข้อสรุปว่าแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างและไม่สอดคล้องกัน จึงจำแนกประเภท *T. viride* ในปี 1969 Rifai ได้ทำการจัดจำแนกออกเป็น 9 สายพันธุ์ และจำแนกเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในเห็ด ได้แก่ *T. viride*, *T. harzianum*, *T. virens* และ *T. koningii*

T. viride (*T. lignorum*) พบโดยมากทั่วไปอยู่ในดิน เส้นใยมีสีเขียวเข้ม ด้านตรงข้ามไม่มีสี หรือมีสีเหลืองเล็กน้อย โคนิดิโอฟอร์มีกไม่ค่อยมีกิ่งก้าน แขนงข้างมักอยู่เดี่ยวๆ หรือมี 2-3 แขนง มีขนาดเฉลี่ย 8-14 x 2.4-3.0 ไมโครเมตร โคนิเดียเป็นรูปวงรี ผนังหยาบ (rough walled) มีสีเขียว ขนาดเฉลี่ย 4.0-4.8 x 3.5-4.0 ไมโครเมตร สร้างกลิ่นมะพร้าว เจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

T. koningii พบทั่วไปในดิน โคนิเดียมีผนังเรียบ (smooth walled) ทรงกระบอกหรือวงรี สีเขียว ขนาด 3.0-5.5 x 1.9-3.2 ไมโครเมตร ใพอะลายดิมักอยู่เป็นคูมีโคนิดิโอฟอร์ 3-5 แขนง และมีขนาดค่อนข้างกว้าง ส่วนใหญ่ขนาด 7.5-12 x 2.5-3.5 ไมโครเมตร และไม่สร้างกลิ่น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญที่ 24 องศาเซลเซียส สูงสุดที่ 33 องศาเซลเซียส

T. virens เจริญกระจายตัวได้ทั่วงานเพาะเชื้อ สร้างสีเข้มบริเวณใกล้ขอบงานเพาะเชื้อ และเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มอย่างรวดเร็ว ด้านตรงข้ามไม่มีสี หรือมีสีเหลือง ไม่สร้างกลิ่น โคนิดิโอฟอร์จะเริ่มมีการแบ่งตัวเมื่อมีความยาวเป็นครึ่งหนึ่งของแขนงข้าง มี 3-6 แขนง และความยาวไม่สม่ำเสมอ ใพอะลายดี มีขนาดเฉลี่ย 3.5-6.0 x 2.8-4.1 ไมโครเมตร ผนังเรียบ สีเขียวเข้ม

T. harzianum พบทั่วไปในดิน มีเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญ 7-9 เซนติเมตร หลังจากผ่านไป 3-4 วัน เส้นใยเกาะกันเป็นก้อน, เส้นใยอากาศสีขาว-สีเทา บนอาหาร MEA ช่วงแรกจะเจริญเป็นสีเขียวขาวและต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ด้านตรงข้ามมีสีเหลืองหรือน้ำตาลอมเหลือง พบคลาไมโดสปอร์ค่อนข้างมาก แยกเป็นเดี่ยวๆ ผนังเรียบ โคนิดิโอฟอร์มีก้านสูง สปอร์ผนังเรียบ โคนิเดียรูปไข่ สีเขียว ขนาด 2.7-3.5 x 2.1-2.6 ไมโครเมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส สูงสุดที่ 36 องศาเซลเซียส

2.2.1.3 ระบาดวิทยา

ราเขียวมักจะพบในแหล่งที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตสูงและไนโตรเจนต่ำ ในการพาสเจอไรซ์ถั่วเหลืองที่ใช้เพาะเลี้ยงมีน้ำหนักรวมเกินไปหรือสูงเกินไปจะทำให้ความร้อนไม่ทั่วถึง แต่ถ้าใช้ถั่วที่สั้นเกินไปจะทำให้มีความชื้นสูงและถ้าหากมีการใช้ฟอร์มาลินบ่อยจะช่วยส่งเสริมการเจริญของราเขียว แหล่งที่มาหลักๆ ของ *Trichoderma* spp. มักจะมาจากฝุ่นละออง, การปนเปื้อนจากเสื้อผ้าที่สวมใส่ สัตว์พาหะโดยเฉพาะอย่างยิ่งไร *Pygmephorus mesembrinae* หนูแมลงวันและแมลงหวี่ การติดเชื้อทางอากาศ ไข่ที่ติดเชื้อ การปนเปื้อนจากอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในโรงเพาะเห็ด ในกรณีที่ความเข้มข้นของสปอร์ มีความเข้มข้นน้อยกว่า 1×10^2 จะไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ คลาമായโดสปอร์ที่สร้างโดย *T. harzianum*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* และ *T. pseudokoningii* สามารถมีชีวิตรอดได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง *T. harzianum* ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมากกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Seaby, 1996)

2.2.2 การปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย

ลักษณะการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียจะแสดงออกให้เห็นช้า โดยระยะแรกเชื้อเห็ดจะเจริญเป็นปกติ จนกระทั่งกลุ่มเชื้อเห็ดแสดงอาการเป็นวงเกิดขึ้น เส้นใยเจริญช้าลงและเริ่มมีน้ำเยิ้มและกลิ่นเหม็น (อภिरชต์, 2544) โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย (Bacterial Diseases) มักก่อให้เกิดโรค Bacterial blotch เช่น brown blotch และ bacterial spot ซึ่งเป็นโรคระบาดที่สำคัญชนิดหนึ่งในโรงเพาะเห็ด มีการรายงานโรคนี้อีกครั้งโดย Tolaas (1995) ชาวอเมริกันกล่าวว่าจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุในการก่อโรคนี้อยู่ในสายพันธุ์ fluorescent *Pseudomonas* ต่อมา Pain (1919) ชาวอินเดียคัดแยก *Pseudomonas tolaasii* ออกจาก fluorescent *Pseudomonas* โดยพบว่ามีความแตกต่างกันในเรื่องของการใช้ในเตรทและแบ่ง มีรายงานครั้งแรกในปี 1976 และต่อมาเริ่มมีการรายงานการระบาดของโรคในโรงเพาะเห็ดนี้เกือบทั่วโลกว่า Bacterial blotch ทำให้ปริมาณของผลผลิตลดลงเนื่องจากทำให้เกิดรอยแผลบนผิวของหมวกเห็ดและทำให้ดอกเห็ดไม่สมบูรณ์ (Sharma et al., 2007)

2.2.2.1 แบคทีเรีย *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas เป็นสมาชิกในแฟมิลี *Pseudomonadaceae* เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากในดิน น้ำทะเล และแหล่งน้ำ มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) จัดอยู่ในแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเกิดการ oxidase และ catalase โดยทั่วไปมีการเจริญแบบใช้อากาศแต่มีบางสปีชีส์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศถ้ามีเกลือเช่น ไนเตรท สามารถสร้างสารสี เขียว น้ำตาล แดง หรือเหลืองลงในอาหาร และทำให้อาหารเปลี่ยนสี ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำและสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบ *Pseudomonas* มีผลกระทบอย่างกว้างขวางต่อ ระบบนิเวศน์ การเกษตรกรรม และในเชิงพาณิชย์ เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเปื่อย มีหลายสปีชีส์ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและก่อโรคในพืช

บางสปีชีส์ผลิตสารปฏิชีวนะในรูปของ pseudomycins ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อรา (Kathleen and Barry, 2007)

Pseudomonas tolaasii ส่งผลให้เกิดโรค brown blotch จากการสังเคราะห์สารพิษ tolaasin ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดอาการของโรค tolaasin ทำให้เกิดการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ในช่วงการสร้างช่องส่งผ่านไอออนของเซลล์ชนิดต่างๆ *P. tolaasii* มีความสามารถเกาะติดกับเส้นใยซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดโรค brown blotch แบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในโรงเพาะเห็ดนอกจาก *P. tolaasii* ได้แก่ *P. agarici*, *P. aeruginosa* และ *Buhtgladioli* pv. *agaricola* อย่างไรก็ตาม *P. gingeri* ถือเป็นส่วนหนึ่งของ *P. tolaasii*

เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล (genus) *Pseudomonas* และสร้างสารเรืองแสงบนอาหาร King's medium B (KB) จัดเป็นกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* มีหลายชนิด (species) เช่น *P. syringae*, *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. fluorescence*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. agarici*, *P. tolaasii*, *P. Asplenii* โดย *Pseudomonas syringae* pathovars เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีรายงานความหลากหลายมากกว่า 50 pathovars (Goszczyńska et al., 2006)

2.2.2.2 ระบาดวิทยา

สาเหตุที่เป็นปัจจัยพื้นฐานในการระบาดเนื่องมาจากฝุ่นละอองในอากาศที่มีเชื้อพลัดเข้ามาในโรงเพาะเห็ด แม้ว่าจะมีการพลาสเจอไรท์แล้ว ก็ยังพบแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคนี้อยู่ การก่อให้เกิดโรคนั้นเกิดจากการที่มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นที่หมวกเห็ด ก้านเห็ด หรือเกิดทั้งสองบริเวณ โดยจะเกิดขึ้นที่ผิวของเห็ดในสภาวะที่มีความชื้นมากกว่า 3 ชั่วโมง เมื่อมีการระบาดเกิดขึ้นสิ่งที่ตามมาคือ จะแพร่ไปยัง คนทำงาน อุปกรณ์เครื่องใช้ วัสดุเห็ด สปอร์ของเห็ด เศษซาก เป็นต้น แมลงและหนูก็เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญในการแพร่เชื้อในระบบน้ำที่ใช้เพาะปลูก (Sharma et al., 2007)

2.3 การควบคุมโรคโดยชีววิธี

การควบคุมโรคด้วยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในดิน น้ำ อากาศ ระบบนิเวศน์ มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเกษตรกร ลดปัญหาการดื้อต่อสารเคมีของเชื้อสาเหตุโรค และเป็นการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสภาพธรรมชาติมาเพิ่มปริมาณและใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรค (antagonistic micro-organism) อาทิ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *Bacillus* และ *Pseudomonas* (ดาราวัตติ์, 2558)

2.3.1 เชื้อ *Bacillus* spp.

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้าง endospore มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) เคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ทั้งที่มีอากาศ (aerobic) และ facultative anaerobe มักพบทั่วไปในดิน และมีสรรพวิทยาที่หลากหลายซึ่งช่วยให้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายและ

สามารถแข่งขันกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ภายในสิ่งแวดล้อมเนื่องมาจากสามารถสร้างสปอร์ที่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้

Bacillus หลายสายพันธุ์ มีความสำคัญในการสร้างสารปฏิชีวนะ มีการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์หลากหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้รับการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมทางการแพทย์และเกษตรกรรม มีความสามารถในการควบคุมโรคต่างๆ ใน สัตว์ มนุษย์ และพืช ในด้านการควบคุมทางชีวภาพเนื่องจาก *Bacillus* มีโครงสร้างของโปรตีนที่ละลายได้และสารปฏิชีวนะเหล่านี้มีราคาไม่แพงและมีประสิทธิภาพในการศึกษาที่สำเร็จจนถึงปัจจุบันจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นที่พึงปรารถนาสำหรับการผลิตเชิงพาณิชย์ (Mansour *et al.*, 2014) ในปีค.ศ. 1946 ได้แยกสายพันธุ์ *B. brevis* var G.B. ที่ผลิต gramicidin C จากดินใกล้มอสโก *B. licheniformis* ผลิต bacitracin (Mannanov and Sattarova, 2001) มีรายงานว่า *B. subtilis* ผลิต ribosomal antibiotic 3 ชนิด ได้แก่ *TasA*, subtilosin และ sublancin ผลิต nonribosomal antibiotic 4 ชนิด ได้แก่ bacitracin, bacilysin, plipastatin และ surfactin (Shigeo. *et al.*, 2015)

2.3.2 แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทจัดอยู่ในพวกแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนใหญ่จะมีการเจริญแบบใช้อากาศ (aerobic) เชื้อในกลุ่มนี้มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศโดยเกิดจากการแตกหักของเส้นใย (fragmentation) หรือการสร้างสปอร์เส้นใยชูบนอากาศ (aerial mycelium) สปอร์ที่สร้างขึ้นมีทั้งลักษณะสปอร์ที่มีงู้งุ้มและไม่มีงู้งุ้มซึ่งเกิดบริเวณปลายเส้นใย (conidia) อาจพบเป็นเม็ดเดี่ยวๆ หรือเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาว และแบบที่สร้างสปอร์อยู่ในอับสปอร์ (sporangium) ในระบบนิเวศนั้นจะมีบทบาทหน้าที่ในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารอินทรีย์ เช่น แป้ง, เซลลูโลส, เคอราติน และไคติน อีกทั้งยังมีความสำคัญในเชิงพาณิชย์เป็นอย่างมาก โดยมีกลุ่มเน้นไปที่ *Streptomyces* และ *Micromonospora* (Atac, 2009) แอคติโนมัยซีทเมื่อเจริญบนอาหารแข็งสามารถสร้างเส้นใยเจริญลงไปใต้ผิวหน้าอาหาร (substrate mycelium) โดยเกิดขึ้นในการเจริญระยะแรก ซึ่งโคโลนีมีผิวเรียบและต่อมาสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ทำให้โคโลนีที่เกิดขึ้นนั้นมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนคล้ายกำมะหยี่หรือเป็นผงฝุ่นคล้ายแป้ง สีของโคโลนีนั้นจะขึ้นอยู่กับสีของสปอร์ที่เกิดขึ้นเช่น ขาว เทา เหลือง ส้ม เขียว แดง ม่วง ส่วนเส้นใยที่เจริญภายใต้ผิวหน้าอาหารมักมีสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ แต่อาจพบว่ามีสีเหมือนกับสปอร์ (ลักษมี, 2556)

ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology กล่าวว่า สกุล *Streptomyces* ในแฟมิลี *Streptomycetaceae* มีมากถึง 600 สปีชีส์ ซึ่งมีจำนวนมากที่สุดในโดเมนแบคทีเรีย จีนัสของ *Streptomyces* มักจะประกอบไปด้วยองค์ประกอบของสารเคมีใหม่ๆทางการแพทย์ รวมไปถึงสารปฏิชีวนะ (Yan-Yan, 2014)

2.3.2.1 ความสามารถและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทาง

ชีวภาพของแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญ ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา รวมถึงยาด้านไวรัส ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถผลิตสารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารกดภูมิคุ้มกัน สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยแอกติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* หลายชนิด ได้แก่ ampicillin และ penicillin-N ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ *S. clavuligerus* สามารถผลิต clavams มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคตาเมสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย staphylococci และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน streptomycin ที่ผลิตโดย *S. griseus* และ neomycin ที่ผลิตโดย *S. fradiae* ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิดเชื้อแอกติโนมัยซีทสามารถเจริญและสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน จากรายงานพบว่าแหล่งของสารอาหารที่เป็นที่นิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส แป้ง กลีเซอรอล, แหล่งไนโตรเจน เช่น แอสพาราจิน ถั่วเหลือง yeast extract เปปโติน แหล่งของแร่ธาตุอื่นๆ เช่น โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคาร์บอเนต แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นต้น (ลักขมี, 2556)

2.3.2.1 การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีท

เชื้อแอกติโนมัยซีทถูกจัดจำแนกออกเป็นกลุ่มโดย Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams, 1989) ซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ โดยแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มดังนี้

- *Micrococcus, Microbacterium* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อแอกติโนมัยซีทกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างสปอร์ในรูปกลมหรือรูปแท่งได้ เป็นพวก aerobic สามารถใช้ลักษณะของ DAP บนผนังเซลล์ในการจัดจำแนกได้ เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 8 สกุล ได้แก่ *Arthobacter, Promicromonospora, Oerskovia, Dermatophilus, Aureobacterium, Curtobacterium, Argomyces* และ *Nocardoides*

- *Mycobacterium, Norcadia* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 8 สกุลคือ *Mycobacterium, Norcadia, Gordona, Dielzia, Rhodococcus, Tsukamurella* และ *Turicella* เชื้อกลุ่มนี้มีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อนและลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้พบ meso-A₂pm บน peptidoglycan พบ mycolic acid และ arabigalactan ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มนี้ได้

- แฟมิลี *Pseudonocardia* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 6 สกุล คือ *Saccharomonospora, Kibdelosporangium, Pseudonocardia, Saccharopolyspora, Amycolatopsis* และ *Actinopolyspora* เชื้อกลุ่มนี้มี

DAP บนผนังเซลล์เป็นแบบ meso-A₂pm มีน้ำตาลเซลล์เป็นอะราบิโนสและกาแลคโทส การจัดกลุ่มเชื้อโดยใช้ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA

- แฟมิลี *Micromonosporaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มี 3 สกุล คือ *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* และ *Pilimelia* ลักษณะสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ สามารถสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ โดยสปอร์จะอยู่ภายใน sporangium หรือ spore vesicle ที่พบในเส้นใยอาหาร

- แฟมิลี *Thermomonosporaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 สกุล คือ *Thermomonospora*, *Actinomadura*, *Spirillospora* และ *Actinocorallia* ผนังเซลล์ของสกุล *Thermomonospora* พบกรดอะมิโนแบบ meso-A₂pm เป็นพวกชอบร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 45-55 องศาเซลเซียส

- แฟมิลี *Streptosporangiaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 6 สกุล คือ *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Herbidispora* และมี *Streptosporangium* เป็นสกุลหลัก ลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกคือลักษณะการสร้างหรือไม่สร้าง sporangia รวมถึงจำนวนสปอร์ที่พบบน sporophore และ sporangia

- แฟมิลี *Streptomycetaceae*

แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Kineosporia* และ *Sporichthya* เส้นใยเป็นแบบมีผนังกัน มีการสร้างเส้นใยอากาศ เมื่อเจริญเต็มที่ จะสร้างสปอร์เป็นลูกโซ่ มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป ผิวโคโลนีจะมีลักษณะย่นๆเมื่อมีอายุมากขึ้น ที่ผิวหน้าของเส้นใยจะมีลักษณะเป็นฝุ่นผง เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์เป็นแบบ LL-DAP

- กลุ่มอื่น ๆ

แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 สกุล ได้แก่ *Glycomyces*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatosporia* และ *Saccharothrix* เป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอกติโนมัยซีทกลุ่มอื่นไม่ได้

2.3.3 Thermophilic และ Thermotolerant actinobacteria

thermophilic actinomycete สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส เนื่องจากแอกติโนมัยซีทมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งในกระบวนการทางชีววิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ หรือในการผลิตเอนไซม์และยาปฏิชีวนะ thermophilic actinomycete มักพบอยู่ในสกุล *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermobifida* และ *Streptomyces* (Atac, 2009) ถึงแม้ว่าที่อยู่อาศัยที่มีอุณหภูมิสูงจะไม่พบแพร่หลายมากนัก เนื่องจากบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงพบไม่มากทั้งที่เกิดตามธรรมชาติและมนุษย์สร้างขึ้น รวมไปถึงภูเขาไฟและความร้อนใต้พิภพ แหล่งที่พบ thermophilic actinomycete ได้แก่

ดินทะเลทราย (desert soil), น้ำพุร้อน (hot springs), ภูเขาไฟระเบิด (volcanic eruptions) และของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมที่มีความร้อน (thermal industrial waste)

- ดินทะเลทราย (desert soil)

ทะเลทรายเป็นแหล่งที่ดูเหมือนจะไม่มีชีวิตชีวาเนื่องจากการขาดความชุ่มชื้น แต่ปรากฏว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่อาศัยอยู่ โดยเนื่องจากความเครียดช่วยให้รูปแบบที่ทนต่อการเจริญเติบโต จุลินทรีย์ไม่เพียง แต่จะมีอิทธิพลต่อที่อยู่อาศัยดังกล่าวเท่านั้น แต่ยังเติบโตได้เพียงพอที่จะแสดงลักษณะพิเศษที่สามารถมองเห็นได้จากที่อยู่อาศัย

- น้ำพุร้อน (hot springs)

ในฤดูใบไม้ผลิน้ำพุร้อนเกิดจากการเกิดน้ำใต้ดินที่ร้อนขึ้นจากเปลือกโลก มีน้ำพุร้อนใต้พิภพอยู่ในหลายพื้นที่ทั่วเปลือกโลก น้ำที่ไหลออกจากน้ำพุร้อนถูกทำให้ร้อนด้วยความร้อนใต้พิภพนั้นคือความร้อนจากที่ปกคลุมโลก โดยทั่วไปอุณหภูมิของหินในดินจะเพิ่มขึ้นตามความลึก อัตราการเพิ่มอุณหภูมิด้วยความลึกเรียกว่าการไล่ระดับความร้อนใต้พิภพ ถ้าน้ำซึมลงไปใเปลือกโลกลึกก็จะร้อนขึ้นเมื่อสัมผัสกับหินร้อน

- เปลือกภูเขาไฟ (volcanic crusts)

ภูเขาไฟเป็นรอยแตกบนเปลือกโลกของ ซึ่งจะช่วยให้อาวุธร้อนขึ้นใต้ภูเขาไฟและก๊าซ จะออกจากแมกมาใต้พื้นผิว เปลือกที่เกิดจากการปะทุของภูเขาไฟเป็นส่วนหนึ่งของโลกที่ร้อนและเป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูงที่จะเกิดขึ้น

- ของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมที่มีความร้อน (thermal industrial waste)

ในบางอุตสาหกรรมทิ้งของเสียพร้อมกับน้ำร้อนมาก ๆ กากตะกอนน้ำร้อนของอุตสาหกรรมนี้อาจมีความสำคัญอย่างมากในการหาแอกติโนมัยซีทที่ทนร้อน แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์ที่เป็นรูปธรรมในการศึกษาเกี่ยวกับขยะอุตสาหกรรมดังกล่าวสำหรับการแยกแอกติโนมัยซีท คาดว่าในอนาคตจะสามารถแยกแอกติโนมัยซีทจากแหล่งนี้ได้ (Aditi, 2016)

2.3.4 สารสกัดจากแอกติโนมัยซีทในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด

เชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในทางเกษตรกรรมผลิตมาจาก *Streptomyces* spp. ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ได้นั้นก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อสภาวะแวดล้อมน้อยและมีความเป็นพิษต่อพืชต่ำ (Tanaka and Omura, 1993)

Nurettin (2004) ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อ *Streptomyces* ในการยับยั้งโรค bacterial blotch ที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas tolaasii* พบว่ามี 3 สายพันธุ์ที่มีบริเวณการยับยั้งมากกว่า 20 มิลลิเมตร คือ *S. rochei*, *S. lydicus* และ *S. antibioticus*

Ljiljana et. al. (2018) ศึกษาผลของ *Streptomyces flavovirens* ในการยับยั้งราเขียวในเห็ดกระดุม โดยคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากเห็ดในระยะของการเจริญที่แตกต่างกัน ในการทดสอบ

ความสามารถในการยับยั้งโดยเชื้อ *Streptomyces flavovirens* เทียบกับ fungicide prochloraz-Mn พบว่าความสามารถยับยั้ง *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. atroviride* และ *T. aggressivum* f. *europaeum* แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ นำสารสกัดที่ได้จาก *Streptomyces flavovirens* ทดสอบผลข้างเคียงต่อเห็ดที่ในห้องปฏิบัติการ พบว่าไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเห็ด และสามารถเพิ่มผลผลิตของเห็ดกระดุมได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 3.1.2 ท่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.1.3 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
- 3.1.4 Cork borer
- 3.1.5 แห้งแก้วคนสาร
- 3.1.6 หลอดทดลอง
- 3.1.7 Centrifuge tube
- 3.1.8 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.1.9 สไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 3.1.10 กระบอกลอย (Cylinder)
- 3.1.11 ขวดดูแรน (Schott Duran)
- 3.1.12 ปิเปต (Pipette)
- 3.1.13 Autopipette
- 3.1.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.15 ลูกยาง (Pipette bulb)
- 3.1.16 ครอบเปเปอร์ (Dropper)
- 3.1.17 ขวดรูปชมพู
- 3.1.18 Forceps
- 3.1.19 Microcentrifuge tube
- 3.1.20 Pipette Tips
- 3.1.21 ไม้พันสำลี
- 3.1.22 ผ้าก๊อซ
- 3.1.23 ฟลากลัส (flask)
- 3.1.24 กรวยแยก (Separatory funnel)
- 3.1.25 กระจาดกรอง glass micro filter
- 3.1.26 ขวด Vial

3.2 เครื่องมือ

3.2.1	ตู้ป่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)	IKA, USA
3.2.2	เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	HORIBA, Japan
3.2.3	กล้องจุลทรรศน์	OLYMPUS, Japan
3.2.4	หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	TOMY, USA
3.2.5	ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)	BossTech, Australia
3.2.6	ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Genlab oven, UK
3.2.7	เครื่องชั่งน้ำหนัก	METTLER TOLEDO, Switzerland
3.2.8	เครื่องผสมสาร (Vortex)	IKA, USA
3.2.9	เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	ROTINA, UK
3.2.10	เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)	IKA, USA
3.2.11	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrometer)	Eppendorf, Germany
3.2.12	อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	
3.2.13	ตู้ Growth chamber	POL-EKO, Poland
3.2.14	Thermal cycle	BIO-RAD, USA
3.2.15	Block heater	Stuart, UK

3.3 สารเคมี

3.3.1	Potato Dextrose Broth	Bacto, French
3.3.2	Corn Meal Agar	Himedia, India
3.3.3	Tryptic soy broth	Bacto, French
3.3.4	Malt Extract	Bacto, French
3.3.5	Yeast Extract	Himedia, India
3.3.6	Peptone	Himedia, India
3.3.7	Beef Extract	Himedia, India
3.3.8	Casein Enzyme Hydrolysate Type II	Himedia, India
3.3.9	Sodium hydroxide (NaOH) MW 40.0 g/mol	Merck, Germany
3.3.10	Sodium chloride (NaCl) MW 58.44 g/mol	DEAJUNG, Korea

3.3.11	Calcium carbonate (CaCO ₃) MW 100.19 g/mol	M&B, England
3.3.12	Magnesium sulfate (MgSO ₄ • 7H ₂ O) MW 246.48 g/mol	Fisher, England
3.3.13	di-Potassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄) MW 174.18 g/mol	Riedel-de Haën
3.3.14	Glycerol	Univar, New Zealand
3.3.15	Ethyl acetate	RCI Labscan, Thailand
3.3.16	Methanol	RCI Labscan, Thailand
3.3.17	Chloroform	RCI Labscan, Thailand
3.3.18	D(+) – Glucose anhydrous	
3.3.19	Crystal violet	
3.3.20	Safranin	
3.3.21	Gram Iodine	
3.3.22	Decolorize	
3.3.23	แอลกอฮอล์ 70% และ 95%	
3.3.24	วุ้น (Agar)	

3.4 เชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จำนวน 6 ไอโซเลทคือ TISTR 412, TISTR 8411, TISTR 612, TISTR BCALg2, TISTR BCA002 และ TISTR p13A1 และ เชื้อแอกติโนมัยซีทจากภัทรารักษ์ และคณะ, 2560 จำนวน 22 ไอโซเลทคือ BKH 00431, BKH 00722, BKH 00723, BKH 01722, BKH 01724, BKH 01730, BKH 02030, BKH 222, BKH 232, BKH 241, BKH 422, BKH 431, BKH 521, BKH 731, BKH 1322, BKH 1731, BKH 1922, BKH 1941, BKH 2023, BKH 2024, BKH 2026 และ BKH 2032

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อจากก้อนเห็ด (ภาคผนวก ค)

สุ่มเก็บตัวอย่างเห็ดจากมารยาทฟาร์ม อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี และคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยวิธีของ วิยะดา และเพชรรัตน์ (2552) ตัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างเห็ดที่แสดงอาการจุดดำเมื่อกินน้ำตาล วางบนอาหาร Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) agar medium บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ในอาหาร selective medium (King's B medium) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

สำหรับเชื้อ *Tricoderma* spp. คัดแยกโดยวิธีของ Shaiesta *et al.* (2011) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อตะแหราเขียวจากก้อนเห็ดปนเปื้อนราเขียว ลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ บนที่กผล โดยเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ร่วมกับสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อจากโรงเพาะเห็ด (Mohamed, 2012)

นำเชื้อที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหารเหลว TTC broth medium เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการเจือจางโดยการทำให้ serial dilution จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหาร TTC agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาคำนวณ Colony Forming Unit (CFU) ด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$CFU/ml = \frac{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ย} \times \text{dilution factor}}{\text{ปริมาตรของเชื้อ}}$$

ทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนดอกเห็ด โดยนำตัวอย่างที่วัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 มาปลูกเชื้อบนดอกเห็ดโคนญี่ปุ่น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ บ่มในตู้ เป็นเวลา 3 วัน และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของดอกเห็ด

3.5.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Pseudomonas* spp. (Kathleen and Barry, 2007)

เตรียมสไลด์โดยใช้ห้วงเขี่ยเชื้อตะแหราหยดน้ำหยดลงบนสไลด์ เขี่ยเชื้อมา smear ตรึงเซลล์ด้วยความร้อน ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย Gram stain kit (หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกโดยการล้างน้ำผ่าน หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear และทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างสารละลายไอโอดีนด้วยน้ำ แล้วชะด้วย decolorize 5-10 วินาที ล้างออกด้วย

น้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบา ๆ หยดสี safranin o ให้ท่วมรอย smear ที่งัวนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ) แล้วซับด้วยกระดาษซับ ตั้งทิ้งให้แห้งปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Trichoderma* spp. (Ahsanur et al., 2009)

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใย สี และการสร้างเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้สังเกตลักษณะ รูปร่างขนาดของโคนิเดีย โคนิดีโอฟอร์ และ คลามายโดสปอร์ โดยการเตรียมสไลด์โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อและหยดน้ำหยดลงบนสไลด์ เขี่ยเชื้อมา smear ตรึงเซลล์ด้วยความร้อน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์

3.6 แอคติโนมัยซีท

3.6.1 การเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยการเตรียม spore suspension (Klanbut, 2013)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร ISP2 ที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญเต็มที่ มีการสร้างสปอร์ จากนั้นใช้ ไม้พันสำลี ที่ปราศจากเชื้อขูดสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่ว ทำผสมให้เข้ากัน เพื่อทำให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านผ้าก๊อซหรือสำลีที่ปราศจากเชื้อเพื่อกำจัดอาหารที่อาจติดมากับสปอร์ นำส่วนที่กรองได้ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส (supernatant) ที่ทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อย เพื่อทำการกระจายตัวสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ในหยดน้ำภายในหลอด resuspension ด้วยกลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็น stock culture

3.6.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท (คณิงกานต์, 2559)

วางทิวหรือกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ก้นของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ วางแท่งแก้วรูปตัววี หรือ ไม้พันสำลี ที่ฆ่าเชื้อแล้วบนกระดาษซับ วางสไลด์และแผ่นปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วบน ไม้พันสำลี และปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เตรียมอาหาร YEME agar plate ให้มีความหนาของวุ้น 2-3 มิลลิเมตร ทำการตัดวุ้นด้วยใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ขนาดกว้างและยาวด้านละ 1 เซนติเมตร สำหรับการเตรียมเพาะเชื้อ

การ inoculate เชื้อ ใช้ใบมีดตัดชิ้นวุ้นที่เตรียมไว้ ย้ายไปวางบนสไลด์ นำ needle เขี่ยเชื้อตัวอย่างไป inoculate ที่ด้านข้างของวุ้นในแต่ละข้างจนครบสี่ด้าน คีบกระจกปิดสไลด์ปิดทางด้านบนของก้อนวุ้น เติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ให้กระดาษซับมีความชื้นทั่วแผ่น (5 มิลลิลิตร) ใช้แผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) พันรอบจานเพาะเชื้อเพื่อป้องกันน้ำระเหยออก นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ

45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดการสร้างสปอร์ (1-2 สัปดาห์) นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

การ mount สไลด์ ทำหลังจากเชื้อมีการสร้างสปอร์แล้ว ใช้คีมคีบแผ่นกระจกปิดสไลด์มาวางหงายบนกระดาษซับ ใช้ needle เขี่ยชิ้นวุ้นออกจากสไลด์ ทำให้ได้แผ่นกระจกปิดสไลด์และสไลด์ที่มีส่วนของเชื้อเจริญติดอยู่ หยดแอลกอฮอล์ 95% ลงบนแผ่นสไลด์สไลด์และกระจกปิดสไลด์ ให้ท่วมบริเวณรอยที่มีเชื้อเบาๆ จะได้เชื้อที่เกาะติดแน่นกับแผ่นสไลด์ไม่เกิดฟองอากาศเมื่อนำไป mount เชื้อเชื้อจากด้านข้างของวุ้นลงบนแผ่นสไลด์แผ่นที่ 3 หยดสี Lactophenol cotton blue (LPC) หรือ Methylene blue ลงบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด slide culture แผ่นที่ 1 นำกระจกปิดสไลด์ที่มีเชื้อมาวาง แผ่นที่ 2 และ 3 หยดสีลง 1-2 หยดบนสไลด์ที่มีเชื้อจากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่สะอาด นำสไลด์ทั้งสามตรวจดูรูปร่างและลักษณะที่สำคัญของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในการทำสไลด์ถาวรใช้กระดาษทิชชูชุบสีที่ล้นออกทิ้งไว้ข้ามคืนจนกระทั่งแห้งสนิท ทาทับบอบแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาเคลือบเล็บแบบใสทั้งสองด้าน เพื่อป้องกันการระเหยของสีย้อมเพื่อให้เก็บสไลด์ได้นาน

3.6.3 การเทียบสีมาตรฐานตามระบบ NBs/IBCC color system (Mundie, 1995)

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน มาเปรียบเทียบกับเส้นใยอากาศเส้นใยอาหาร และสีรงควัตถุที่ละลายน้ำ โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐานตามระบบ NBs/IBCC color system (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้ในจัดจำแนกกลุ่มสีของแอกติโนมัยซีท

3.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Kathleen and Barry, 2007)

เตรียมสไลด์โดยใช้ห้วงเชื้อและหยดน้ำหยดลงบนสไลด์ เชื้อเชื้อมา smear ตรงเซลล์ด้วยความร้อน ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย Gram stain kit (หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอย smear ที่ไว้นาน 1 นาที ล้างออกโดยการล้างน้ำผ่าน หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear และที่ไว้นาน 1 นาที ล้างสารละลายไอโอดีนด้วยน้ำ แล้วชะด้วย decolorize 5-10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบา ๆ หยดสี safranin o ให้ท่วมรอย smear ที่ไว้นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ) แล้วซับด้วยกระดาษซับ ตั้งทิ้งให้แห้งปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.8 ตรวจสอบลักษณะทางจีโนมไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) (Van Der Meer *et al.*, 1998)

3.8.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas* spp. และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

เลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* บนอาหาร Nutrient Agar (NA) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำแบคทีเรีย PS1, PS2, PS3.2 และ PS4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค colony PCR ด้วย universal primer ของแบคทีเรียบริเวณ 16S ribosomal RNA gene 6F: 5' GGAG AGTTAGATCTTGCTCAG3' และ 1510R: 5' GTGCTGCAGGGTTACCTTGTTACGACT3' เตรียม PCR Mixture ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Buffer A 2.5 ไมโครลิตร 10x dNTPs 2.5 ไมโครลิตร 25mM MgCl₂ 2.5 ไมโครลิตร 10µM 6F 1 ไมโครลิตร 10µM 1510R 1 ไมโครลิตร DNA template 3 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 1 ไมโครลิตร และ water nuclease-free 11.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำ PCR Mixture ที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอรุ่น Veriti® 96-well Fast Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้

ตารางที่ 3.1 Temperature cycling ของเชื้อ *Pseudomonas* spp.

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	3 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	52	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	1 นาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอครั้งสุดท้าย (final extension)	72	5 นาที

ทำปฏิกิริยาขั้นที่ตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่จำนวน 34 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากขนาดดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 1x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 25 นาที ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยนำไปส่องภายใต้ UV transilluminators จากนั้นทำการสกัด PCR Product เพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ชุด PCR Purification Kit (Favorgen) วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอให้ได้ 40 นาโนกรัม นำตัวอย่างดีเอ็นเอส่งวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นนำลำดับสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST และวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit และใช้โปรแกรม Blast Tree View ในฐานข้อมูล NCBI โดยกำหนดค่า Tree method เป็น Neighbor Joining กำหนดค่า Max Seq

Difference เท่ากับ 0.05 เพื่อตรวจหาความใกล้ชิดของเชื้อเป้าหมายเพื่อเปรียบเทียบและจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกับสายพันธุ์ใกล้เคียง

3.8.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Trichoderma* spp. และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

3.8.2.1 การแยกดีเอ็นเอ

เตรียมหลอด sterile microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัด Phire Plant Direct PCR Master Mix จากบริษัท Thermo Fisher Scientific เชื้อเส้นใยราโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปกดให้ละเอียด (มีลักษณะหนืด) แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% agarose gel ใน 1x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 25 นาที ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยนำไปส่องภายใต้ UV transilluminators

3.8.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacers region (ITS)

นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย primer ของเชื้อราบริเวณ Internal Transcribed Spacers region ITS1: 5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3' และ ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' เตรียม PCR Mixture ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Taq Buffer 2.5 ไมโครลิตร 2.5 μ M dNTPs 2 ไมโครลิตร 25mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร 10 μ M forward primer 1 ไมโครลิตร 10 μ M reverse primer 1 ไมโครลิตร DNA template 1 ไมโครลิตร (ประมาณ 100 นาโนกรัม) Taq DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร และ water nuclease-free 15 ไมโครลิตร จากนั้นนำ PCR Mixture ที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Veriti® 96-well Fast Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้

ตารางที่ 3.1 Temperature cycling ของเชื้อ *Trichoderma* spp.

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	52	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	45 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอครั้งสุดท้าย (final extension)	72	4 นาที

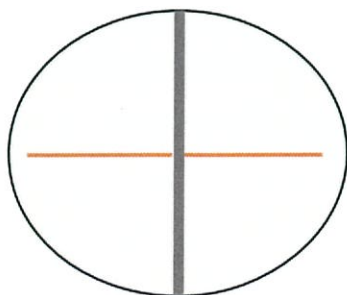
ทำปฏิกิริยาขั้นที่ตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่จำนวน 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากขนาดดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 1x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 25 นาที ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยนำไปส่องภายใต้ UV transilluminators นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอส่งวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นนำลำดับสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST และวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit และใช้โปรแกรม Blast Tree View ในฐานข้อมูล NCBI โดยกำหนดค่า Tree method เป็น Neighbor Joining กำหนดค่า Max Seq Difference เท่ากับ 0.05 เพื่อตรวจหาความใกล้ชิดของเชื้อเป้าหมายเพื่อเปรียบเทียบและจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกับสายพันธุ์ใกล้เคียง

3.9 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

3.9.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Naif *et al.*, 2016)

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทเลี้ยงบนอาหาร Modified Nutrient Glucose Agar (MNGA) โดยขีดเชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นเส้นตรงกลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่คัดแยกได้มาขีดเป็น T-streak ตั้งฉากกับเชื้อแอกติโนมัยซีท บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน บันทึกประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. (ภาคผนวก ง)

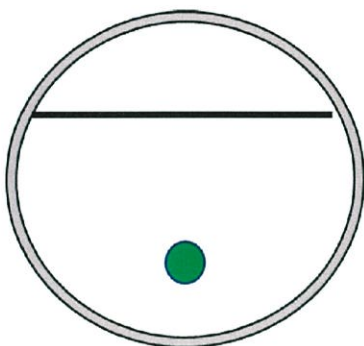
สำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์เลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) โดยขีดเป็นเส้นตรงกลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่คัดแยกได้มาขีดเป็น T-streak ตั้งฉากกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน บันทึกประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. (ภาคผนวก ง)



รูปที่ 3.1 แสดงรูปแบบการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp.

3.9.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. โดยเชื้อแอกติโนมัยซีท (Naif. *et al.*, 2016)

ทดสอบประสิทธิภาพการ ยับยั้งเชื้อราเขียว *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี dual culture โดยขีดเชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นเส้นตรงห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรเจาะเส้นใยของเชื้อ *Trichoderma* spp. วางห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร โดยวางด้านตรงข้ามกับเชื้อแอกติโนมัยซีท บ่มที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp.



รูปที่ 3.2 แสดงรูปแบบการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp.

3.9.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (พรศิลป์ และวุฒิชัย, 2551)

ทดสอบประสิทธิภาพการ ยับยั้งเชื้อราเขียว *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี dual culture โดยขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นเส้นตรง บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรเจาะเส้นใยของเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยวางด้านตรงข้ามกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน) จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสมการดังนี้ (Mahadatanapuk, 2014) (ภาคผนวก ง)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{100 \times (R_1 - R_2)}{R_1}$$

โดยที่ R_1 คือเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของ control

R_2 คือรัศมีเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อทดสอบ

บทที่ 4

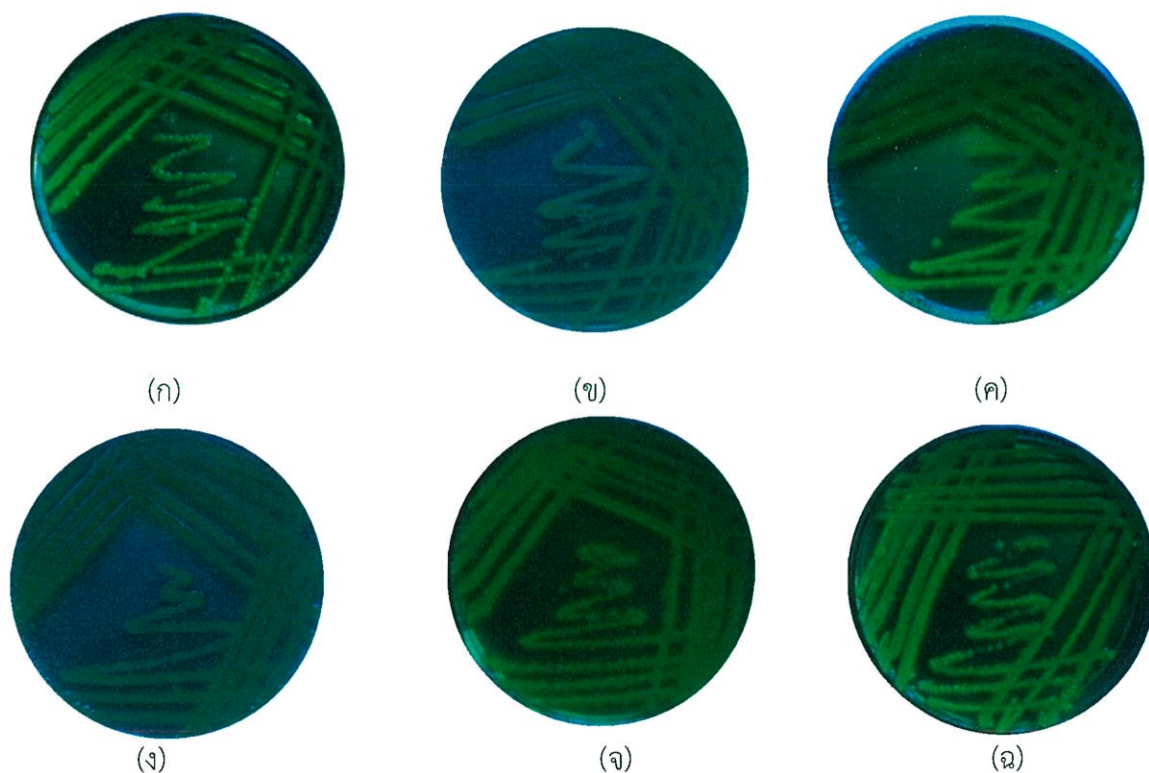
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดจากมารยาทฟาร์ม อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด (ภาคผนวก ค) ในการคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากเห็ดนางรมหลวง สามารถคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. ได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์พบ 4 ไอโซเลทที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ และเชื้อ *Trichoderma* spp. ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท

4.1.1 ลักษณะการเรืองแสงภายใต้หลอดฟลูออเรสเซนซ์

จากการศึกษาลักษณะการเรืองแสงของเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยสังเกตการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์บนอาหาร King's medium B (KB) แสดงผลดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS1 (ก) ไอโซเลท PS2 (ข) ไอโซเลท PS3.2 (ค) ไอโซเลท PS4 (ง) ไอโซเลท PS6 (จ) ไอโซเลท PS7 (ฉ) บนอาหาร KB ระยะเวลา 2 วัน (เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์)

พบว่าผลการศึกษาการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อ *Pseudomonas* spp. 6 ไอโซเลทที่คัดแยกได้นั้น มีเชื้อ 2 ไอโซเลทที่ไม่เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ได้แก่ เชื้อไอโซเลท PS2 และ PS4 และมีเชื้อ 4 ไอโซเลทสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ได้แก่ เชื้อไอโซเลท PS1, PS3.2, PS6 และ PS7 เนื่องจากมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Mohamed, 2012 รายงานว่าเชื้อที่ก่อโรคที่เกิดจากแบคทีเรียใน โรงเพาะเห็ดเป็นกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ได้แก่ *Pseudomonas tolaasii* ซึ่งก่อให้เกิดโรค brown blotch ในดอกเห็ดทำให้ดอกเห็ดเกิดเป็นจุดดำเมือกและเส้นใยเห็ดไม่สามารถเจริญต่อได้

ในปี พ.ศ. 2553 มีการผลิตเห็ดในโลกเพิ่มขึ้นเกือบ 6 ล้านตันต่อปี (Faostat, 2012) ทั้งในประเทศจีน สหรัฐอเมริกาและหลายประเทศในยุโรปเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ ในประเทศอิตาลี มีประมาณ 98,000 ตัน ส่วนใหญ่คือ *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (เห็ดกระดุม) *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kum (เห็ดนางรม) และ *Pleurotus eryngii* (DC ex Fr) (เห็ดนางรมหลวง) โรคที่เกิดในเห็ดสามารถเกิดได้ทั้งจากเชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรียทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมีนัยสำคัญ โดยโรคที่เกิดจากแบคทีเรียมีแนวโน้มที่จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญเสีย (Fermor, 1987) โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย หลายชนิดมักพบในการเพาะเห็ด *Agaricus* spp. และ *Pleurotus* spp. ซึ่งมีสาเหตุมาจาก fluorescent *Pseudomonas* จึงคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ไปทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค และตรวจสอบลักษณะทางจีโนม

4.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Pseudomonas* spp.

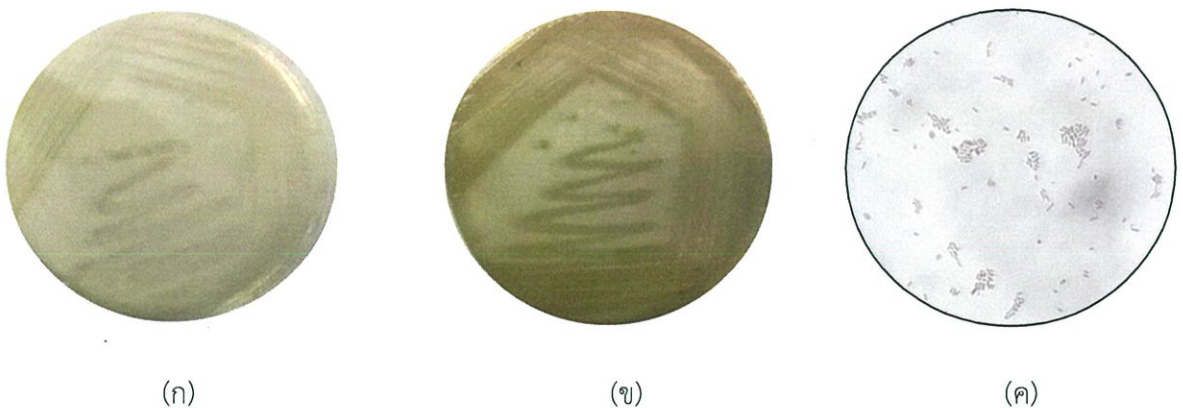
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยสังเกตลักษณะโคโลนี การเจริญบนอาหารที่แตกต่างกัน รูปร่าง รงควัตถุที่ละลายน้ำ การติดสีแกรม และขนาดสามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ดังนี้

เชื้อไอโซเลท PS1 สร้างโคโลนีสีขาวบนอาหาร NA สร้างโคโลนีสีครีมบนอาหาร KB โคโลนีมีรูปร่างกลม ผิวเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ รูปร่างเป็นรูปแท่ง ย้อมแกรมติดสีแกรมลบ มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.37 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 4.64 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS1 บนอาหาร NA (ก) บนอาหาร KB (ข) และ แสดงลักษณะรูปร่างของ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ค) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อไอโซเลท PS3.2 สร้างโคโลนีสีน้ำตาล รงควัฒ์ที่ละลายน้ำสีม่วงอ่อน บนอาหาร NA สร้างโคโลนีสีน้ำตาล สร้างรงควัฒ์ที่ละลายน้ำสีน้ำตาล บนอาหาร KB โคโลนีมีรูปร่างกลม ผิวเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง รูปร่างเป็นรูปแท่ง ย้อมแกรมติดสีแกรมลบ มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.54 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 4.58 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.3



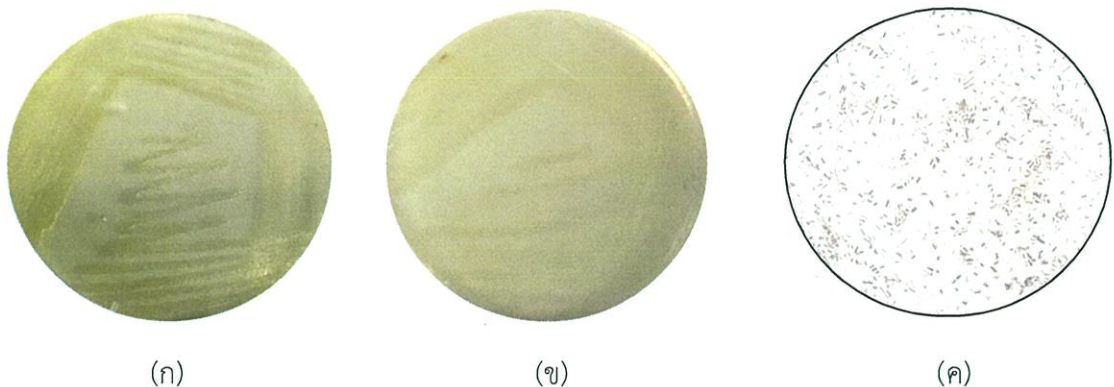
รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS3.2 บนอาหาร NA (ก) บนอาหาร KB (ข) และ แสดงลักษณะรูปร่างของ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ค) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อไอโซเลท PS6 สร้างโคโลนีสีขาบบนอาหาร NA สร้างโคโลนีสีครีมบนอาหาร KB โคโลนีมีรูปร่างกลม ผิวเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง รูปร่างเป็นรูปแท่ง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ย้อมแกรมติดสีแกรมลบ มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.15 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 3.75 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS6 บนอาหาร NA (ก) บนอาหาร KB (ข) และ แสดงลักษณะรูปร่างของ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ค) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อไอโซเลท PS7 สร้างโคโลนีสีขาบบนอาหาร NA สร้างโคโลนีสีครีมบนอาหาร KB โคโลนีมีรูปร่างกลม ผิวเรียบ ขอบโคโลนีเกลี้ยง รูปร่างเป็นรูปแท่ง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ รูปร่างเป็นรูปแท่ง ย้อมแกรมติดสีแกรมลบ มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.19 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 3.99 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS7 บนอาหาร NA (ก) บนอาหาร KB (ข) และ แสดงลักษณะรูปร่างของ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ค) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

4.1.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

นำเชื้อ fluorescent *Pseudomonas* ที่คัดแยกได้ทั้ง 4 ไอโซเลตมาทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยการทำให้ดอกเห็ดเกิดบาดแผลและฉีด fluorescent *Pseudomonas* ที่คัดแยกได้ลงบนดอกเห็ด สังเกตความสามารถในการทำให้เกิดโรค ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Pseudomonas* spp.

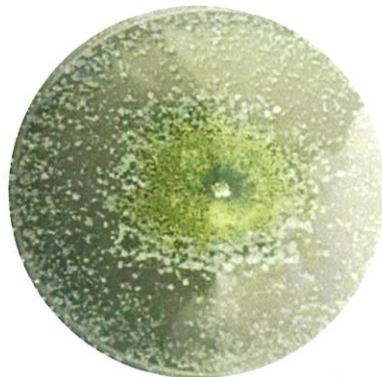
จากการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคพบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 วัน ดอกเห็ดเกิดจุดน้ำเมือกและเน่า แสดงให้เห็นความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ

ดังการศึกษาของ Mohamed, 2012 ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนเห็ดกระดุม โดยใช้เชื้อ *P. tolaasii* ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่สามารถแสดงอาการของโรคได้ เมื่อใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นเท่ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นความสามารถในการทำให้เกิดโรคหลังจากผ่านไป 2 วัน และเมื่อใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะแสดงให้เห็นความสามารถในการทำให้เกิดโรคหลังจากผ่านไป 2 วัน แต่จะทำให้สีของจุดน้ำเมือกมีความเข้มมากกว่าปริมาตร 50 ไมโครลิตร

4.1.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Trichoderma* spp.

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Trichoderma* spp. เบื้องต้น โดยสังเกตลักษณะโคโลนี การเจริญบนอาหารที่แตกต่างกัน รูปร่าง และขนาด สามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ดังนี้โดยศึกษาการเจริญบนอาหาร โคนิเดีย คลาไมโดสปอร์ และโคนิติโอฟอร์ สามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ดังนี้

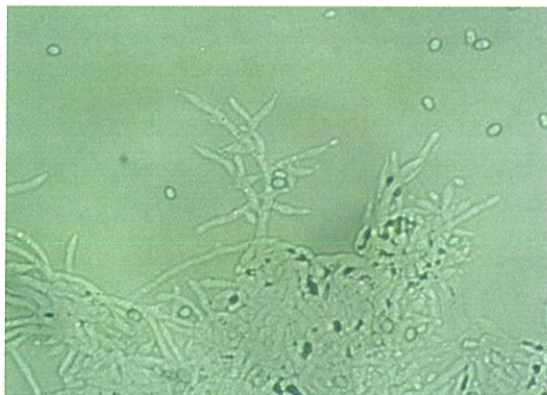
เชื้อไอโซเลท TM1 โคนิเดียมีขนาดด้านกว้าง เฉลี่ย 5 ไมโครเมตรและด้านยาวเฉลี่ย 7.6 ไมโครเมตร คลาไมโดสปอร์มีขนาด เฉลี่ย 10.38 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.7



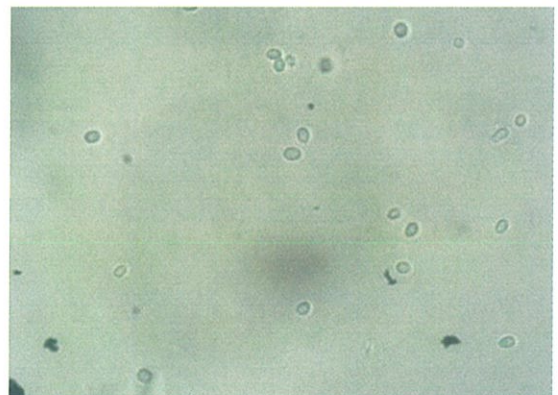
(ก)



(ข)



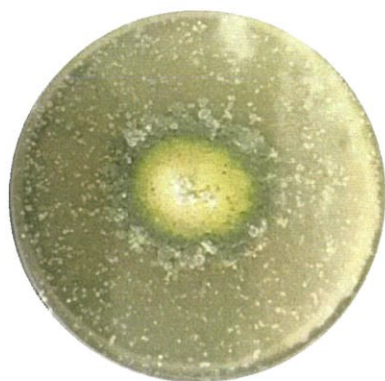
(ค)



(ง)

รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะเส้นใยอากาศของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM1 (ก) แสดงลักษณะเส้นใยอาหารของเชื้อ นอาหาร PDA ระยะเวลา 7 วัน (ข) แสดงลักษณะรูปร่าง (ค) และ แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ (ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

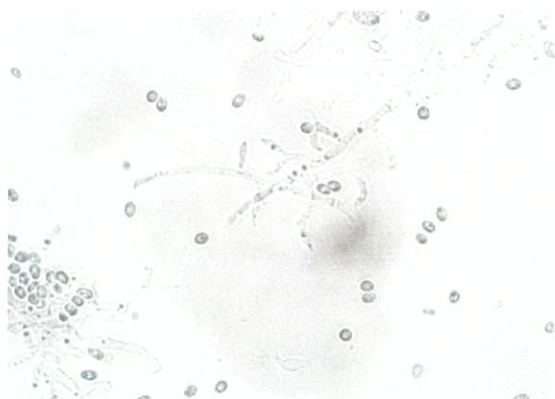
เชื้อไอโซเลท TM3 โคนิเดียมีขนาดด้านกว้าง เฉลี่ย 4.8 ไมโครเมตรและด้านยาวเฉลี่ย 7.4 ไมโครเมตร คลาไมโดสปอร์มีขนาด เฉลี่ย 13.61 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.8



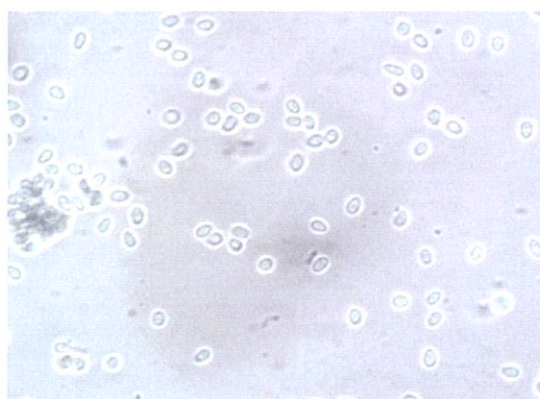
(ก)



(ข)



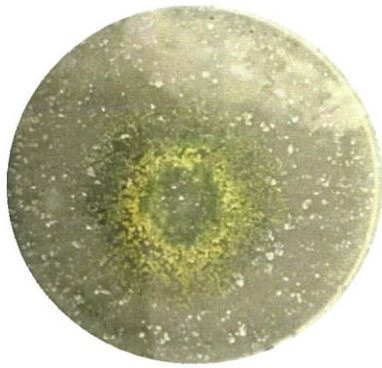
(ค)



(ง)

รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะเส้นใยอากาศของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM3 (ก) แสดงลักษณะเส้นใยอาหารของเชื้อบนอาหาร PDA ระยะเวลา 7 วัน (ข) แสดงลักษณะรูปร่าง (ค) และ แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ (ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

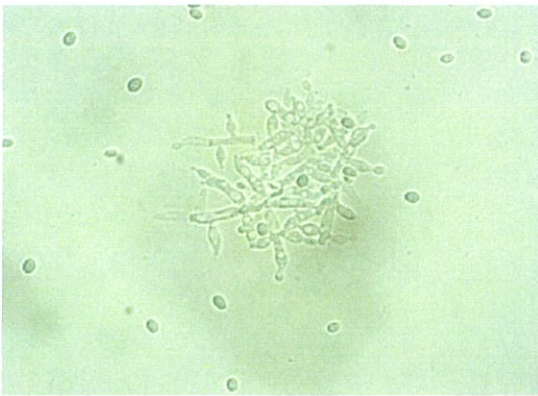
เชื้อไอโซเลท TM4 โคนิเดียมีขนาดด้านกว้าง เฉลี่ย 5.2 ไมโครเมตรและด้านยาวเฉลี่ย 6.5 ไมโครเมตร คลาമായโดสปอร์มีขนาด เฉลี่ย 10.58 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.9



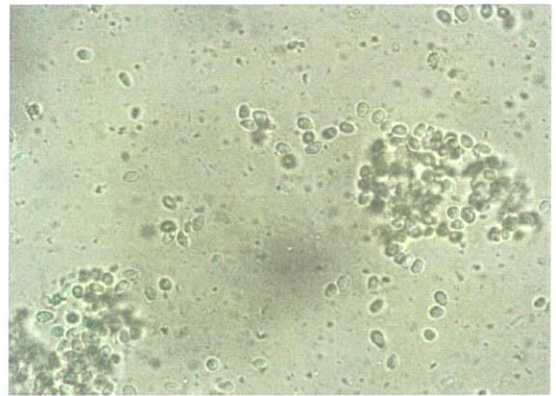
(ก)



(ข)



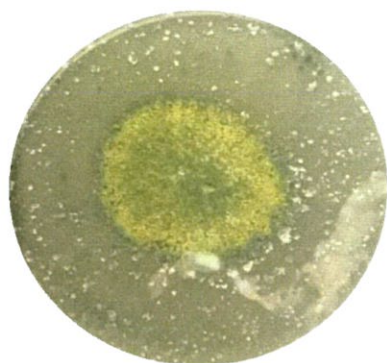
(ค)



(ง)

รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะเส้นใยอากาศของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM4 (ก) แสดงลักษณะเส้นใยอาหารของเชื้อบนอาหาร PDA ระยะเวลา 7 วัน (ข) แสดงลักษณะรูปร่าง (ค) และแสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ (ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อไอโซเลท TM5 โคนิเดียมีขนาดด้านกว้าง เฉลี่ย 4.9 ไมโครเมตรและด้านยาวเฉลี่ย 7.1 ไมโครเมตร คลาไมโดสปอร์มีขนาด เฉลี่ย 10.32 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.10



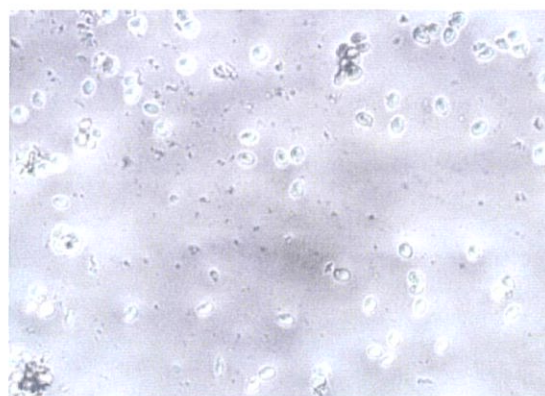
(ก)



(ข)



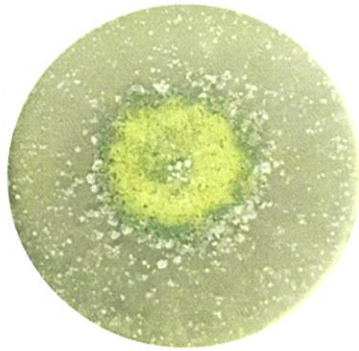
(ค)



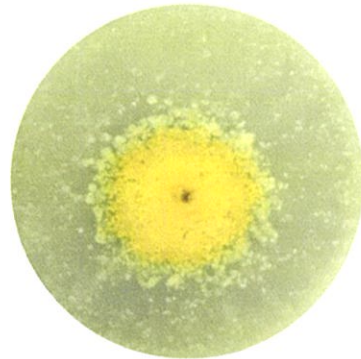
(ง)

รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะเส้นใยอากาศของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM5 (ก) แสดงลักษณะเส้นใยอาหารของเชื้อบนอาหาร PDA ระยะเวลา 7 วัน (ข) แสดงลักษณะรูปร่าง (ค) และแสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ (ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

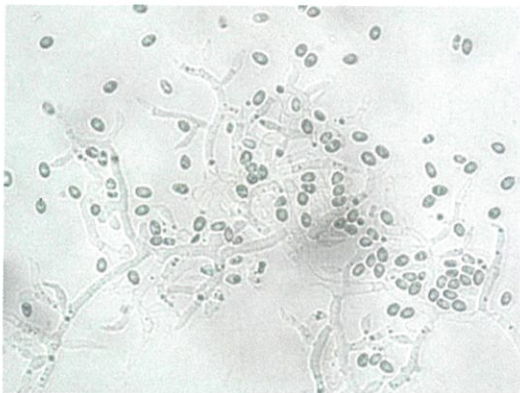
เชื้อไอโซเลท TM6 โคนิเดียมีขนาดด้านกว้าง เฉลี่ย 5.12 ไมโครเมตรและด้านยาวเฉลี่ย 7.09 ไมโครเมตร คลาമായโดสปอร์มีขนาด เฉลี่ย 12.12 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.11



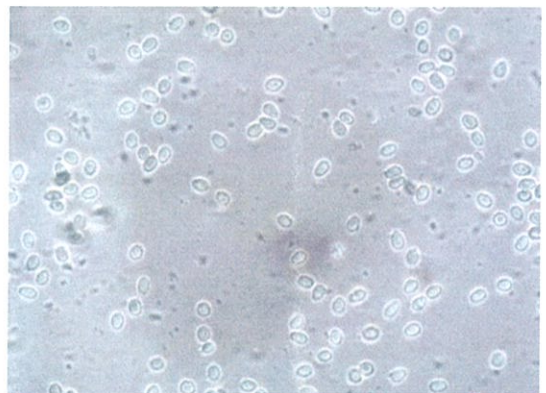
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะเส้นใยอากาศของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM6 (ก) แสดงลักษณะเส้นใยอาหารของเชื้อบนอาหาร PDA ระยะเวลา 7 วัน (ข) แสดงลักษณะรูปร่าง (ค) และแสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ (ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

ตามการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามคู่มือ “*Trichoderma: Identification and Agricultural Applications*” (Gary and Parkash, 2015) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM1, TM4 และ TM5 ทั้ง 3 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Trichoderma viride* โดยคลาമായโดสปอร์มีขนาดอยู่ในช่วง 6.5-11.0 ไมโครเมตร สร้างรงควัตถุสีเหลืองภายใต้อาหาร และ ไอโซเลท TM3 และ TM6 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* โดยคลาമായโดสปอร์มีขนาดอยู่ในช่วง 8.0-14.0 ไมโครเมตร สร้างรงควัตถุสีเหลืองภายใต้อาหาร (ภาคผนวก จ)

4.2 แอคติโนมัยซีท

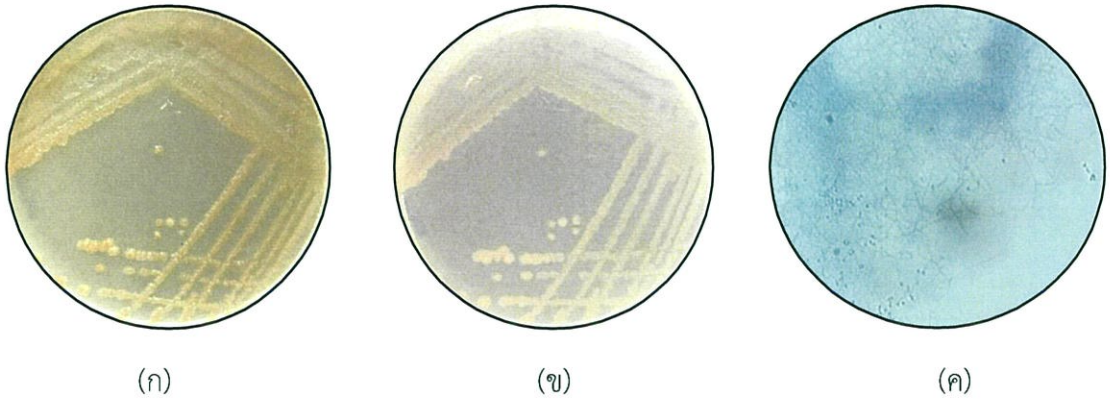
นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จาก ภัทรภรณ์ และคณะ, 2560 จำนวน 22 ไอโซเลทคือ BKH 00431, BKH 00722, BKH 00723, BKH 01722, BKH 01724, BKH 01730, BKH 02030, BKH 222, BKH 232, BKH 241, BKH 422, BKH 431, BKH 521, BKH 731, BKH 1322, BKH 1731, BKH 1922, BKH 1941, BKH 2023, BKH 2024, BKH 2026 และ BKH 2032 มาศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่คัดแยกได้จากโรงเพาะเห็ดทั้ง 2 ชนิด

4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 22 ไอโซเลท ลักษณะเด่นของเชื้อแอคติโนมัยซีทเบื้องต้นจากลักษณะโคโลนี เส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) เส้นใยใต้อาหาร (Substrate mycerium) รังควัตถุ และลักษณะของสปอร์สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็น 4 กลุ่ม ตามสีมาตรฐาน The NBS/IBCC Color system ดังนี้

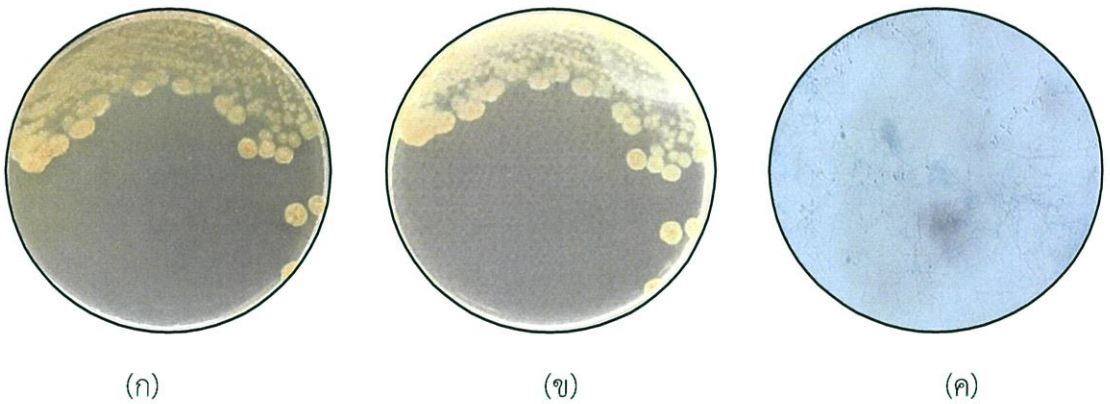
กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มของแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish Yellow

เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 00431 สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Pale Greenish Yellow ไม่สร้างรังควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มสปอร์ (Sporangia) มีลักษณะแบบ Polysporous ของ Planopolyspora ดังรูปที่ 4.12



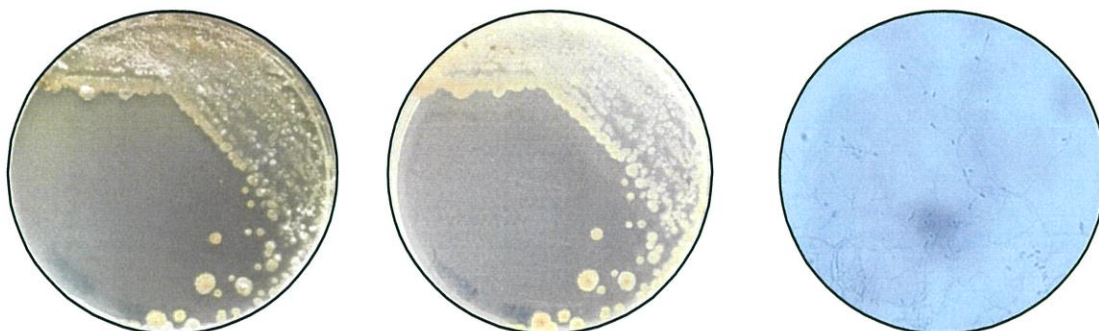
รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท BKH 00431 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 222 สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบสายยาว มีลักษณะแบบ Rectiflexbiles ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท BKH 222 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ BKH 431 สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Pale Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มสปอร์ มีลักษณะแบบ Polysporous ของ Planopolyspora ดังรูปที่ 4.14



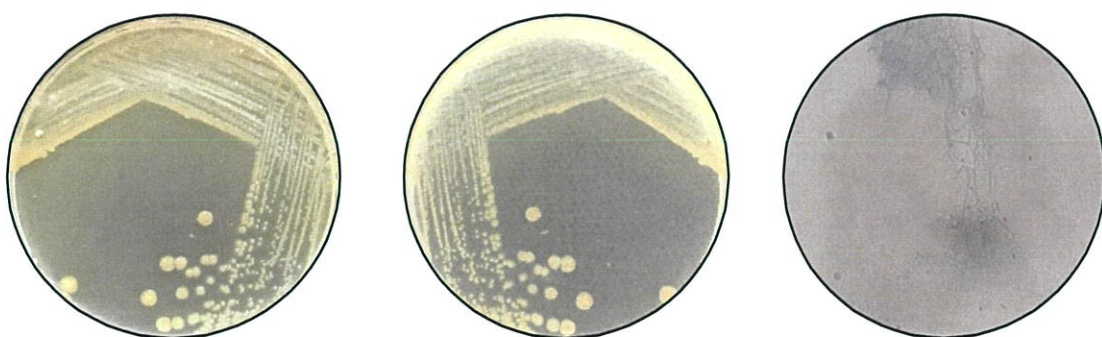
(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลขที่ BKH 431 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ BKH 521 สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ไม่พบการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP 2 ดังรูปที่ 4.15



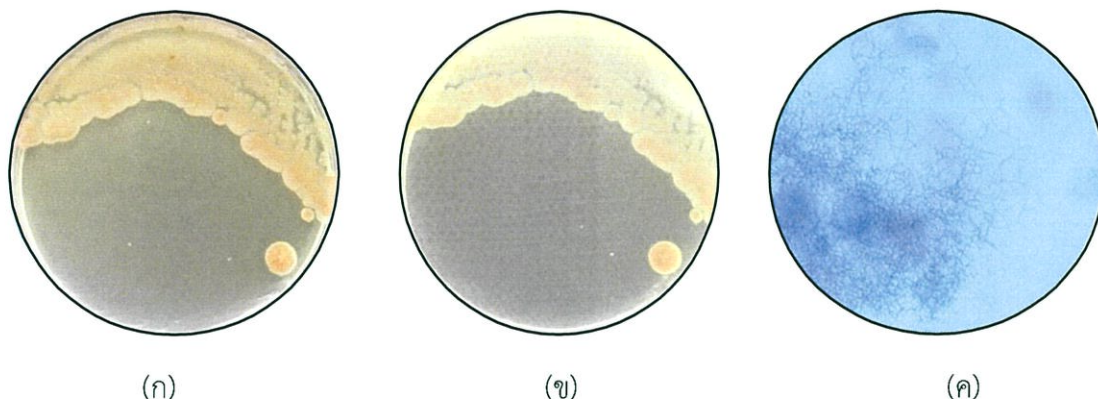
(ก)

(ข)

(ค)

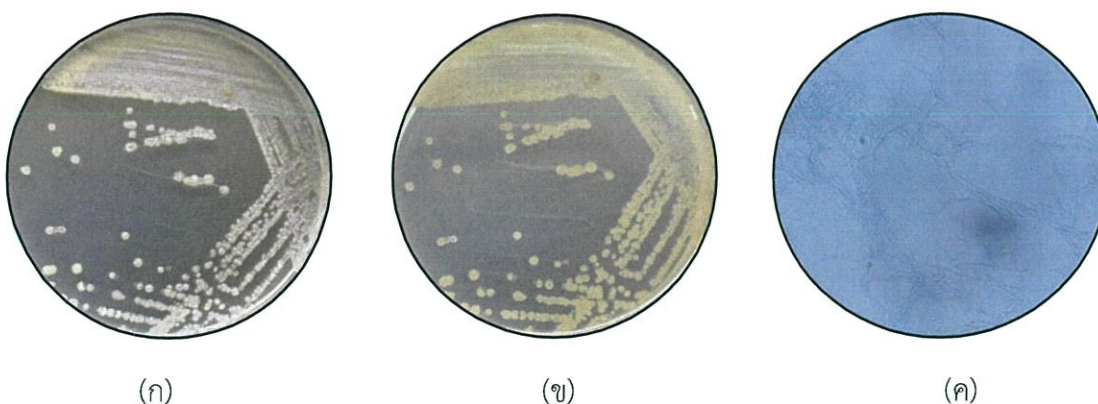
รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลขที่ BKH 521 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ BKH 731 สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Pale Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มสปอร์ มีลักษณะแบบ Polysporous ของ Planopolyspora ดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลขที่ BKH 731 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ BKH 1322 สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบสายสั้น (Chain) มีลักษณะแบบ Oligosporous ของ Catellatospora หรือสายสปอร์ตรงจนถึงโค้งงอ ดังรูป 4.17



รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลขที่ BKH 1322 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 1922 สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Light Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มสปอร์ มีลักษณะแบบ Polysporous ของ Planopolyspora หรือสายสปอร์รูปทรงคล้ายท่อ ดังรูปที่ 4.18



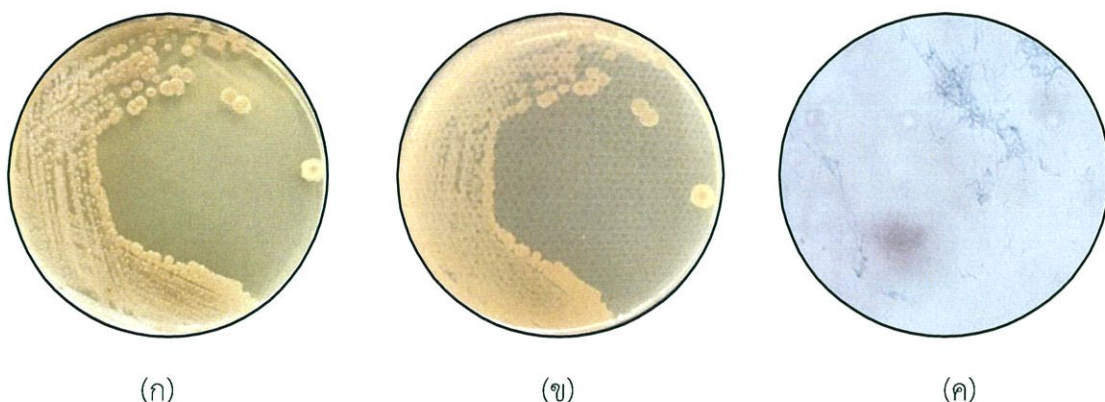
รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท BKH 1922 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 1941 สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Light Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles ดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท BKH 1941 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

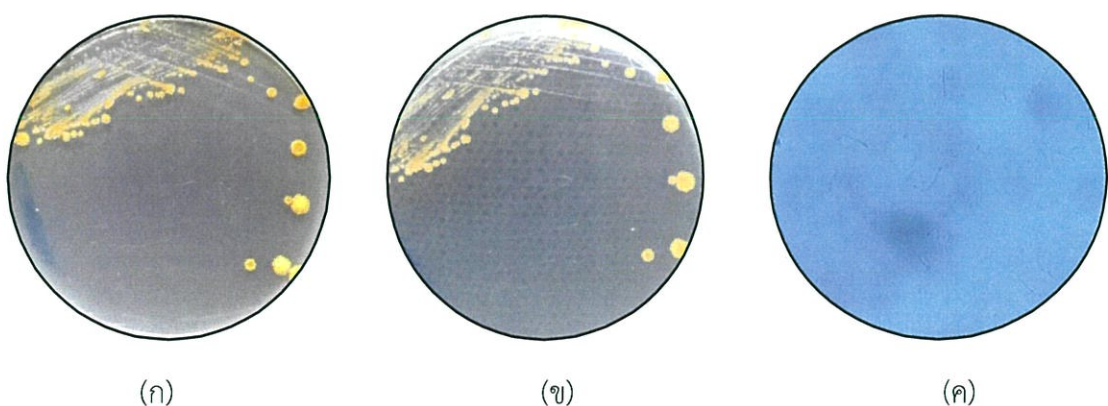
เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ BKH 2032 สร้างเส้นใยอากาศสี Light Greenish Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบสายยาว มีลักษณะ Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ (hook) ดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลข BKH 2032 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

กลุ่มที่ 2 สร้างเส้นใยสี Orange Yellow

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ BKH 00722 สร้างเส้นใยอากาศสี Vivid Orange Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Vivid Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบสายยาว มีลักษณะแบบ Rectiflexbiles ดังรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลข BKH 00722 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

กลุ่ม 3 เป็นกลุ่มของแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Olive

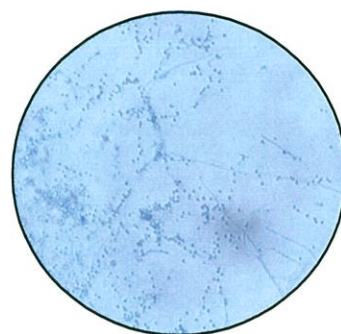
เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 00723 สร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Gray เส้นใยใต้
อาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบสายยาว มีลักษณะ
แบบ Rectiflexibiles หรือสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ ดังรูปที่ 4.22



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท
BKH 00723 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

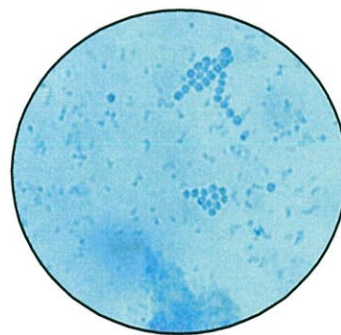
เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 01730 สร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Gray เส้นใยใต้
อาหารสี Moderate Olive สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Greenish Yellow สร้างสปอร์แบบ
สายยาว มีลักษณะแบบ Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ ดังรูปที่ 4.23



(ก)



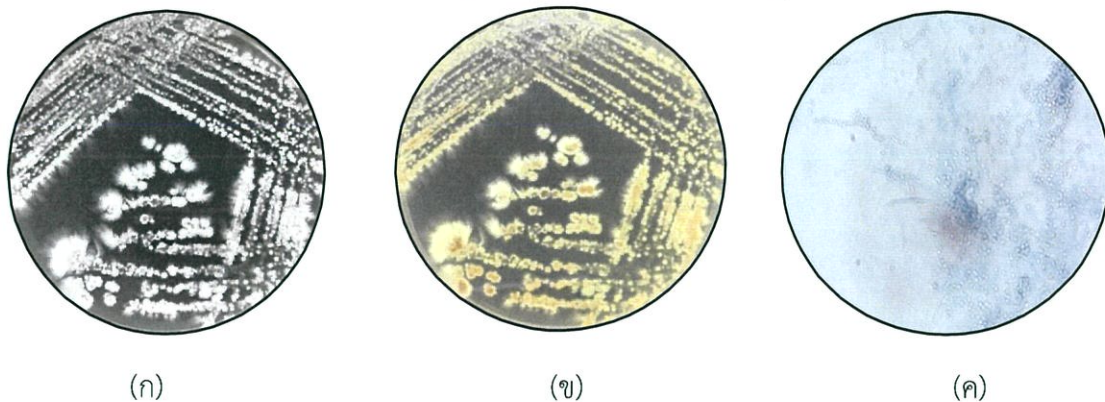
(ข)



(ค)

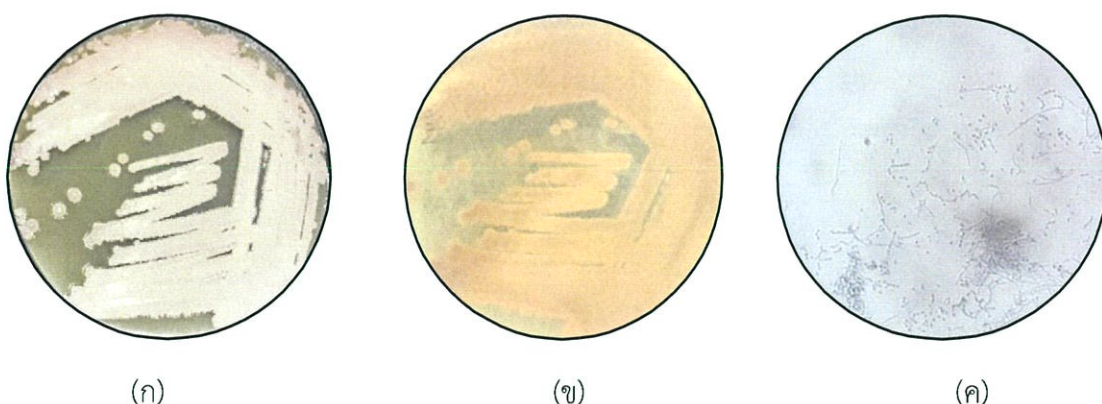
รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท
BKH 01730 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ BKH 232 สร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Gray เส้นใยใต้
อาหารสี Brilliant Yellow Green สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Light Greenish Yellow สร้างสปอร์
แบบสายยาว มีลักษณะแบบ *Retinaculiaperti* สายสปอร์คล้ายขอ ดังรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลขที่
BKH 232 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ BKH 241 สร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Gray เส้นใยใต้
อาหารสี Light Grayish Olive สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Light Grayish Olive สร้างสปอร์แบบสาย
สั้น มีลักษณะแบบ *Oligosporous* ของ *Catellatospora* หรือสายสปอร์ตรงจนถึงโค้งงอ
ดังรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลขที่
BKH 241 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 1731 สร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Gray เส้นใยใต้
อาหารสี Moderate Yellowish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Light Olive Brown สร้างสปอร์
แบบ polysporous ลักษณะแบบ Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียว
ซ้อนกัน 1-3 ชั้น ดังรูปที่ 4.26



(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท
BKH 1731 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 2023 สร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Gray เส้นใยใต้
อาหารสี Light Grayish Olive สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Light Grayish Olive สร้างสปอร์แบบสาย
ยาว มีลักษณะแบบ Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ ดังรูปที่ 4.27



(ก)

(ข)

(ค)

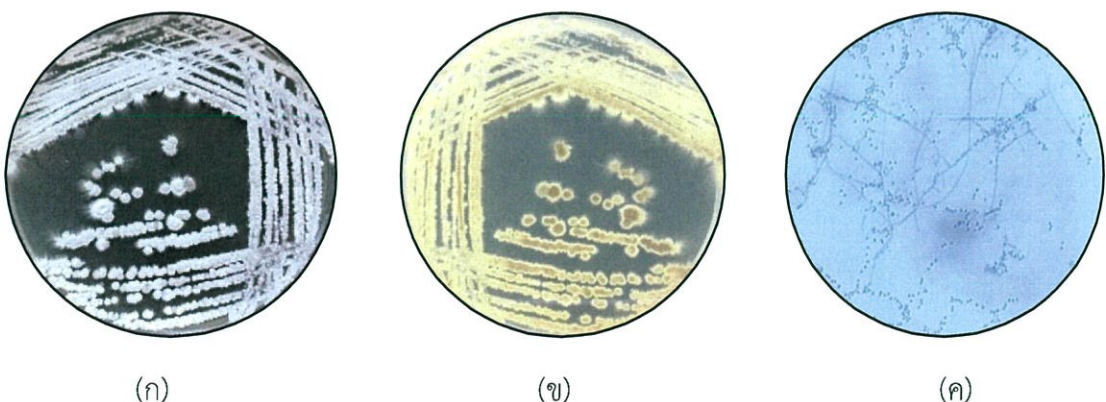
รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท
BKH 2023 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Neutral
เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 01722 สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยได้อาหารสี
Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มสปอร์ มีลักษณะแบบ
Polysporous ของ Planopolyspora หรือสายสปอร์รูปทรงคล้ายท่อ ดังรูปที่ 4.28



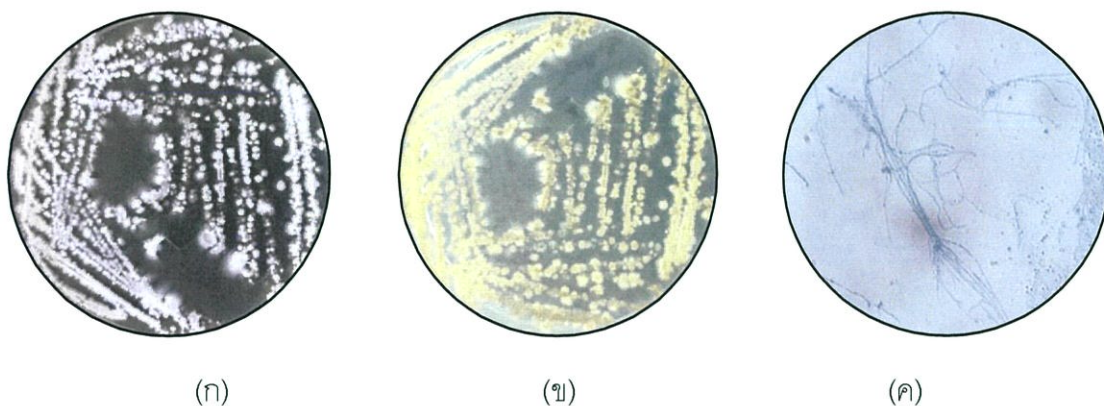
รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท
BKH 01722 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 01724 สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยได้อาหารสี
Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบสายยาว มีลักษณะแบบ
Rectiflexibiles หรือสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ ดังรูปที่ 4.29



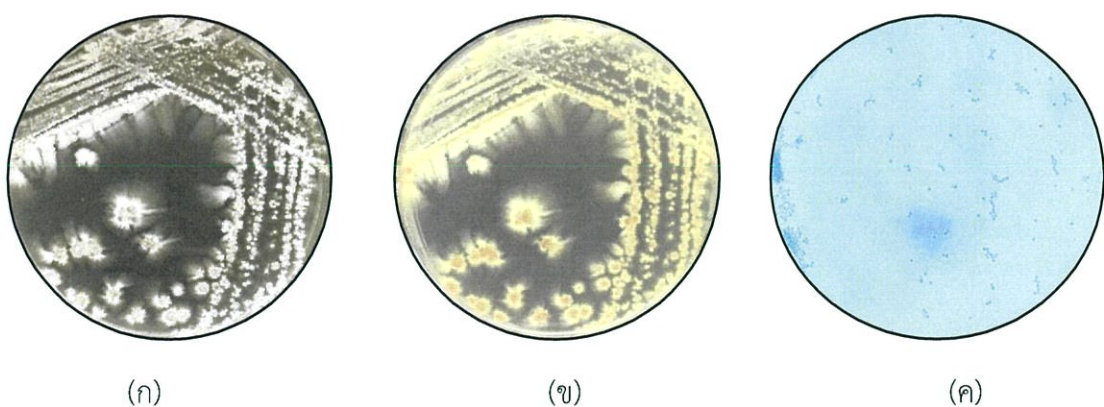
รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท
BKH 01724 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 02030 สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยใต้อาหารสี Brilliant Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบ polysporous มีลักษณะแบบ Rectiflexbiles ของสายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ ดังรูปที่ 4.30



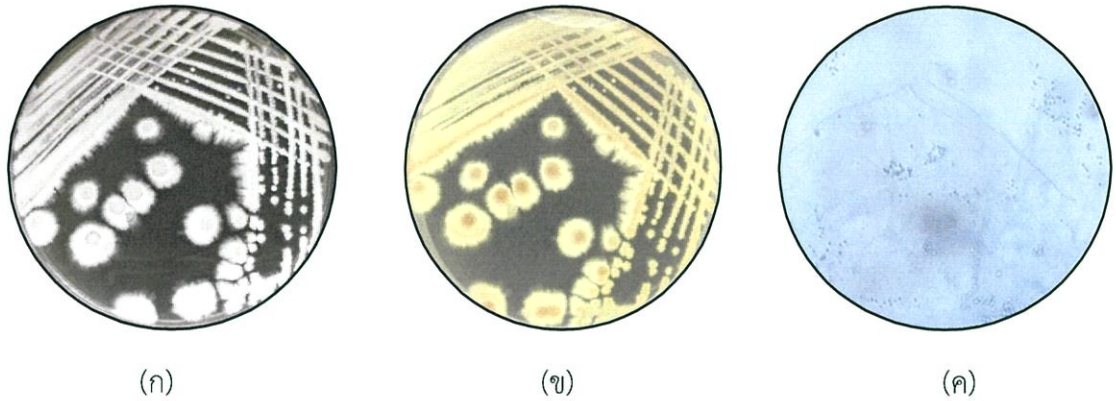
รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท BKH 02030 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 422 สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยใต้อาหารสี Brilliant Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบ polysporous มีลักษณะแบบ Rectiflexbiles ของสายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ ดังรูปที่ 4.31



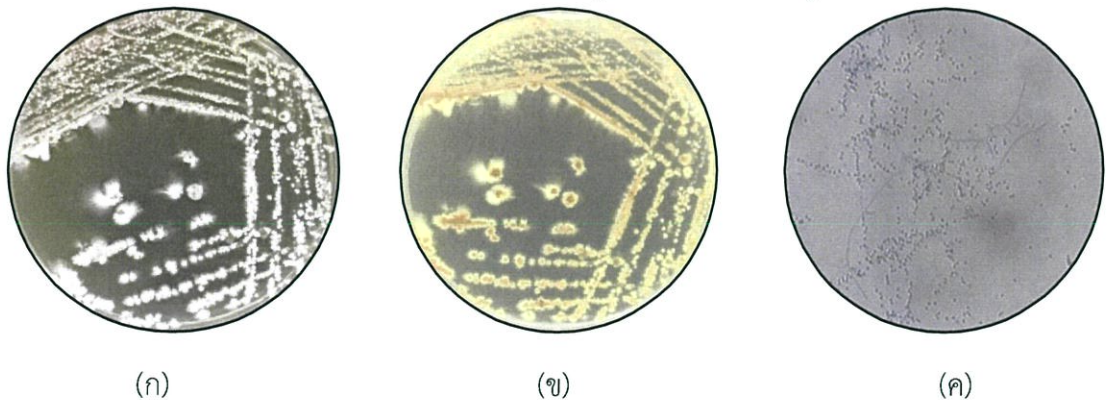
รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท BKH 422 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ BKH 2024 สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยใต้อาหารสี Brilliant Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะแบบ Rectiflexibiles หรือสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ ดังรูปที่ 4.32



รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท BKH 2024 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BKH 2026 สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยใต้อาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มสปอร์ มีลักษณะแบบ Polysporous ของ Planopolyspora หรือสายสปอร์รูปทรงคล้ายท่อ ดังรูปที่ 4.33



รูปที่ 4.33 แสดงลักษณะ เส้นใยอากาศ (ก) ลักษณะเส้นใยอาหาร (ข) ของไอโซเลท BKH 2026 ที่เลี้ยงบนอาหาร ISP 2 อายุ 14 วัน (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะสีพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 22 ไอโซเลท ด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System (ref)

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
1	BKH 00431	Pale Greenish Yellow #FFDF84	Pale Greenish Yellow #FFDF84	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 222	Pale Greenish Yellow #FFDF84	Light Greenish Yellow #FFDE5A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 431	Pale Greenish Yellow #FFDF84	Pale Greenish Yellow #FFDF84	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 521	Pale Greenish Yellow #FFDF84	Pale Greenish Yellow #FFDF84	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 731	Pale Greenish Yellow #FFDF84	Pale Greenish Yellow #FFDF84	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 1322	Pale Greenish Yellow #FFDF84	Light Greenish Yellow #FFDE5A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 1922	Pale Greenish Yellow #FFDF84	Light Yellow Green #DCD36A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 1941	Moderate Greenish Yellow #C4A43D	Light Yellow Green #DCD36A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 2032	Light Greenish Yellow #FFDE5A	Light Greenish Yellow #FFDE5A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
2	BKH 00722	Vivid Orange Yellow #F6A600	Vivid Orange Yellow #F6A600	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
3	BKH 00723	Light Olive Gray #887359	Light Greenish Yellow #FFDE5A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 01730	Light Olive Gray #887359	Moderate Olive #5E490F	Dark Greenish Yellow #98943E

ตารางที่ 4.1(ต่อ) แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 22 ไอโซเลท ด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System

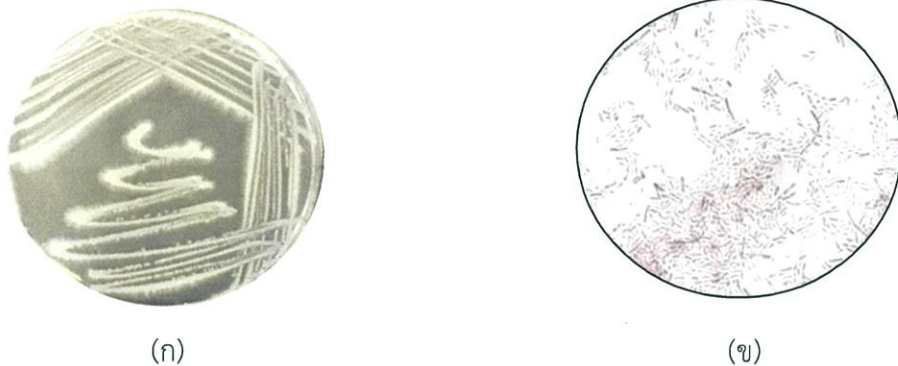
กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
3	BKH 232	Light Olive Gray #887359	Brilliant Yellow Green #CED23A	Light Greenish Yellow #FFDE5A
	BKH 241	Light Olive Gray #887359	Light Grayish Olive #8C8767	Light Grayish Olive #8C8767
	BKH 1731	Light Olive Gray #887359	Moderate Yellowish Brown #7D512D	Light Olive Brown #967117
	BKH 2023	Light Olive Gray #887359	Light Grayish Olive #8C8767	Light Grayish Olive #8C8767
4	BKH 01722	White #F2F3F4	Light Greenish Yellow #FFDE5A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 01724	White #F2F3F4	Light Greenish Yellow #FFDE5A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 02030	White #F2F3F4	Brilliant Greenish Yellow #E9E450	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 422	White #F2F3F4	Brilliant Greenish Yellow #E9E450	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 2024	White #F2F3F4	Brilliant Greenish Yellow #E9E450	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
	BKH 2026	White #F2F3F4	Light Greenish Yellow #FFDE5A	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ

4.3 แบคทีเรียปฏิปักษ์

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 6 ไอโซเลทคือ TISTR 412, TISTR 8411, TISTR 612, TISTR BCALg2, TISTR BCA002 และ TISTR p13A1 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่คัดแยกได้จากโรงเพาะเห็ดทั้ง 2 ชนิด

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TISTR 412 โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน (Irregular) สีครีม ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ (Rough) ขอบโคโลนีเว้า (Lobate) และทึบแสง (Opaque) ย้อมแกรมติดสีแกรมบวก มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.85 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 6.89 ไมโครเมตรดังรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.34 แสดงลักษณะโคโลนี (ก) แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ TISTR 412 (ข)

บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน

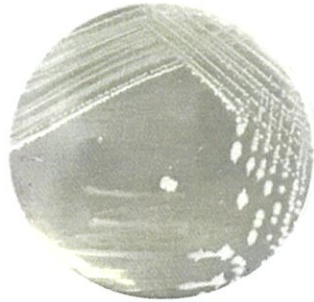
แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TISTR 8411 โคโลนีมีรูปร่างกลม (Circular) สีครีม ผิวหน้าโคโลนีเรียบ (Smooth) ขอบโคโลนีเรียบไม่มีรอยเว้า (Entire) และทึบแสง ย้อมแกรมติดสีแกรมบวก มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.44 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 3.83 ไมโครเมตรดังรูปที่ 4.24



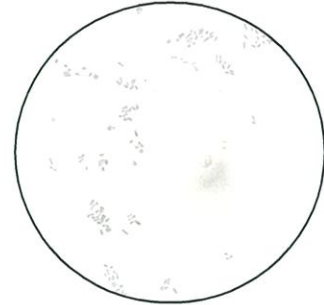
รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะโคโลนี (ก) แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ TISTR 8411 (ข)

บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TISTR 612 โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน สีครีม ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีเว้า และทึบแสง ย้อมแกรมติดสีแกรมบวก มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.43 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 4.47 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.25



(ก)

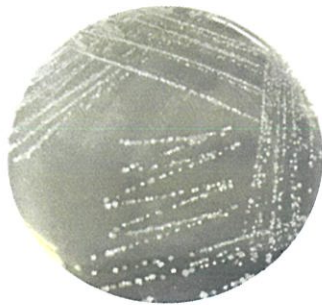


(ข)

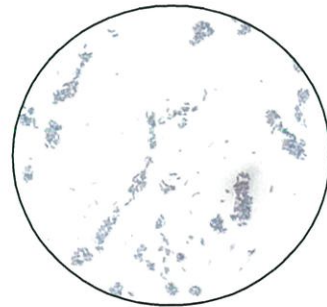
รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะโคโลนี (ก) แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ TISTR 612 (ข)

บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TISTR BCALg2 โคโลนีมีรูปร่างกลม สีขาว ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีเรียบไม่มีรอยเว้า และทึบแสง ย้อมแกรมติดสีแกรมบวก มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.46 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 3.78 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.26



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะโคโลนี (ก) แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ TISTR BCALg2 (ข)

บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TISTR BCA002 โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน สีครีม ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ ขอบโคโลนีเว้า และทึบแสง ย้อมแกรมติดสีแกรมบวก มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.33 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 5.33 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.27



(ก)



(ข)

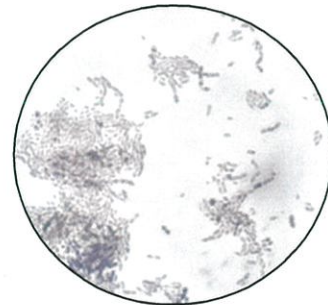
รูปที่ 4.38 แสดงลักษณะโคโลนี (ก) แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ TISTR BCA002 (ข)

บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TISTR p13A1 โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน สีครีม ผิวหน้าโคโลนีเรียบ ขอบโคโลนีหยักไม่สม่ำเสมอ (Erose) และทึบแสง ย้อมแกรมติดสีแกรมบวก มีขนาดกว้างเฉลี่ย 2.45 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 6.92 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.28



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.39 แสดงลักษณะโคโลนี (ก) แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ TISTR p13A1 (ข)

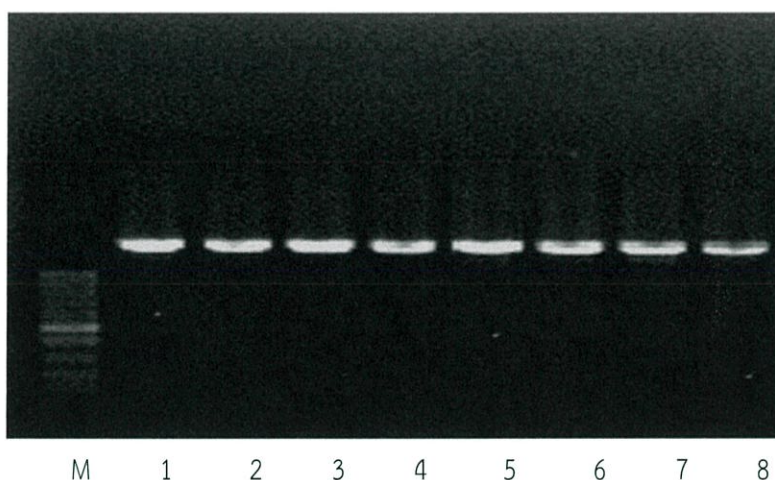
บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน

4.4 ตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

ตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็น fluorescent *Pseudomonas* และ เชื้อ *Trichoderma* spp. ที่ได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเห็ดจากมารยาทฟาร์ม อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

4.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียและการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

นำเชื้อ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS1, PS2, PS3.2 และ PS4 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค colony PCR ด้วย universal primer ของแบคทีเรียบริเวณ 16S ribosomal RNA gene โดยใช้ forward primer 6F และ reverse primer 1510R นำมาตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากขนาดดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี electrophoresis โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb



รูปที่ 4.40 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 6F และ 1510R และแสดงภาพ Gel electrophoresis ของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS1 (1), (2) ไอโซเลท PS3.2 (3), (4) ไอโซเลท PS6 (5), (6) ไอโซเลท PS7 (7), (8) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (M)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ universal primer ของแบคทีเรียบริเวณ 16S ribosomal RNA จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยโปรแกรม BLAST พบว่า

แบคทีเรีย PS1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Pseudomonas entomophila* strain XG3N-1 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100%

แบคทีเรีย PS3.2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Pseudomonas aeruginosa* strain Kasamber16 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 99%

แบคทีเรีย PS6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Pseudomonas entomophila* strain N-3-1-3 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 99%

แบคทีเรีย PS7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Pseudomonas entomophila* strain XG3N-1 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100%

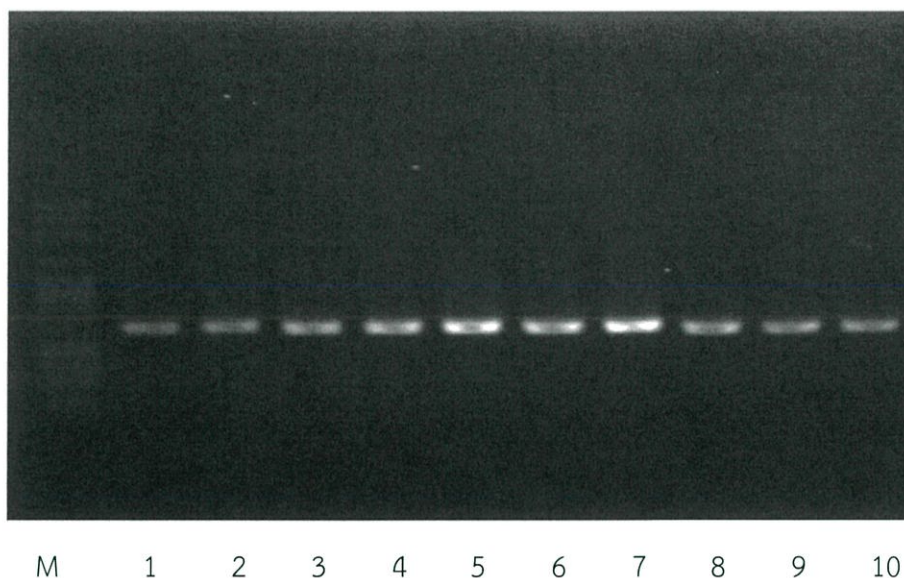
ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ universal primer ของแบคทีเรียบริเวณ 16S ribosomal RNA gene

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ ของ *Pseudomonas* spp.

Isolates	Sequence tested isolates	Identities (%) bp	GenBank accession No.
PS1	<i>Pseudomonas entomophila</i> strain XG3N-1	100	MF716724.1
PS3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain Kasamber16	99	KY549652.1
PS6	<i>Pseudomonas entomophila</i> strain N-3-1-3	99	KU601313.1
PS7	<i>Pseudomonas entomophila</i> strain XG3N-1	100	MF716724.1

4.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

นำเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM1, TM3, TM4, TM5 และ TM6 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย primer ของเชื้อราบริเวณ internal transcribed spacers region ITS1 และ ITS4 นำมาตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากขนาดดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี electrophoresis โดยเทียบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb



รูปที่ 4.41 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และแสดงภาพ Gel electrophoresis ของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM1 (1), (2) ไอโซเลท TM3 (3), (4) ไอโซเลท TM4 (5), (6) ไอโซเลท TM5 (7), (8) ไอโซเลท TM6 (9), (10) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (M)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกชนิดราโดยใช้ primer ของเชื้อราบริเวณ internal transcribed spacers region จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยโปรแกรม BLAST พบว่า

TM1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Trichoderma* sp. Isolates Xy24 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100%

TM3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Trichoderma longibrachiatum* strain CIB T29 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100%

TM4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Trichoderma viride* strain EGF17 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100%

TM5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Trichoderma viride* strain T7 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100%

TM6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมระหว่าง *Trichoderma longibrachiatum* strain CIB T29 ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100% ตารางที่ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกชนิดราโดยใช้ primer ของเชื้อราบริเวณ internal transcribed spacers region

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

Isolates	Sequence tested isolates	Identities (%) bp	GenBank accession No.
TM1	<i>Trichoderma</i> sp. Isolates Xy24	100	KX856006.1
TM3	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> strain CIB T29	100	EU280095.1
TM4	<i>Trichoderma viride</i> strain EGF17	100	KJ406563.1
TM5	<i>Trichoderma viride</i> strain T7	100	HQ259984.1
TM6	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> strain CIB T29	100	EU280095.1

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS1, PS6 และ PS7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas entomophila* และ ไอโซเลท PS3.2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas entomophila เป็นเชื้อก่อโรคตามธรรมชาติสามารถอยู่ได้ในดิน รากพืช และในน้ำ และก่อโรคร่วมกับแมลง (Isabelle et. al., 2009) ยังไม่พบว่า *Pseudomonas entomophila* ก่อให้เกิดโรคในโรงเพาะเห็ด *Pseudomonas aeruginosa* พบทั่วไปในธรรมชาติอย่างแพร่หลาย มีรายงานของ Morgan et.al. (1999) พบ *P. aeruginosa* ในเห็ดถุงในการทดลองการเพาะเห็ด และพบว่ามีการปนเปื้อนในเห็ดที่ซื้อจากร้านสะดวกซื้อต่างๆและที่ซื้อจากฟาร์มเพาะเห็ด นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนในถั่วงอกแต่ไม่พบในผัก ผลไม้ชนิดอื่น ซึ่งมักจะเกิดในระยะที่เห็ดรวมตัวเป็นดอกเห็ด

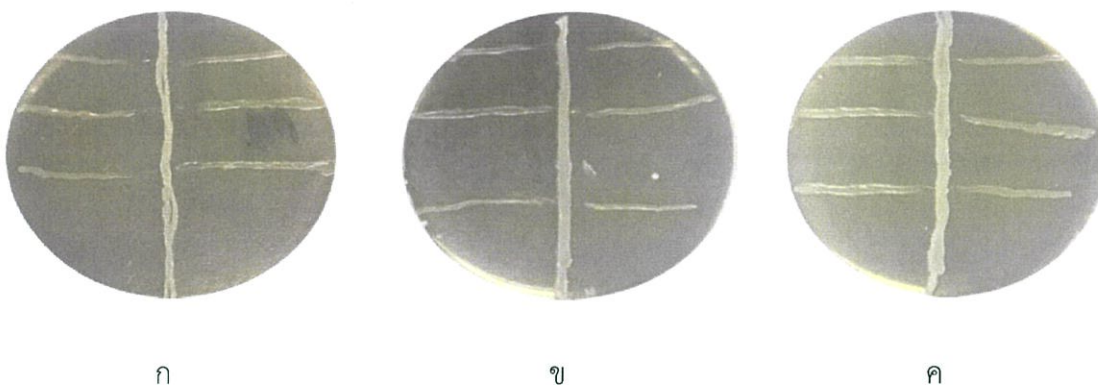
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM3 และ TM4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Trichoderma longibrachiatum* และ ไอโซเลท TM4 และ TM5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Trichoderma viride* ดังรายงานของ In-Young Choi et. al. (2003) ทำการคัดแยกเชื้อราเขียวจากเห็ดนางฟ้า พบว่าเมื่อจัดจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมจัดจำแนกได้เป็น *T. longibrachiatum* และ *T. harzianum* Sharma และ Bahukhandi (2003) ศึกษาเชื้อก่อโรคในตระกูลเห็ดนางรมในประเทศอินเดีย พบว่าโรคที่เกิดในโรงเพาะเห็ดมักเกิดจากราเขียวเป็นหลัก เมื่อจัดจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมจัดจำแนกได้เป็น *T. viride* และ *T. harzianum*

4.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

4.5.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp.

นำเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 28 ไอโซเลทมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทและโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยวิธี T-streak โดยวัดระยะร่นของเชื้อทดสอบทางด้านซ้ายและด้านขวาในหน่วยมิลลิเมตร

จากการทดสอบพบว่า เชื้อปฏิปักษ์ TISTR BCALg2 และ TISTR BCA002 มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS1 โดยมีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 4.65 มิลลิเมตร (คิดเป็น 5.17 เปอร์เซ็นต์) และ 6.99 มิลลิเมตร (คิดเป็น 7.76 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ และ TISTR BCA002 มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS7 โดยมีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 3.34 มิลลิเมตร (คิดเป็น 3.71 เปอร์เซ็นต์)



รูปที่ 4.42 แสดงการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. ไอโซเลท PS1 โดยเชื้อ TISTR BCA002 (ก) , ไอโซเลท PS1 โดยเชื้อ TISTR BCALg2 (ข) และ ไอโซเลท PS7 โดยเชื้อ TISTR BCA002 (ค)

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบของเชื้อปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ด้วยวิธี T-streak

หมายเลข ไอโซเลท	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มิลลิเมตร)							
	PS1		PS3.2		PS6		PS7	
	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย
BKH 00431	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 00722	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 00723	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 01722	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 01724	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 01730	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 02030	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 222	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 232	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 241	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 422	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 431	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 521	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 731	-	-	-	-	-	-	-	-

***หมายเหตุ – ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

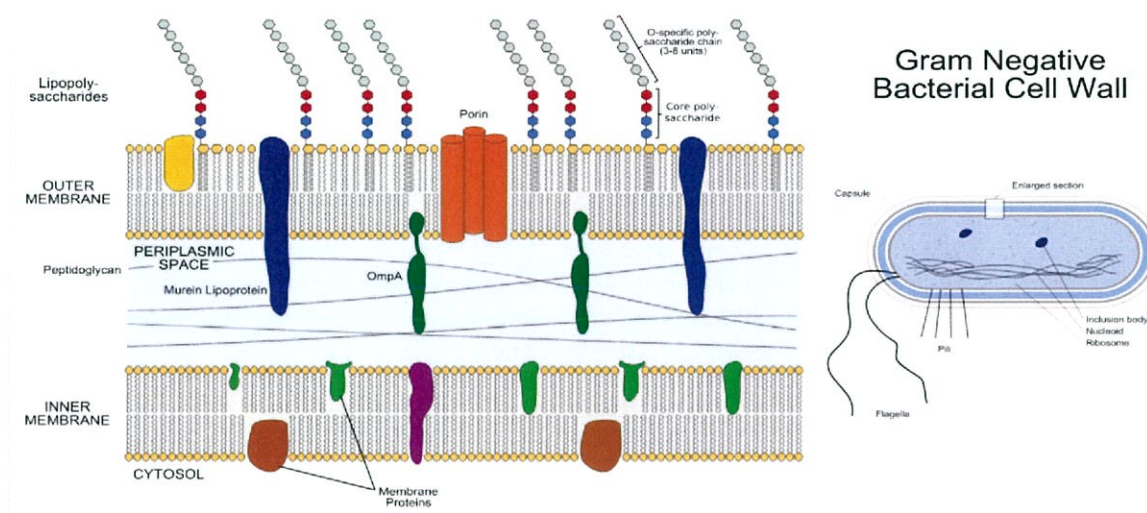
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบของเชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ด้วยวิธี T-streak (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มิลลิเมตร)							
	PS1		PS3.2		PS6		PS7	
	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย
BKH 1322	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 1731	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 1922	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 1941	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 2023	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 2024	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 2026	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 2032	-	-	-	-	-	-	-	-
TISTR 8411	-	-	-	-	-	-	-	-
TISTR 612	-	-	-	-	-	-	-	-
TISTR 412	-	-	-	-	-	-	-	-
TISTR p13A1	-	-	-	-	-	-	-	-
TISTR BCA002	7.30	6.67	-	-	-	-	3.67	3.00
TISTR BCA Lg2	5.00	4.30	-	-	-	-	-	-

***หมายเหตุ – ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จากงานวิจัยของภัทรารักษ์ และคณะ (2560) แอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากการคัดเลือกและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลิ้ง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ โดยทำการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพกับแบคทีเรียแกรมลบ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 พบว่าไอโซเลท BKH 01722 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 12.87 มิลลิเมตร จากการศึกษาการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. เชื้อแอคติโนมัยซีทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. เนื่องจาก *Pseudomonas* spp. จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบจะมีผนังเซลล์บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากกว่า ดังรูปที่ 4.43 คือ ด้านบนของ เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) จะมีองค์ประกอบที่เรียกว่า outer membrane องค์ประกอบของ outer membrane ส่วนใหญ่เป็นลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เกิดจากการเชื่อมกันระหว่าง O polysaccharide และ lipid A หรือเรียกอีกชื่อว่า O side chain มีความสำคัญในด้านโครงสร้างและหน้าที่ เพราะเป็นส่วนประกอบผิวเซลล์ทำหน้าที่ในการป้องกันและรักษาความดันภายในเซลล์ นอกจากนี้พบโปรตีนที่สำคัญคือ Porin ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการผ่านเข้าและออกของสารต่างๆที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย (ดร., 2543) และ periplasmic space เป็นช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในของแบคทีเรียแกรมลบซึ่ง periplasmic space เป็นแหล่งของเอนไซม์เบต้าแลคตาเมส (β -lactamase) ซึ่งสามารถทำลายสารปฏิชีวนะกลุ่มเบต้าแลคแทม (β -lactam) (Ximin and Jun, 2013)

สาเหตุที่แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย เช่น ampicillin และ penicillin-N มีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทมซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Waksman, 1961) ซึ่งในแบคทีเรียแกรมลบมีการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสทำให้เกิดการทำลายสารปฏิชีวนะ และจากการศึกษาแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* spp. อยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยเชื้อ *Bacillus* spp. สร้างสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่เช่น bacitracin, gramicidin S, polymyxin และ tyrotricidin ดังงานวิจัยของ Mirac *et. al.* (2005) ทำการคัดแยก *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินในแหล่งต่างๆ ในแองการาร์ห์ ประเทศตุรกี และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบและการดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas fluorescent*, *Pseudomonas aeruginosa* และพบว่า *Pseudomonas fluorescent* ดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Erythromycin, Vancomycin, Cephazolin, Penicillin G, Chloramphenicol, Sulbactam+Ampicillin, Cefoxitin, Oxacillin, Cefamandole และ Trimethoprim+Sulphamethoxazole



รูปที่ 4.43 แสดงรูปผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/cell-walls-of-prokaryotes/>

4.5.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp.

นำเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 28 ไอโซเลทมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. โดยเชื้อแอกติโนมัยซีท และโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยวิธี dual culture โดยทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในหน่วยเซนติเมตร เทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เป็น control

จากการทดสอบพบว่า มีจำนวนของเชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. ดังนี้

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Trichoderma* spp. ด้วยเชื้อปฏิปักษ์โดยใช้วิธี dual culture

หมายเลข ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition)									
	TM1	S.D.	TM3	S.D.	TM4	S.D.	TM5	S.D.	TM6	S.D.
BKH 00431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 00722	21.18	3.15	6.95	5.27	7.54	5.10	13.64	2.49	16.33	4.27
BKH 00723	18.82	3.63	5.27	0.83	15.70	0.97	23.27	3.83	32.52	7.34
BKH 01722	40.20	4.86	0.83	0.28	22.84	6.88	14.46	1.27	24.03	3.05
BKH 01724	27.84	3.20	0.28	1.69	20.48	1.10	17.27	1.28	7.46	9.31
BKH 01730	16.67	1.39	1.69	1.66	23.06	1.44	13.03	2.27	21.64	2.27
BKH 02030	16.47	0.96	1.66	15.81	28.83	2.29	16.07	0.84	13.39	2.50
BKH 222	29.02	2.37	15.81	1.27	29.82	1.21	20.05	2.11	-	-
BKH 232	18.24	0.83	1.27	0.28	11.34	8.05	43.87	0.33	37.24	7.94
BKH 241	14.90	1.21	0.28	7.23	14.51	1.68	11.31	3.45	14.17	0.42
BKH 422	26.47	2.92	7.23	0.00	15.90	0.70	61.17	0.13	20.08	0.78
BKH 431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BKH 521	-	-	-	-	-	-	22.59	4.44	24.75	11.96
BKH 731	-	-	6.10	6.95	9.12	7.76	-	-	-	-

***หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

- S.D. คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

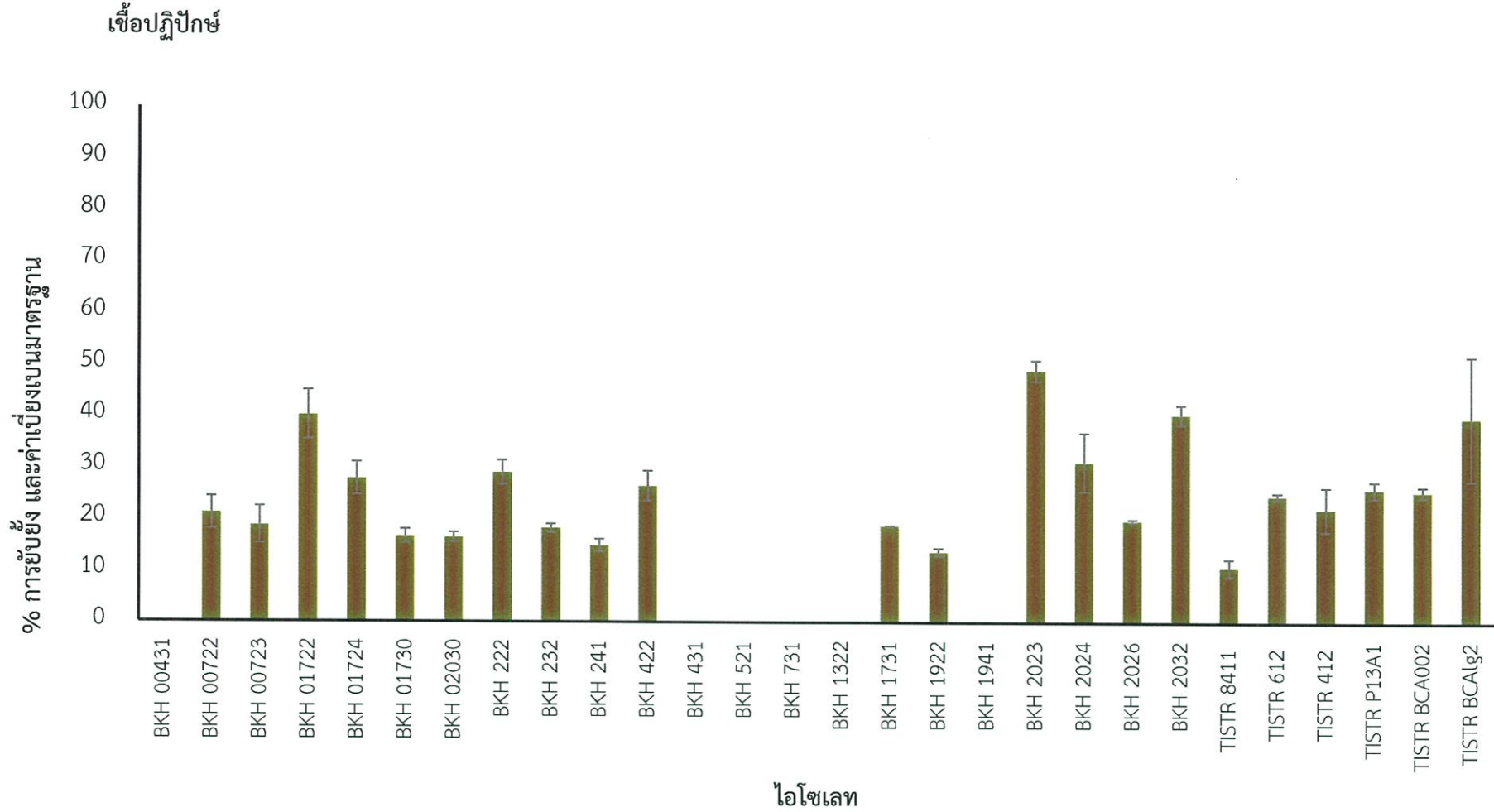
ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Trichoderma* spp. ด้วยเชื้อปฏิปักษ์โดยใช้วิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition)									
	TM1	S.D.	TM3	S.D.	TM4	S.D.	TM5	S.D.	TM6	S.D.
BKH 1322	-	-	-	-	1.19	3.80	1.79	0.73	-	-
BKH 1731	18.82	0.00	18.04	1.94	16.30	1.36	15.85	2.24	18.70	1.40
BKH 1922	13.72	0.73	10.98	7.00	0.59	0.00	6.05	2.32	9.46	4.75
BKH 1941	-	-	12.94	0.48	9.93	2.75	8.93	5.40	13.78	0.25
BKH 2023	49.02	2.00	52.35	7.39	45.24	1.90	42.59	2.45	48.98	5.44
BKH 2024	31.18	5.66	32.35	9.16	17.70	0.78	22.92	0.64	28.54	2.29
BKH 2026	19.80	0.28	22.16	2.42	34.78	5.79	13.43	2.07	22.05	1.09
BKH 2032	40.39	1.94	10.98	0.73	26.43	9.12	12.47	1.53	26.48	17.58
TISTR 8411	11.25	1.72	18.54	4.05	18.48	4.37	31.38	3.49	17.90	3.20
TISTR 612	23.75	0.63	28.36	0.23	29.20	1.64	41.59	5.73	28.30	1.24
TISTR 412	28.12	4.28	29.77	1.73	32.66	1.98	55.00	1.39	29.50	4.44
TISTR p13A1	28.12	1.60	32.30	6.44	30.63	0.46	47.56	5.87	25.68	2.36
TISTR BCA002	25.00	1.02	26.29	3.24	27.17	1.11	40.40	0.21	27.28	1.75
TISTR BCALg2	27.50	12.12	32.29	5.83	31.46	3.49	50.21	6.75	32.76	6.44

***หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ
 - S.D. คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

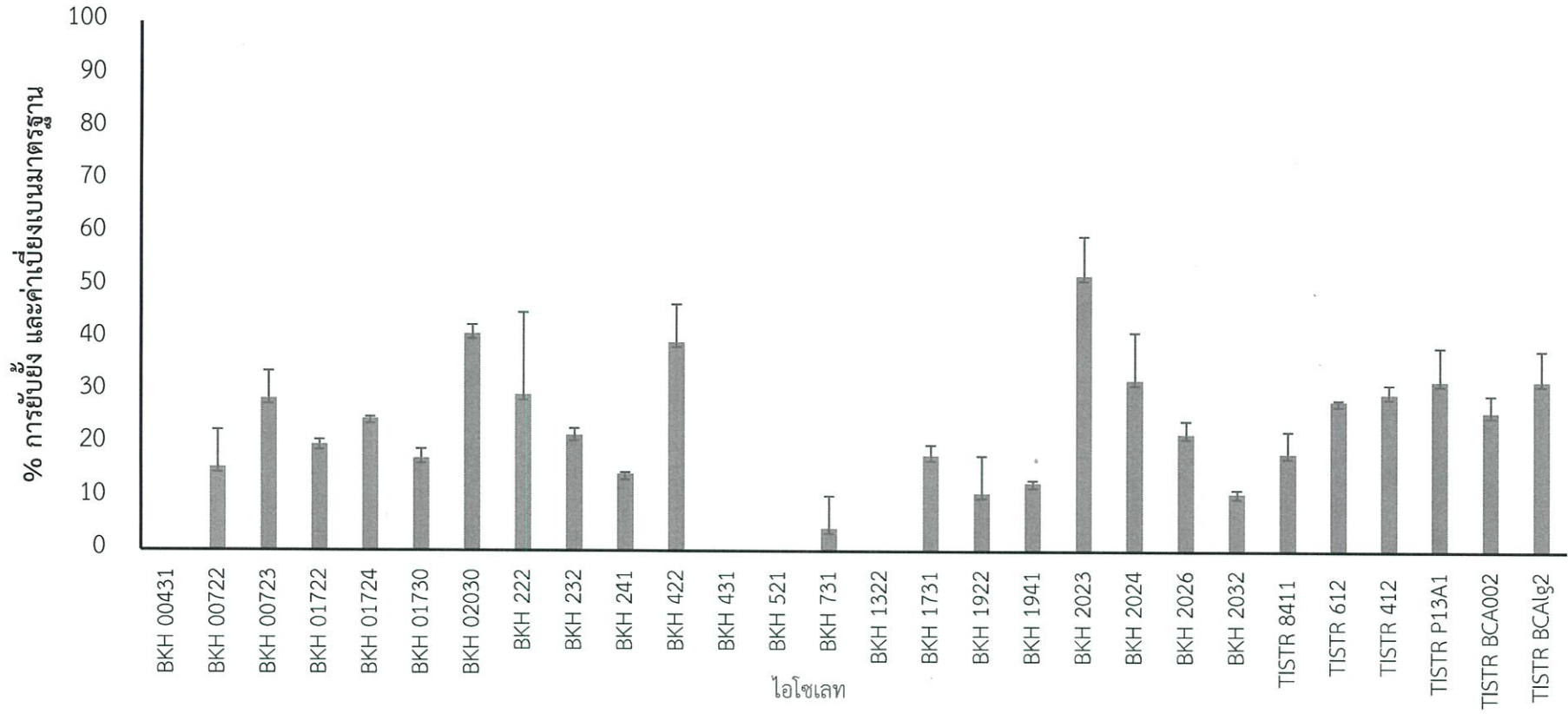
1. เชื้อปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Trichoderma* spp. TM1 ทั้งหมด 22 ไอโซเลทประกอบด้วย ไอโซเลท BKH 00722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 21.18 เปอร์เซ็นต์, BKH 00723 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 18.82 เปอร์เซ็นต์, BKH 01722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 40.20 เปอร์เซ็นต์, BKH 01724 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 27.84 เปอร์เซ็นต์, BKH 01730 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 16.67 เปอร์เซ็นต์, BKH 02030 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 16.47 เปอร์เซ็นต์, BKH 222 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 29.02 เปอร์เซ็นต์, BKH 232 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 18.24 เปอร์เซ็นต์, BKH 241 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 14.90 เปอร์เซ็นต์, BKH 422 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 26.47 เปอร์เซ็นต์, BKH 1731 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 18.82 เปอร์เซ็นต์, BKH 1922 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 13.72 เปอร์เซ็นต์, BKH 2023 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 49.02 เปอร์เซ็นต์, BKH 2024 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 31.18 เปอร์เซ็นต์, BKH 2026 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 19.80 เปอร์เซ็นต์, BKH 2032 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 40.39 เปอร์เซ็นต์, TISTR 8411 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 11.25 เปอร์เซ็นต์, TISTR 612 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 23.75 เปอร์เซ็นต์, TISTR 412 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 28.21 เปอร์เซ็นต์, TISTR p13A1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 28.12 เปอร์เซ็นต์, TISTR BCA002 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 25.00 เปอร์เซ็นต์ และ TISTR BCALg2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 27.50 เปอร์เซ็นต์

กราฟที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM1 โดย



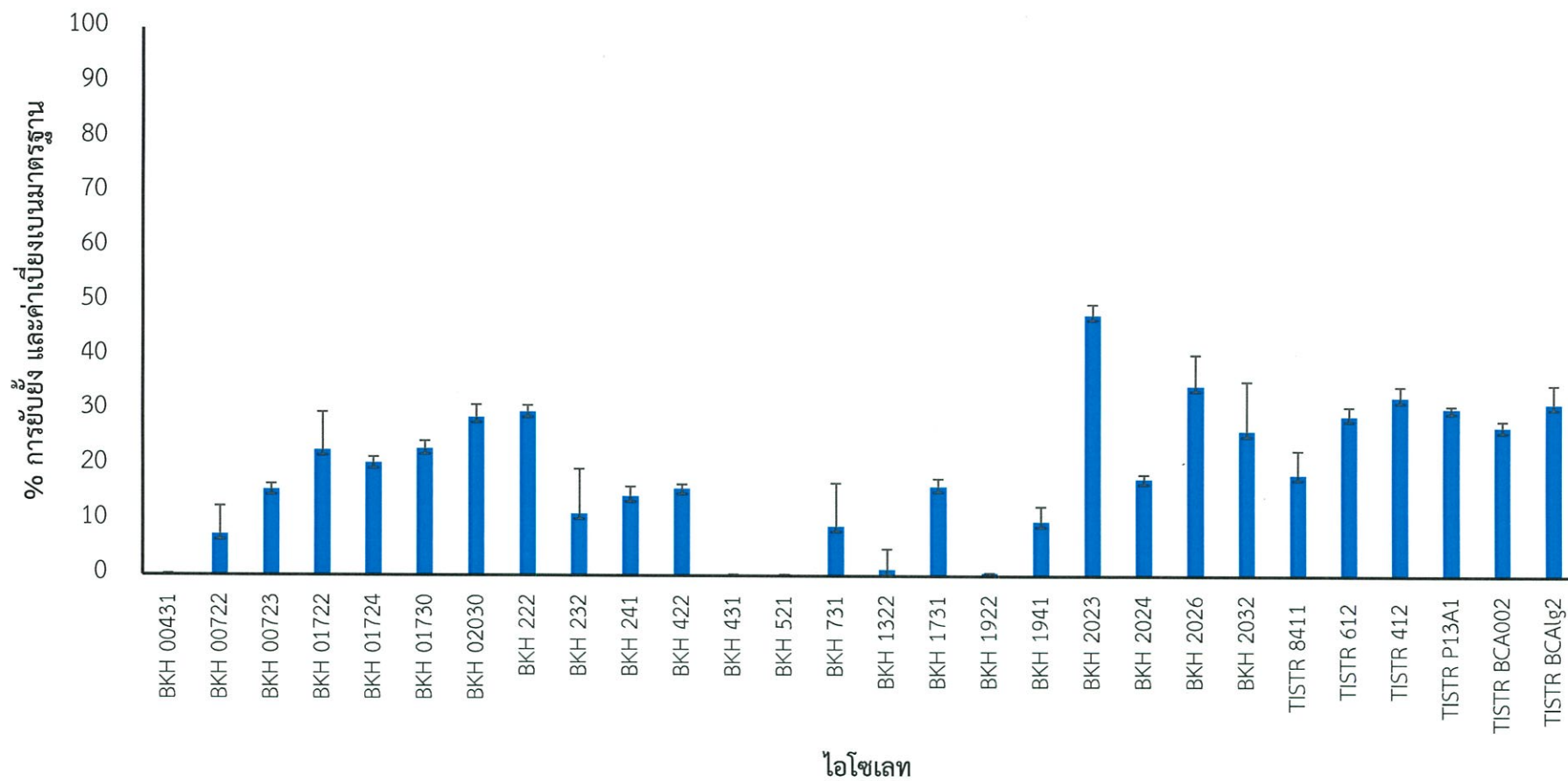
2. เชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Trichoderma* spp. TM3 ทั้งหมด 24 ไอโซเลทประกอบด้วย ไอโซเลท BKH 00722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 15.69 เปอร์เซ็นต์, BKH 00723 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 28.63 เปอร์เซ็นต์, BKH 01722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 20.00 เปอร์เซ็นต์, BKH 01724 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 24.90 เปอร์เซ็นต์, BKH 01730 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 17.45 เปอร์เซ็นต์, BKH 02030 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 41.18, BKH 222 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 29.41 เปอร์เซ็นต์, BKH 232 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 21.76 เปอร์เซ็นต์, BKH 241 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 14.51 เปอร์เซ็นต์, BKH 422 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 39.61 เปอร์เซ็นต์, BKH 731 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 4.31 เปอร์เซ็นต์, BKH 1731 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 18.04 เปอร์เซ็นต์, BKH 1922 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 10.98 เปอร์เซ็นต์, BKH 1941 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 12.94 เปอร์เซ็นต์, BKH 2023 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 52.35 เปอร์เซ็นต์, BKH 2024 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 32.35 เปอร์เซ็นต์, BKH 2026 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 22.16 เปอร์เซ็นต์, BKH 2032 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 10.98 เปอร์เซ็นต์, TISTR 8411 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 18.54 เปอร์เซ็นต์, TISTR 612 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 28.36 เปอร์เซ็นต์, TISTR 412 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 29.77 เปอร์เซ็นต์, TISTR p13A1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 32.30 เปอร์เซ็นต์, TISTR BCA002 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 26.29 เปอร์เซ็นต์ และ TISTR BCALg2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 32.29 เปอร์เซ็นต์

กราฟที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM3 โดยเชื้อปฏิปักษ์



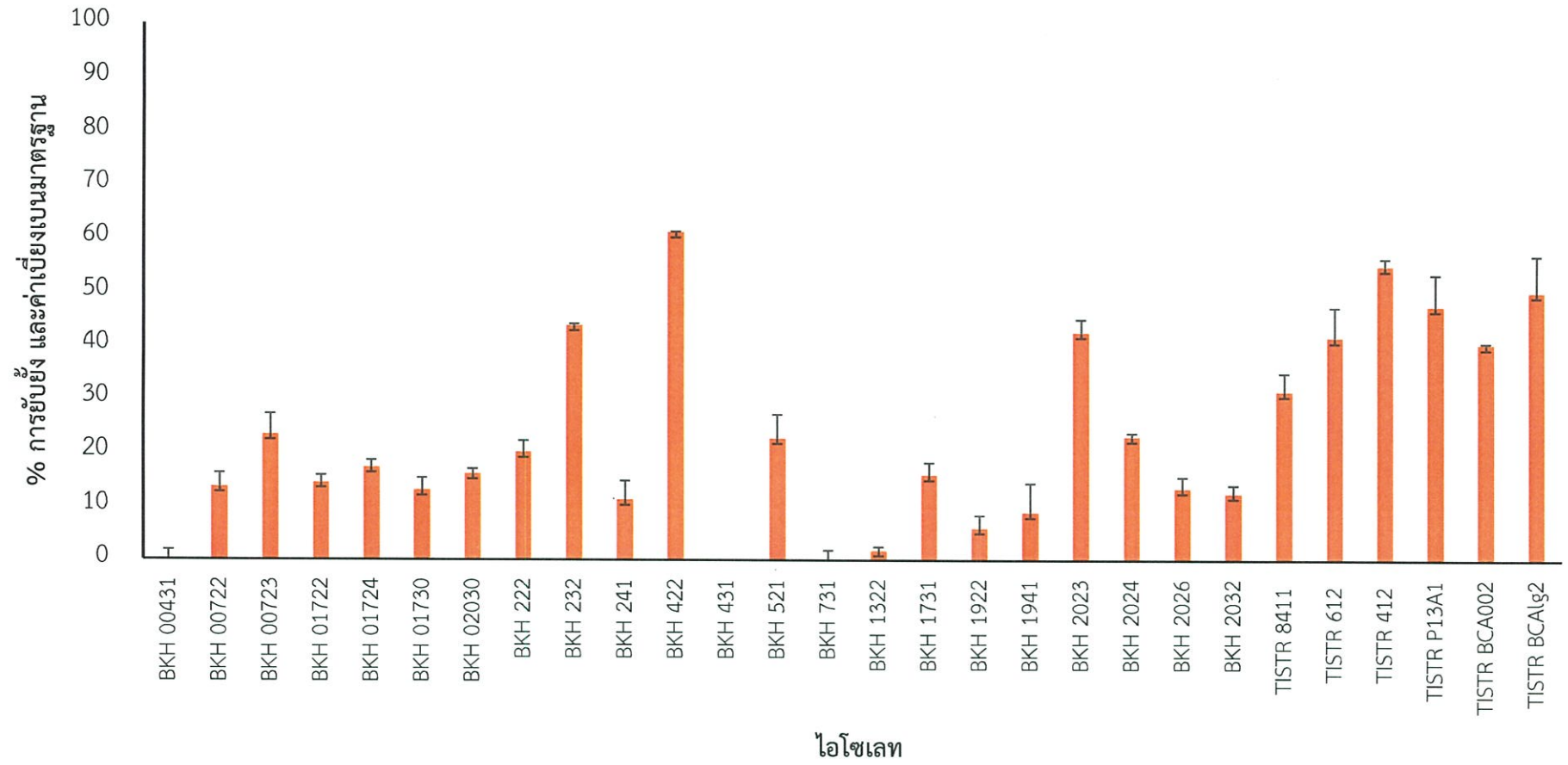
3. เชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Trichoderma* spp. TM4 ทั้งหมด 25 ไอโซเลทประกอบด้วย ไอโซเลท BKH 00722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 7.54 เปอร์เซ็นต์, BKH 00723 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 15.70 เปอร์เซ็นต์, BKH 01722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 22.84 เปอร์เซ็นต์, BKH 01724 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 20.48 เปอร์เซ็นต์, BKH 01730 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 23.06 เปอร์เซ็นต์, BKH 02030 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 28.83 เปอร์เซ็นต์, BKH 222 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 29.82 เปอร์เซ็นต์, BKH 232 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 11.34 เปอร์เซ็นต์, BKH 241 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 14.51 เปอร์เซ็นต์, BKH 422 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 15.90 เปอร์เซ็นต์, BKH 731 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 9.12 เปอร์เซ็นต์, BKH 1322 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 1.19 เปอร์เซ็นต์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ย 3.80, BKH 1731 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 16.30 เปอร์เซ็นต์, BKH 1941 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 9.93 เปอร์เซ็นต์, BKH 2023 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 45.24 เปอร์เซ็นต์, BKH 2024 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 17.70 เปอร์เซ็นต์, BKH 2026 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 34.78 เปอร์เซ็นต์, BKH 2032 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 26.43 เปอร์เซ็นต์, TISTR 8411 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 18.48 เปอร์เซ็นต์, TISTR 612 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 29.20 เปอร์เซ็นต์, TISTR 412 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 32.66 เปอร์เซ็นต์, TISTR p13A1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 30.63 เปอร์เซ็นต์, TISTR BCA002 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 27.17 เปอร์เซ็นต์ และ TISTR BCALg2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 31.46 เปอร์เซ็นต์

กราฟที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM4 โดยเชื้อปฏิปักษ์



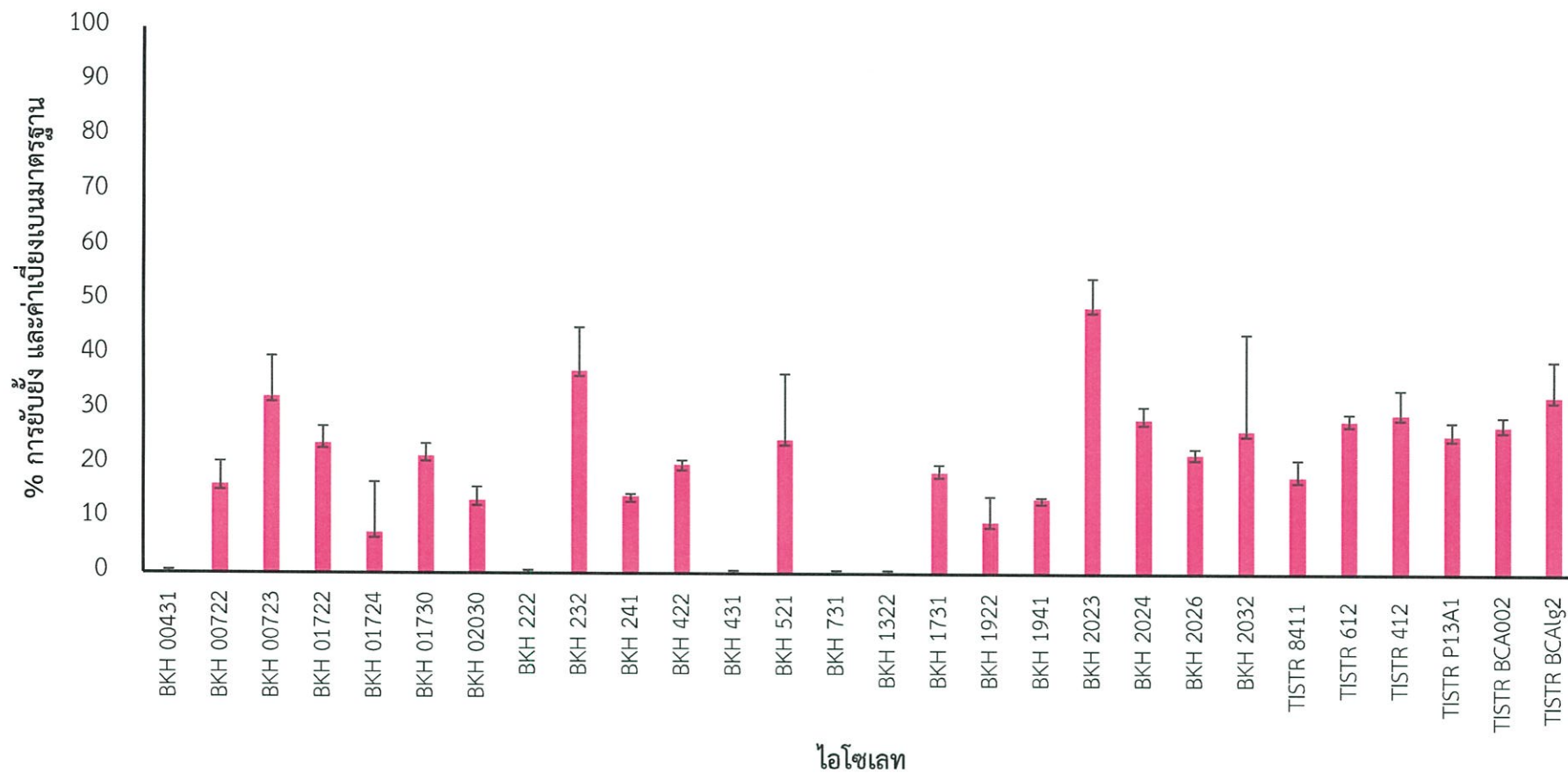
4. เชื้อปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Trichoderma* spp. TM5 ทั้งหมด 25 ไอโซเลทประกอบด้วย ไอโซเลท BKH 00722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 13.64 เปอร์เซ็นต์, BKH 00723 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 23.27 เปอร์เซ็นต์, BKH 01722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 14.46 เปอร์เซ็นต์, BKH 01724 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 17.27 เปอร์เซ็นต์, BKH 01730 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 13.03 เปอร์เซ็นต์, BKH 02030 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 16.07 เปอร์เซ็นต์, BKH 222 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 20.05 เปอร์เซ็นต์, BKH 232 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 43.87 เปอร์เซ็นต์, BKH 241 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 11.31 เปอร์เซ็นต์, BKH 422 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 61.17 เปอร์เซ็นต์, BKH 521 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 22.59 เปอร์เซ็นต์, BKH 1322 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 1.79 เปอร์เซ็นต์, BKH 1731 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 15.85 เปอร์เซ็นต์, BKH 1922 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 6.05 เปอร์เซ็นต์, BKH 1941 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 8.93 เปอร์เซ็นต์, BKH 2023 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 42.59 เปอร์เซ็นต์, BKH 2024 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 22.92 เปอร์เซ็นต์, BKH 2026 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 13.43 เปอร์เซ็นต์, BKH 2032 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 12.47 เปอร์เซ็นต์, TISTR 8411 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 31.38 เปอร์เซ็นต์, TISTR 612 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 41.59 เปอร์เซ็นต์, TISTR 412 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 55.00 เปอร์เซ็นต์, TISTR p13A1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 47.56 เปอร์เซ็นต์, TISTR BCA002 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 40.40 เปอร์เซ็นต์ และ TISTR BCALg2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 50.21 เปอร์เซ็นต์

กราฟที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM5 โดยเชื้อปฏิปักษ์

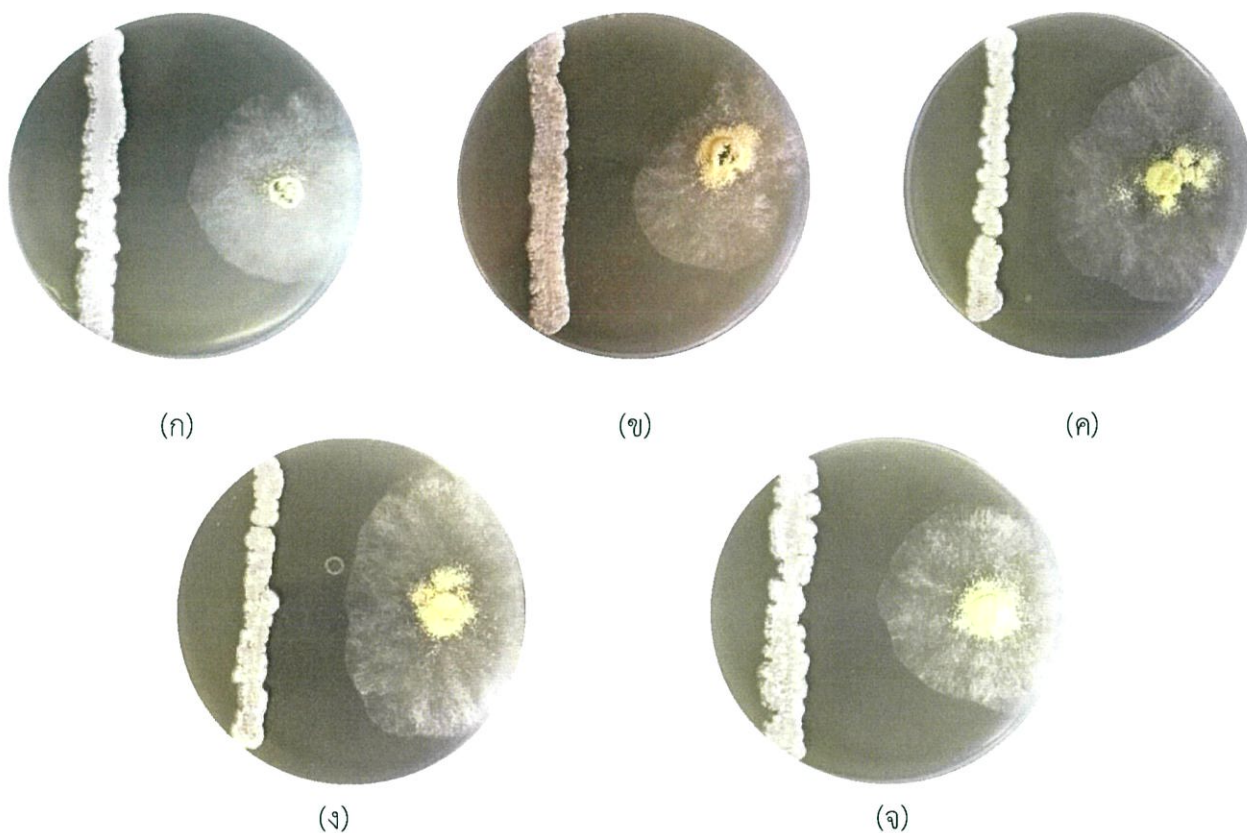


5. เชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Trichoderma* spp. TM6 ทั้งหมด 23 ไอโซเลทประกอบด้วย ไอโซเลท BKH 00722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 16.33 เปอร์เซ็นต์, BKH 00723 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 32.52 เปอร์เซ็นต์, BKH 01722 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 24.03 เปอร์เซ็นต์, BKH 01724 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 7.46 เปอร์เซ็นต์, BKH 01730 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 24.64 เปอร์เซ็นต์, BKH 02030 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 13.39 เปอร์เซ็นต์, BKH 232 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 37.24 เปอร์เซ็นต์, BKH 241 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 14.17 เปอร์เซ็นต์, BKH 422 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 20.08 เปอร์เซ็นต์, BKH 521 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 24.75 เปอร์เซ็นต์, BKH 1731 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 18.70 เปอร์เซ็นต์, BKH 1922 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 9.46 เปอร์เซ็นต์, BKH 1941 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 13.78 เปอร์เซ็นต์, BKH 2023 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 48.98 เปอร์เซ็นต์, BKH 2024 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 28.54 เปอร์เซ็นต์, BKH 2026 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 22.05 เปอร์เซ็นต์, BKH 2032 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 26.48 เปอร์เซ็นต์, TISTR 8411 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 17.90 เปอร์เซ็นต์, TISTR 612 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 28.30 เปอร์เซ็นต์, TISTR 412 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 29.50 เปอร์เซ็นต์, TISTR p13A1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 25.68 เปอร์เซ็นต์, TISTR BCA002 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 27.28 เปอร์เซ็นต์ และ TISTR BCALg2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 32.76 เปอร์เซ็นต์

กราฟที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM6 โดยเชื้อปฏิปักษ์



ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (ศุภลักษณ์, 2552) มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก ในช่วง 61-75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง ในช่วง 51-60 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ จากผลการศึกษากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. พบว่ามีเชื้อปฏิปักษ์ที่เป็นแอสคิตินัมยีสท์ ไอโซเลท BKH 2023 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.44 แสดงการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

Trichoderma spp. ไอโซเลท TM1 มีบริเวณยับยั้ง 49.02 เปอร์เซ็นต์ (ก) ไอโซเลท TM3 มีบริเวณยับยั้ง 52.35 เปอร์เซ็นต์ (ข) ไอโซเลท TM4 มีบริเวณยับยั้ง 45.24 เปอร์เซ็นต์ (ค) ไอโซเลท TM5 มีบริเวณยับยั้ง 42.59 เปอร์เซ็นต์ (ง) และ ไอโซเลท TM6 มีบริเวณยับยั้ง 48.98 เปอร์เซ็นต์ (จ) โดยเชื้อแอสคิตินัมยีสท์ ไอโซเลท BKH 2023

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ดจากมารยาทฟาร์ม อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. ได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลทที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ และ เชื้อ *Trichoderma* spp. ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท และหาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคจากเชื้อปฏิปักษ์ทั้งหมด 28 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อแอกติโนมัยซีท 22 ไอโซเลท และแบคทีเรียปฏิปักษ์ 6 ไอโซเลท ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนดอกเห็ด พบว่าทำให้เกิดดอกเห็ดเน่าในระยะเวลา 3 วัน

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบลักษณะทางจีโนมไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของเชื้อ *Pseudomonas* spp. พบว่า ไอโซเลท PS1, PS6 และ PS7 มีมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas entomophila* และ ไอโซเลท PS3.2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas aeruginosa*

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อ *Trichoderma* spp. พบว่า ไอโซเลท TM1, TM4 และ TM5 มีความคล้ายคลึงกับ เชื้อ *Trichoderma viride* และ ไอโซเลท TM3 และ TM6 มีความคล้ายคลึงกับ เชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* เมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางจีโนมไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการพบว่า ไอโซเลท TM4 และ TM5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ เชื้อ *Trichoderma viride* ไอโซเลท TM3 และ TM6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ เชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* ไอโซเลท TM1 ไม่สามารถจัดจำแนกสปีชีส์ได้

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. พบว่ามีเชื้อ TISTR BCALg2 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ยคิดเป็น 5.17 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งเชื้อไอโซเลท PS1 และ TISTR BCA002 7.67 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งเชื้อไอโซเลท PS1 และ TISTR BCA002 3.71 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งเชื้อไอโซเลท PS7

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. โดยเชื้อปฏิปักษ์ พบว่าแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BKH 2023 มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุด 52.35 เปอร์เซ็นต์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Pseudomonas entomophila* ยังไม่เคยมีการรายงานว่าก่อโรคในพืชหรือในเห็ด ควรศึกษารายละเอียดของเชื้อนี้เพิ่มเติม เพื่อให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์มากขึ้น และสามารถนำประโยชน์จากการวิจัยมาประยุกต์ใช้ได้มากขึ้น

5.2.2 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทดสอบการยับยั้งเฉพาะบนอาหารแข็ง ควรตรวจสอบการยับยั้งโดยการเลี้ยงจากอาหารเหลว เนื่องจากการสร้างสารทุติยภูมิบนอาหารแข็งและอาหารเหลวอยู่ในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน และนำส่วนน้ำหมักและเซลล์มาทดสอบการยับยั้ง เพื่อทราบว่าสารทุติยภูมิอยู่ในส่วนใด

5.2.3 ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัย สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท เพื่อที่จะทำให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิในปริมาณที่มากขึ้น

5.2.4 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับสกุลและสปีชีส์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

- คณิงกานต์ กลั่นบุศย์. 2559. เอกสารประกอบวิชาปฏิบัติการสรีรวิทยาของจุลินทรีย์. คณะ
วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กทม.
- ดร. สระงาม. 2543. “ผลของการเสริมสารโมเนนซินต่อผลผลิตโคนมในช่วงต้นระยะให้นม.” ปรินญา
นิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- ดาราวดี วงษ์ชาติ. 2558. “ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *Bacillus* สูตร ENCAPSULATE
ในการควบคุมโรคแอนแทรกซ์ของพริก” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชา
พืชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- พิมพ์กานต์ อร่ามพงษ์พันธ์. 2544. เอกสารความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเห็ด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา.
กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ สุดารัตน์ โชคแสน. 2552. “ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces*
สายพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคพืชที่
สำคัญ” สาขาวิชาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะ
เกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- พรศิลป์ สีเผือก และ วุฒิชัย สีเผือก. 2551. “ผลของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *Bacillus* sp. ต่อการควบคุม
โรคราเขียว (*Trichoderma harzianum*) ของเห็ดหูหนู (*Auricularia polytricha* (Mont.)
Sacc.)” ว.วิทย. กษ. 39(3) (พิเศษ): 205-208
- ภัทราภรณ์ หะวนิช ศิริวรรณ บุญชัย และศุภรดา แก้วอร่าม. 2560. “การคัดเลือกและฤทธิ์ยับยั้ง
ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลิ้ง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัด
ราชบุรี” ปรินญาวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ลักขมิ ศุภระกาญจนะ. 2556. “การคัดแยกและการศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิต
เอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ.” ปรินญาวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตมหาวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- วิยะดา ชันอาสา และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2552. “ความหลากหลายทางชีวภาพของ
fluorescent *Pseudomonas* สาเหตุโรคพืช.” การประชุมวิชาการอรัทขาพืชแห่งชาติ
ครั้งที่ 9. อุบลราชธานี: โรงแรมสุนีย์ แกรนด์
- ศุภลักษณ์ ยาเจริญ. (2552). “การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัคษ์ที่เหมาะสมเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรค
พืชในดิน.” วิทยานิพนธ์ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.สกลนคร. 2555. คู่มือการเพาะ
เห็ดเศรษฐกิจและเห็ดพื้นเมือง. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: บริษัท มูฟเม้น์ เจน ทรี จำกัด

- ศิริพรรณ สุขขัง. 2560. การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี. [Online]. Available: <http://biology.ipst.ac.th/?p=3341>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 พ.ค. 61
- สุนัดดา โยมญาติ. 2557. ราเมือก (SLIME MOLD). [Online]. Available: <http://biology.ipst.ac.th/?p=983> เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 ก.พ. 61
- สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ. 2544. เอกสารการเก็บรักษาเชื้อเห็ด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- อภิรัชต์ สมฤทธิ. 2544. เอกสารการปนเปื้อนของเชื้อเห็ด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- อภิรัชต์ สมฤทธิ อัจฉรา พยัพพานนท์ ธารทิพย์ ภาสบุตร และ สุนิรัตน์ สิมะเดื่อ. 2552. “สาเหตุและการแพร่กระจายของราเมือกที่ทำความเสียหายในการเพาะเห็ดถั่งของประเทศไทย.” กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- Aditi Agarwal and Nupur Mathur. 2016. “Thermophilic actinomycetes are potential source of novel bioactive compounds.” *ejpmr* 3(2): 130-138
- Ahsanur Rahman, Most. Ferdousi Begum, Matiur Rahman, M. A. Bari, G. N. M. Llias, M. Firoz Alam. 2009. “Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste.” *Turk J Biol* 35: 183-194
- Anonymous. 2018. Building Bodies from Slime: Plasmodia [Online]. Available http://cronodon.com/BioTech/Plasmodium_SM.html (สืบค้นวันที่ 9 พฤษภาคม 2560)
- Anonymous. 2018. Structure of Gram-negative cell wall [Online]. Available <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/cell-walls-of-prokaryotes/> (สืบค้นวันที่ 9 พฤษภาคม 2560)
- Atac Uzel, E. Esin Hameş Kocabaş, Erdal Bedir. 2009. “Prevalence of *Thermoactinomyces thalpophilus* and *T. Sacchari* strains with biotechnological potential at hot springs and soils from West Anatolia in Turkey.” *Turk J Biol* 35:195-202
- Baldauf, L.S. and Doolittle, W. F. 1997. Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (22):12007–12012.
- D. A. Seaby. 1996. “Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production.” *Plant Pathology* (1996) 45, 905-912

- Gary J. Samuels. 1996. "Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus." *Mycol. Res.* 100 (8): 923-935
- Gary J. Samuels and Prakash K. Hebbar. 2015. **Trichoderma: Identification and Agricultural Applications.** American Phytopathological Society
- Goszczynska, T., Moloto, V. M., Venter, S. N. and Coutinho, T. A. (2006). "Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in South Africa." *Seed Sci & Tech* 34, 677-690
- J. R. Van Der Meer. 1998. "Evolution of a Pathway for Chlorobenzene Metabolism Leads to Natural Attenuation in Contaminated Groundwater." *Applied and Environmental Microbiology*, Nov. 1998, p. 4185-4193
- Kannan Neethu, M. Rubeena, S. Sajith, S. Sreedevi, Prakasan Priji, K. N. Unni, M. K. Sarath Josh, V. N. Jisha, S. Pradeep, Sailas Benjamin. 2012. "A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities." *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012, 3, 1160-1166
- Kathleen Park Talaro and Barry Chess. 2007. **Foundations in Microbiology.** 9th edition. McGraw Hill Higher Education
- Klanbut, K. 2013. "The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomyces*." A thesis for the degree of Doctor of philosophy. University of Strathclyde, Glasgow, UK
- Ljiljana Santric, Ivana Potocnik, Ljiljana Radivojevic, Jelena Gajic Umiljendic, Emil Rekanovic, Bojan Duduk and Svetlana Milijasevic-Marci. 2018. "Impact of a native *Streptomyces flavovirens* from mushroom compost on green mold control and yield of *Agaricus bisporus*." *Journal of Environmental Science And Health*, Part B2018, VOL. 0, NO. 0, 1-8
- Mirac Yilmaza, Haluk Sorana and Yavuz Beyatli. 2005. "Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil." *Microbiological Research* 161 (2006) 127-131
- Mohamed A. Abou-Zeid. 2012. "Pathogenic variation in isolates of *Pseudomonas* causing the brown blotch of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*." *Braz J Microbiol.* 2012 Jul-Sep; 43(3): 1137-1146.

- Morgan, J. A., N. F. Bellingham, C. Winstanley, M. A. Ousley, C. A. Hart, and J. R. Saunders. 1999. "Comparison of flagellin genes from clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates." *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1175-1179
- Mundie, D.A. 1995. The NBS/ISCC Color System/ David A. Mundie Pittsburgh. [Online]. Available <http://www.anthus.com/Colors/Cent.html>. (สืบค้นวันที่ 15 พฤษภาคม 2560)
- Mwangi. R. W., Wagara. I. N. and Kariuki. S. T. 2015. "Biocontrol of Mushroom Fungal Pathogens and Contaminants using *Bacillus amyloliquefaciens*." *Egerton J. Sci. & Technol.* Volume 15: 93-108
- Naif Abdullah Al-Dhabi, Galal Ali Esmail, Veeramuthu Duraipandiyan, Mariadhas Valan Arasu, Mounir M. Salem-Bekhit. 2016. "Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia." *Extremophiles* 20: 79-90
- Nurettin Sahin. 2004. "Antimicrobial activity of *Streptomyces* species against mushroom blotch disease pathogen." *J. Basic Microbiol.* 45 (2005) 1, 64-71
- Pani, B K. 2011. "Natural incidence of some weed fungi and their effect on yield during milky Mushroom calocybe indica cultivation." *Biosci Disco.* 2:159-161.
- Phongsopitanun, W. Suwanborirux, K. and Tanasupawat, S. 2014. "Identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from Thai mangrove sediment." *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences.* 38(1): 1-56.
- S. Mahadtanapuk, W. Teraarusiri, W. Nanakorn, L.D. Yu, P. Thongkumkoon, S.Anuntalabhochai. 2014. "A novel ion-beam-mutation effect application in identification of gene involved in bacterial antagonism to fungal infection of ornamental crops." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 326: 209-213
- Salah H. Salem, Hussein H. El-Sheikh, Mohamed M. Naguib and Yehia A. Heikal. 2015. "Potential antimicrobial activity of the antagonistic *Bacillus* strains to *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences:* 2349-2759
- Shafiquzzaman Siddiquee. 2017. **Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions.** Springer International Publishing

- Shaiesta Shah, Sahera Nasreen and N.A. Munshi. 2011. "Evaluation of Some Botanicals in Controlling Green Mold (*Trichoderma harzianum*) Disease in Oyster Mushroom Cultivation." *International Journal of Botany* 7(3): 209-215
- Shigeo Tojo, Yukinori Tanaka and Kozo Ochi. 2015. "Activation of Antibiotic Production in *Bacillus* spp. by Cumulative Drug Resistance Mutations." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, December 2015, Volume 59, Number 12: 7799-7804
- Sharma, R.K. and D. Bahukhandi. 2003. "Studies on shelf life of white button mushroom." *Ann Pl Protec Sci* 11: 333-336
- Sharma S. R., Satish Kumar and V.P. Sharma. 2007. "Diseases and Competitor Moulds of Mushrooms and their Management." *National Research Centre for Mushroom (ICAR) Chambaghat, Solan – 173 213 (HP), India*
- Tanaka, Y. and Omura, S., 1993. "Agroactive compounds of microbial origin." *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 57–87.
- Waksman, S. A. (1961). *The Actinomycetes*, vol. 2, Classification, Identification and Description o Sharma, R.K. and D. Bahukhandi. 2003.
- Williams, R.H. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. volume4. Baltimore : Williams and Wilkins
- Ximin Zeng and Jun Lin. 2013. "Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria." *Frontiers in microbiology*. Vol4. Article 128
- Yan-Yan Dua, Hong Ming, Lei Dong, Yi-Rui Yin, Yi Zhang, En-Min Zhou, Lan Liu, Guo-Xing Nie and Wen-Jun Li. 2014. "*Streptomyces calidiresistens* sp. nov., isolated from a hot spring sediment." *Antonie van Leeuwenhoek* 106: 189–196

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร อาหารจะถูกนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. Nutrient agar (NA)

Peptone	5.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

2. International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) หรือ Yeast extract-malt extract agar (Atlas, 1993)

Malt extract	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.3

3. Modified Nutrient Glucose Agar (MNGA) (Arasu, M. V., 2013)

Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Dry yeast	3.0	กรัม
NaCl	3.0	กรัม
CaCO ₃	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

4. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Starch	4.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

5. Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC หรือ TZC)

Casamino acid casein hydrolysate	1.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม

Agar 15.0 กรัม
 pH 6.5 – 7.0
 หลังจากทำการฆ่าเชื้อ เติม 1% 2,3,5 Triphenyl Tetrazolium 5 มิลลิลิตร

6. King's medium B (KB)

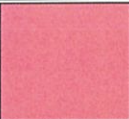

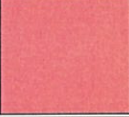
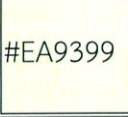
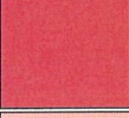
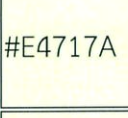


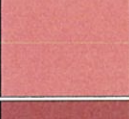


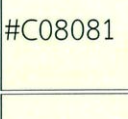
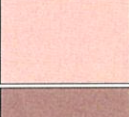
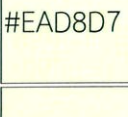
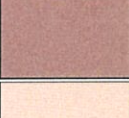
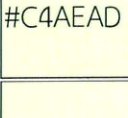

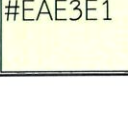
Proteose Peptone 20.0 กรัม
 K_2HPO_4 1.50 กรัม
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.50 กรัม
 Glycerol 10.0 มิลลิลิตร
 Agar 15.0 กรัม

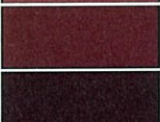

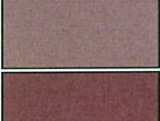

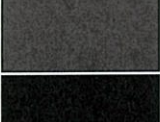
7. Yeast extract – Malt extract agar (YEME) (Klanbut, 2013)



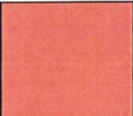

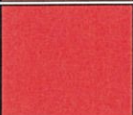

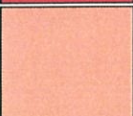
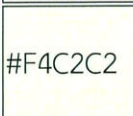
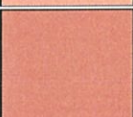

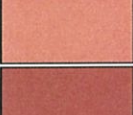

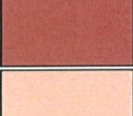
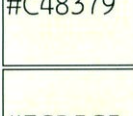
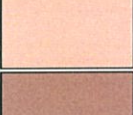
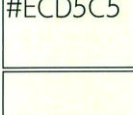

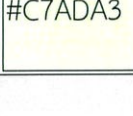
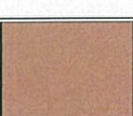
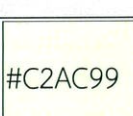

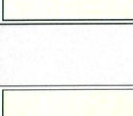

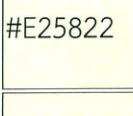
Yeast extract 3.0 กรัม
 Malt extract 3.0 กรัม
 Peptone 5.0 กรัม
 Glucose 10.0 กรัม
 Agar 20.0 กรัม

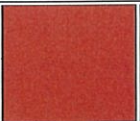
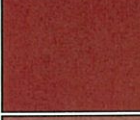
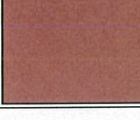
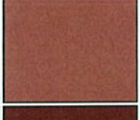
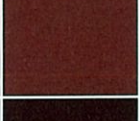

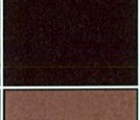


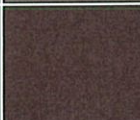
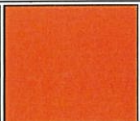
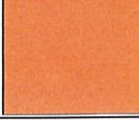
ภาคผนวก ข
 กระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)
 (Mundie, 1995)

ตารางที่ ค แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)








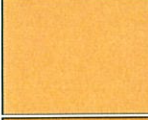


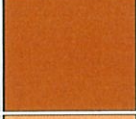
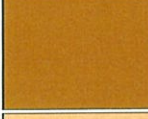

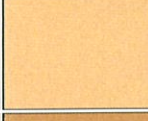
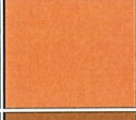
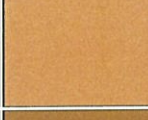
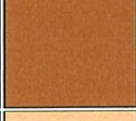
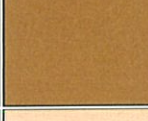
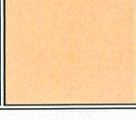
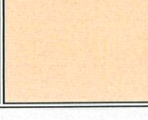

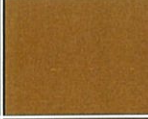

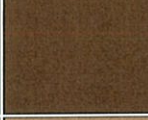
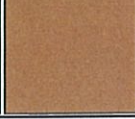
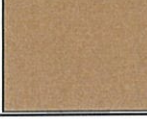
Abbreviation, number, color	Munsell (chart span) centroid	Mundie RGB	Mundie Swatch	convert from Munsell	Foster Swatch
Pink					
v.Pk 1 Vivid Pink	(9RP-1R,1-4R) 1R8/13 OUT	#FF7E93		#FFB5BA	
s.Pk 2 Strong Pink	(9RP-1R,1-4R) 1.2R6.9/8.2	#FD7B7C		#EA9399	
deep Pk 3 Deep Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.1R6/11.1	#F3545E		#E4717A	
l.Pk 4 Light Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.6R8.5/4	#FFBCAD		#F9CCCA	
m.Pk 5 Moderate Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.8R7.2/5.3	#EE9086		#DEA5A4	
d.Pk 6 Dark Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.7R5.9/6.1	#C76864		#C08081	
p.Pk 7 Pale Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.0R8.7/2.1	#FFCBBB		#EAD8D7	
gy.Pk 8 Grayish Pink	(9RP-1R,1R-6R) 2.6R7.2/2.3	#CF9B8F		#C4AEAD	
pkWhite 9 Pinkish White	(1-9R,9R-1YR,1- 7YR) 5.8R9/0.8	#F9DBC8		#EAE3E1	

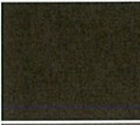


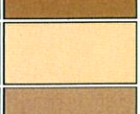
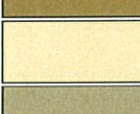

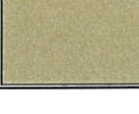
pkGy 10 Pinkish Gray	(1-9R,9R-1YR,1-7YR) 9.8R7.4/1	#C8A696		#C1B6B3	
Red					
v.R 11 Vivid Red	(1-9R) 5R3.9/15.4 OUT	#C10020		#BE0032	
s.R 12 Strong Red	(1-7R) 4R4.4/12.1	#BF2233		#BC3F4A	
deep R 13 Deep Red	(1-9R) 5.1R2.8/10.1	#7B001C		#841B2D	
v.deep R 14 Very Deep Red	(1-9R) 6.5R1.7/8.4	#4F0014		#5C0923	
m.R 15 Moderate Red	(1-7R) 3.8R4.4/9.1	#AB343A		#AB4E52	
d.R 16 Dark Red	(1-9R) 4.0R2.8/6.8	#681C23		#722F37	
v.d.R 17 Very Dark Red	(1-6R) 2R1.2/4.8	#320A18		#3F1728	
l.gy.R 18 Light Grayish Red	(1-8R) 5.3R5.9/3.5	#B17267		#AD8884	
gy.R 19 Grayish Red	(1-8R) 4R4.4/4.8	#8C4743		#905D5D	
d.gy.R 20 Dark Grayish Red	(1-6R) 2.9R2.7/2.1	#482A2A		#543D3F	
Blackish R 21 Blackish Red	(1-6R) 3.9R0.8/1.7 OUT	#1F0E11		#2E1D21	
rGy 22 Reddish Gray	(1-9R,9R-1YR,1-2YR) 7R5.4/1.3	#8B6C62		#8F817F	
d.rGy 23 Dark Reddish Gray	(1-9R,9R-1YR) 6R3.4/1	#523C36		#5C504F	
rBlack 24 Reddish Black	(1-9R,9R-1YR) 2R0.9/0.9 OUT	#1E1112		#282022	

Yellowish Pink					
v.yPk 25 Vivid Yellowish Pink	(4-9R,9R-1YR,1-2YR) 8R8/13 OUT	#FF845C		#FFB7A5	
s.yPk 26 Strong Yellowish Pink	(4-9R,9R-1YR,1-2YR) 8.4R7/9.5	#FF7A5C		#F99379	
deep yPk 27 Deep Yellowish Pink	(4-7R) 5.5R5.8/12.1	#F64A46		#E66761	
l.yPk 28 Light Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-7YR) 1.9YR8.2/4.6	#FFB28B		#F4C2C2	
m.yPk 29 Moderate Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-7YR) 0.7YR7.2/4.9	#EE9374		#D9A6A9	
d.yPk 30 Dark Yellowish Pink	(6-8R) 7R6/6.1	#CC6C5C		#C48379	
p.yPk 31 Pale Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-8YR) 4.2YR8.6/2.2	#FFC8A8		#ECD5C5	
gy.yPk 32 Grayish Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-5YR) 1.3YR7.2/2.4	#D39B85		#C7ADA3	
Brownish Pink					
brPk 33 Brownish Pink	(5-8YR) 7YR7.1/2.3	#CD9A7B		#C2AC99	
Reddish Orange					
v.rO 34 Vivid Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR) 9.8R5.4/14.5	#F13A13		#E25822	
s.rO 35 Strong Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR) 9.3R5.4/12.2	#FFB961 see #70		#D9603B	
deep rO 36 Deep Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR) 9.2R3.9/12.1	#A91D11		#AA381E	

m.rO 37 Moderate Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1- 2YR) 9.3R5.5/9.2	#D35339		#CB6D51	
d.rO 38 Dark Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1- 2YR) 9.3R4/9.1	#9B2F1F		#9E4732	
gy.rO 39 Grayish Reddish Orange	(8-9R,9R-1YR,1- 3YR) 0.4YR5.4/6.2	#B85D43		#B4745E	
Reddish Brown					
s.rBr 40 Strong Reddish Brown	(9R-1YR,1-2YR) 0.3YR3.1/9.9	#7F180D		#882D17	
deep rBr 41 Deep Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1- 2YR) 1.6YR1.5/8.3	#490005		#56070C	
l.rBr 42 Light Reddish Brown	(8-9R,9R-1YR,1- 3YR) 0.5YR5.5/4.1	#AA6651		#A87C6D	
m.rBr 43 Moderate Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1- 3YR) 9R3.4/5.2	#712F26		#79443B	
d.rBr 44 Dark Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1- 3YR) 9.6R1.3/3.6	#321011		#3E1D1E	
l.gy.rBr 45 Light Grayish Reddish Brown	(1-5YR) 2.9YR5.4/2.3	#966A57		#977F73	
gy.rBr 46 Grayish Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1- 3YR) 9R3.4/2.4	#5E3830		#674C47	
d.gy.rBr 47 Dark Grayish Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1- 3YR) 9R2/2	#371F1C		#43302E	
Orange					
v.O 48 Vivid Orange	(2-7YR) 4.1YR6.5/15 OUT	#FF6800		#F38400	
brill.O 49 Brilliant Orange	(2-7YR) 4YR9/12 OUT	#FFB841		#FD943F	








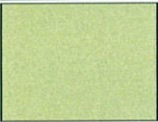


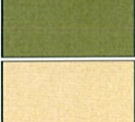
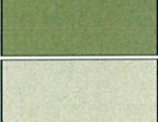







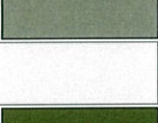


s.O 50 Strong Orange	(2-7YR) 4.3YR6.5/12.2	#FF6F1A		#ED872D	
deep O 51 Deep Orange	(2-7YR) 4.1YR5.1/11.3	#C34D0A		#BE6516	
l.O 52 Light Orange	(2-7YR) 4.8YR7.8/7.2	#FFA161		#FAB57F	
m.O 53 Moderate Orange	(2-7YR) 4.6YR6.5/8.2	#E8793E		#D99058	
Brownish Orange					
brO 54 Brownish Orange	(2-7YR) 4.1YR5/8	#B15124		#AE6938	
Brown					
s.Br 55 Strong Brown	(2-8YR) 4.6YR3.5/7.6	#753313		#80461B	
deep Br 56 Deep Brown	(2-8YR) 5.6YR2.4/5.2	#4D220E		#593319	
l.Br 57 Light Brown	(3-8YR) 5.4YR5.4/4.8	#A86540		#A67B5B	
m.Br 58 Moderate Brown	(3-8YR) 5.6YR3.5/3.9	#673923		#6F4E37	
d.Br 59 Dark Brown	(3-8YR) 5.3YR1.6/3.4	#35170C		#422518	
l.gy.Br 60 Light Grayish Brown	(5-8YR) 6.4YR5.4/2.2	#946B54		#958070	
gy.Br 61 Grayish Brown	(3-8YR) 5.5YR3.5/1.8	#5A3D30		#635147	
d.gy.Br 62 Dark Grayish Brown	(3-8YR) 5.5YR2/1.5	#32221A		#3E322C	
l.brGy 63 Light Brownish Gray	(2-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 7YR5.4/1.2	#8B6D5C		#8E8279	

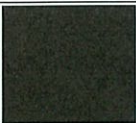
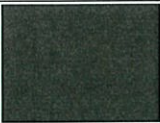













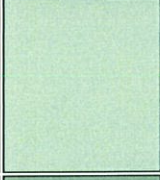






brGy 64 Brownish Gray	(1-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 5.65R3.4/0.9	#503D33		#5B504F	
brBlack 65 Brownish Black	(1-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 7.8YR0.6/0.9 OUT	#140F0B		#28201C	
Orange Yellow					
v.OY 66 Vivid Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.6YR7.3/15.2 OUT	#FF8E00		#F6A600	
brill.OY 67 Brilliant Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 0.1Y8.1/10.5 OUT	#FFB02E		#FFC14F	
s.OY 68 Strong Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.1YR7.1/11.6	#FF8E0D		#EAA221	
deep OY 69 Deep Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.6YR6/12.1 OUT	#D76E00		#C98500	
l.OY 70 Light Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.4YR8.3/6.8	#FFB961 see #35		#FBC97F	
m.OY 71 Moderate Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.7YR7.2/8.3	#F7943C		#E3A857	
d.OY 72 Dark Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.3YR6/7.9	#C37629		#BE8A3D	
p.OY 73 Pale Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.2YR8.7/4.4	#FFCA86		#FAD6A5	
Yellowish Brown					
s.yBr 74 Strong Yellowish Brown	(7-8YR,8YR-1Y) 8.8YR4.6/8.5	#95500C		#996515	
deep yBr 75 Deep Yellowish Brown	(8YR-1Y) 8.8YR3.1/5	#593315		#654522	
l.yBr 76 Light Yellowish Brown	(7-8YR,8YR-1Y) 8.7YR6.5/5	#BB8B54		#C19A6B	

m.yBr 77 Moderate Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.5YR4.4/3.9	#7D512D		#826644	
d.yBr 78 Dark Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.4YR2.3/3.3	#3F2512		#4B3621	
l.gy.yBr 79 Light Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.7YR6.4/2.5	#B48764		#AE9B82	
gy.yBr 80 Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.5YR4.6/2.1	#785840		#7E6D5A	
d.gy.yBr 81 Dark Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 8.8YR2.5/1.6	#3D2B1F		#483C32	
Yellow					
v.Y 82 Vivid Yellow	(1-7Y) 3.3Y8/14.3 OUT	#FFB300		#F3C300	
brill.Y 83 Brilliant Yellow	(1-7Y) 4.4Y8.7/8.9	#FFCF40		#FADA5E	
s.Y 84 Strong Yellow	(1-7Y) 3.7Y7.2/9.3	#E59E1F		#D4AF37	
deep Y 85 Deep Yellow	(1-7Y) 3.7Y5.9/9.1	#B57900		#AF8D13	
l.Y 86 Light Yellow	(1-7Y) 4.3Y8.8/6.8	#FFD35F		#F8DE7E	
m.Y 87 Moderate Yellow	(1-7Y) 3.8Y7.1/6.5	#D79D41		#C9AE5D	
d.Y 88 Dark Yellow	(1-7Y) 3.9Y6/6.4	#B07D2B		#AB9144	
p.Y 89 Pale Yellow	(1-7Y) 4.7Y9/3.8	#FFDB8B		#F3E5AB	
gy.Y 90 Grayish Yellow	(1-9Y) 4.4Y7.2/3.8	#CEA262		#C2B280	

d.gY 91 Dark Grayish Yellow	(1-7Y) 3.8Y5.9/4	#A47C45		#A18F60	
yWhite 92 Yellowish White	(7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 4.5Y9.2/1.2	#FFE2B7		#F0EAD6	
yGy 93 Yellowish Gray	(7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 3.8Y7.4/1.4	#CAA885		#BFB8A5	
Olive Brown					
l.OlBr 94 Light Olive Brown	(1-4Y) 2.1Y4.9/7.9	#945D0B		#967117	
m.OlBr 95 Moderate Olive Brown	(1-4Y) 2.7Y3.6/5.5	#64400F		#6C541E	
d.OlBr 96 Dark Olive Brown	(1-4Y) 2Y1.9/2.2	#302112		#3B3121	
Greenish Yellow					
v.gY 97 Vivid Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.1Y8.2/12 OUT	#F4C800		#DCD300	
brill.gY 98 Brilliant Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.8Y8.8/9.5	#FFDC33		#E9E450	
s.gY 99 Strong Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.2Y7.2/9.2	#CCA817		#BEB72E	
d.gY 100 Deep Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.2Y5.9/9.2 OUT	#9F8200		#9B9400	
l.gY 101 Light Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.8Y8.9/7	#FFDE5A		#EAE679	
m.gY 102 Moderate Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.5Y7.1/6.5	#C4A43D		#B9B459	

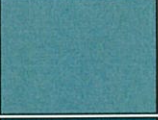





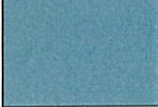
d.gY 103 Dark Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.4Y5.9/6.3	#9B8127		#98943E	
p.gY 104 Pale Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.5Y9/4.2	#FFDF84		#EBE8A4	
gy.gY 105 Grayish Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9Y7.2/3.9	#C4A55F		#B9B57D	
Olive					
l.Ol 106 Light Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8.2Y5.1/5.6	#846A20		#867E36	
m.Ol 107 Moderate Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 7.6Y3.8/5.4	#5E490F		#665D1E	
d.Ol 108 Dark Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8.9Y2.4/3.1	#362C12		#403D21	
l.gy.Ol 109 Light Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 7.85Y5.5/2.5	#8B734B		#8C8767	
gy.Ol 110 Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8Y3.6/2	#52442C		#5B5842	
d.gyOl 111 Dark Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 9.7Y2/1.8	#2B2517		#363527	
l.OlGy 112 Light Olive Gray	(4-9Y,9Y-2GY,2- 4GY) 6.9Y5.5/1.3	#887359		#8A8776	
OlGy 113 Olive Gray	(4-9Y,9Y-2GY,2- 4GY) 8.1Y3.5/0.9	#4D4234		#57554C	
OlBlack 114 Olive Black	(4-9Y,9Y-2GY,2- 4GY) 9Y1.1/0.9	#121910		#25241D	
Yellow Green					
v.YG 115 Vivid Yellow Green not vivid yellowish green see #129	(2-8GY) 5.4GY6.8/11.2 OUT	#93AA00		#8DB600	























brill.YG 116 Brilliant Yellow Green	(2-8GY) 4.9GY8.2/9.1	#CED23A		#BDDA57	
s.YG 117 Strong Yellow Green	(2-8GY) 5.4GY6/8.7	#7F8F18		#7E9F2E	
deep YG 118 Deep Yellow Green	(2-8GY) 7.4GY4.2/7.1	#425E17		#467129	
l.YG 119 Light Yellow Green	(2-8GY) 5GY8.4/5.6	#DCD36A		#C9DC89	
m.YG 120 Moderate Yellow Green	(2-8GY) 4.8GY6/5	#8B8940		#8A9A5B	
p.YG 121 Pale Yellow Green not pale yellowish green	(9Y-2GY,2-8GY) 3.4GY8.7/2.4	#F0D698		#DADFB7	
gy.YG 122 Grayish Yellow Green not grayish yellowish green	(9Y-2GY,2-8GY) 4.4GY6/2.3	#90845B		#8F9779	
Olive Green					
s.OLG 123 Strong Olive Green	(2-8GY) 4GY3/11 OUT	#0A4500		#404F00	
deep OLG 124 Deep Olive Green	(2-8GY) 4GY1.5/11 OUT	#142300		#232F00	
m.OLG 125 Moderate Olive Green	(2-8GY) 5.7GY3.6/4.8	#434B1B		#4A5D23	
d.OLG 126 Dark Olive Green	(2-8GY) 8GY2.2/3.6	#232C16		#2B3D26	

gy.OLG 127 Grayish Olive Green	(2-8GY) 4.6GY3.5/2	#48442D		#515744	
d.gy.OLG 128 Dark Grayish Olive Green	(2-8GY) 5.4GY2/1.8	#27261A		#31362B	
Yellowish Green					
v.yG 129 Vivid Yellowish Green see #115	(8GY-3G) 1.1G5.9/11.2	#379931		#27A64C	
brill.yG 130 Brilliant Yellowish Green	(8GY-3G) 0.3G7.7/8.6	#8CCB5E		#83D37D	
s.yG 131 Strong Yellowish Green	(8GY-3G) 0.4G5.4/8.7	#478430		#44944A	
deep yG 132 Deep Yellowish Green	(8GY-3G) 0.9G3.5/9 OUT	#00541F		#00622D	
v.deep yG 133 Very Deep Yellowish Green	(8GY-3G) 10GY1.5/11 OUT	#002800		#003118	
v.lyG 134 Very Light Yellowish Green	(8GY-3G) 0.2G8.6/4.6	#C6DF90		#B6E5AF	
l.yG 135 Light Yellowish Green	(8GY-3G) 0.7G7.4/5.2	#007BA7 see #167 #170		#93C592	
m.yG 136 Moderate Yellowish Green	(8GY-3G) 0.5G5.5/4.8	#657F4B		#679267	
d.yG 137 Dark Yellowish Green	(8GY-3G) 0.6G3.5/5	#304B26		#355E3B	


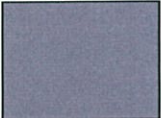


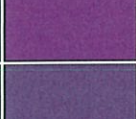
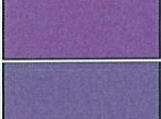

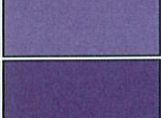
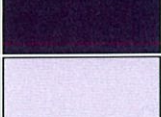
v.d.yG 138 Very Dark Yellowish Green	(8GY-3G) 0.3G1.8/4.3	#132712		#173620	
Green					
v.G 139 Vivid Green	(3-9G) 3.2G4.9/11.1 OUT	#007D34		#008856	
brill.G 140 Brilliant Green	(3-9G) 6.2G6.5/8.3	#47A76A		#3EB489	
s.G 141 Strong Green	(3-9G) 5.8G4.4/8.7 OUT	#006B3C		#007959	
deep G 142 Deep Green	(3-9G) 5.1G3/8.1 OUT	#004524		#00543D	
v.l.G 143 Very Light Green	(3-9G) 6.5G7.8/4.9	#98C793		#8ED1B2	
l.G 144 Light Green	(3-9G) 6G6.4/5.1	#719B6E		#6AAB8E	
m.G 145 Moderate Green	(3-9G) 6.3G4.5/5.1	#386646		#3B7861	
d.G 146 Dark Green	(3-9G) 6.6G2.8/4.6	#203A27		#1B4D3E	
v.d.G 147 Very Dark Green	(3-9G) 8G1.8/3	#16251C		#1C352D	
v.p.G 148 Very Pale Green	(8GY-3G,3-9G) 7.3G8.8/1.9	#D8DEBA		#C7E6D7	
p.G 149 Pale Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 7.6G6.4/1.7	#8D917A		#8DA399	
gy.G 150 Grayish Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 8.8G4.5/1.8	#575E4E		#5E716A	
d.gy.G 151 Dark Grayish Green not	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 1BG2.9/1.8	#313830		#3A4B47	

dark greenish yellowish green or dark grayish yellowish green					
blackish G 152 Blackish Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 10G1/1.4	#141613		#1A2421	
gWhite 153 Greenish White	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 10G9.2/0.8	#F5E6CB		#DFEDE8	
l.gGy 154 Light Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 3G7.5/0.9	#BAAF96		#B2BEB5	
gGy 155 Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 7.5G5.5/1	#7A7666		#7D8984	
d.gGy 156 Dark Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 1.5BG3.5/0.9	#45433B		#4E5755	
gBlack 157 Greenish Black	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 8.7G1/0.7	#181513		#1E2321	
Bluish Green					
v.bG 158 Vivid Bluish Green	(9G-10BG) 5BG5/13 OUT	#00836E		#008882	
brill.bG 159 Brilliant Bluish Green	(9G-10BG) 2.9BG6/9.6 OUT	#009B76		#00A693	
s.bG 160 Strong Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG4.5/8.5 OUT	#006D5B		#007A74	
deep bG 161 Deep Bluish Green	(9G-10BG) 2.8BG2.4/8.3 OUT	#00382B		#00443F	


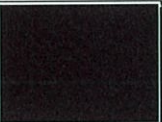
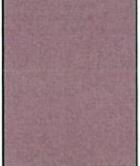










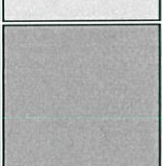

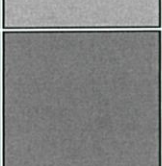

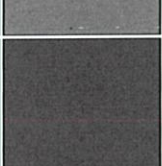
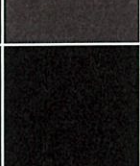
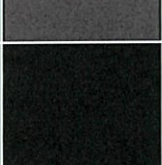
v.l.bG 162 Very Light Bluish Green	(9G-10BG) 4.4BG8.3/4.6	#A0D6B4		#96DED1	
l.bG 163 Light Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG6.5/4.9	#669E85		#66ADA4	
m.bG 164 Moderate Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG4.5/5	#2F6556		#317873	
d.bG 165 Dark Bluish Green	(9G-10BG) 4.9BG2.7/5 OUT	#013A33		#004B49	
v.d.bG 166 Very Dark Bluish Green	(9G-10BG) 3.6BG1.2/4 OUT	#001D18		#002A29	
Greenish Blue					
v.gB 167 Vivid Greenish Blue	(10BG-9B) 5B5/13 OUT see #170 #176	#007BA7 see #135 #170		#0085A1	
brill.gB 168 Brilliant Greenish Blue	(10BG-9B) 4.6B5.9/7.7	#2A8D9C		#239EBA	
s.gB 169 Strong Greenish Blue	(10BG-9B) 4.9B4.5/8.4 OUT	#00677E		#007791	
deep gB 170 Deep Greenish Blue	(10BG-9B) 5B5/13 OUT see #167 #176 same as #167; guess 5B2/9	#007BA7 see #135 #167		#2E8495	
v.l.gB 171 Very Light Greenish Blue	(10BG-9B) 4B8/4	#A3C6C0		#9CD1DC	
l.gB 172 Light Greenish Blue	(10BG-9B) 4.5B6.5/5.4	#649A9E		#66AABC	




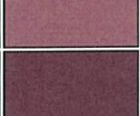
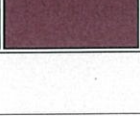
m.gB 173 Moderate Greenish Blue	(10BG-9B) 4.7B4.5/5.2	#30626B		#367588	
d.gB 174 Dark Greenish Blue	(10BG-9B) 3.7B2.7/5 OUT	#003841		#004958	
v.d.gB 175 Very Dark Greenish Blue	(10BG-9B) 5B1.5/3.6 OUT	#022027		#002E3B	
Blue					
v.B 176 Vivid Blue, ultramarine	(9B-5PB,5-7PB) 5B5/14 OUT see #167 #170	#007CAD		#00A1C2	
brill.B 177 Brilliant Blue, celestial blue	(9B-5PB,5-7PB) 1.6PB5.9/9.4	#4285B4		#4997D0	
s.B 178 Strong Blue, bright blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.9PB4.1/10.4 OUT	#00538A		#0067A5	
deep B 179 Deep Blue, royal blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.8PB2.5/7.9 OUT	#002F55		#00416A	
v.l.B 180 Very Light Blue, baby blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.7PB7.9/6	#A6BDD7		#A1CAF1	
l.B 181 Light Blue, sky blue	(9B-5PB,5-7PB) 1.6PB6.4/6.9	#6C92AF		#70A3CC	
m.B 182 Moderate Blue, cerulean blue	(9B-5PB,5-7PB) 3PB4.3/6.8	#395778		#436B95	
d.B 183 Dark Blue, navy blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.2PB1.7/5.5 OUT	#002137		#00304E	

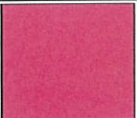

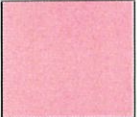



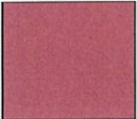

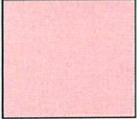
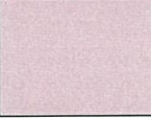
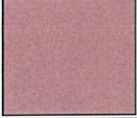









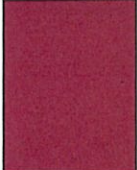





v.p.B 184 Very Pale Blue, cloud blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 1.5PB8.3/3.3	#C1CACA		#BCD4E6	
p.B 185 Pale Blue, alice blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.6PB6.5/2.6	#919192		#91A3B0	
gy.B 186 Grayish Blue, slate blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.2PB4.2/3	#4A545C		#536878	
d.gy.B 187 Dark Grayish Blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.2B2.7/2	#2C3337		#36454F	
blackish B 188 Blackish Blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.8B1.3/1.5	#161A1E		#202830	
bWhite 189 Bluish White	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.2B9.1/1.2	#F9DFCF		#E9E9ED	
l.bGy 190 Light Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 8.2B7.5/1	#BEADA1		#B4BCC0	
bGy 191 Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 8.9B5.5/0.9	#7D746D		#81878B	
d.bGy 192 Dark Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.3PB3.6/1.1	#464544		#51585E	
bBlack 193 Bluish Black	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.6B1.1/0.8	#151719		#202428	
Purplish Blue					
v.pB 194 Vivid Purplish Blue not very purplish blue	(7-9PB) 7.8PB2/12.5	#20155E		#30267A	
brill.pB 195 Brilliant Purplish Blue	(7-9PB) 7.3PB5.1/9	#62639B		#6C79B8	
s.pB 196 Strong Purplish Blue	(7-9PB) 8PB4/10.9	#474389		#545AA7	



deep pB 197 Deep Purplish Blue	(7-9PB) 7.8PB1.5/8	#1A153F		#272458	
v.l.pB 198 Very Light Purplish Blue	(7-9PB) 7.4PB7.6/5.2	#BAACC7		#B3BCE2	
l.pB 199 Light Purplish Blue	(7-9PB) 7.3PB6/6.5	#837DA2		#8791BF	
m.pB 200 Moderate Purplish Blue	(7-9PB) 7.9PB3.5/6.5	#423C63		#4E5180	
d.pB 201 Dark Purplish Blue	(7-9PB) 8PB1.3/4.3	#1A162A		#252440	
v.p.pB 202 Very Pale Purplish Blue	(5-9PB) 7PB8/3.7	#CBBAC5		#C0C8E1	
p.pB 203 Pale Purplish Blue	(5-9PB) 7PB6/3.9	#8A7F8E		#8C92AC	
gy.pB 204 Grayish Purplish Blue	(5-9PB) 6.9PB3.4/3.8	#413D51		#4C516D	
Violet					
v.V 205 Vivid Violet	(9PB-3P) 2P5/14	#884BAE		#9065CA	
brill.V 206 Brilliant Violet	(9PB-3P) 9.9PB5.1/9.4	#755D9A		#7E73B8	
s.V 207 Strong Violet	(9PB-3P) 0.2P3.7/10.1	#53377A		#604E97	
deep V 208 Deep Violet	(9PB-3P) 1.1P1.2/8.6	#240935		#32174D	
v.l.V 209 Very Light Violet	(9PB-3P) 2P8.5/7 OUT	#EEBEF1		#DCD0FF	
l.V 210 Light Violet	(9PB-3P) 0.5P5.6/7.1	#876C99		#8C82B6	

m.V 211 Moderate Violet	(9PB-3P) 1.4P3.6/7	#543964		#604E81	
d.V 212 Dark Violet	(9PB-3P) 1.4P1.3/4.9	#22132B		#2F2140	
v.p.V 213 Very Pale Violet	(9PB-3P) 9.7PB7.9/3.7	#D8B1BF		#C4C3DD	
p.V 214 Pale Violet	(9PB-3P) 1.3P6/4	#957B8D		#9690AB	
gy.V 215 Grayish Violet	(9PB-3P) 1.2P3.3/3.9	#46394B		#554C69	
Purple					
v.P 216 Vivid Purple	(3-9P) 6P4.5/14.0	#943391		#9A4EAE	
brill.P 217 Brilliant Purple	(3-9P) 6P7/11	#DD80CC		#D399E6	
s.P 218 Strong Purple	(3-9P) 6.5P4.3/9.2	#803E75		#875692	
deep P 219 Deep Purple	(3-9P) 6.3P2.7/9.1	#531A50		#602F6B	
v.deep P 220 Very Deep Purple	(3-9P) 5P1.5/8	#320B35		#401A4C	
v.l.P 221 Very Light Purple	(3-9P) 6.5P7.8/5.1	#E3A9BE		#D5BADB	
l.P 222 Light Purple	(3-9P) 6.2P6.5/6.5	#BA7FA2		#B695C0	
m.P 223 Moderate Purple	(3-9P) 6.6P4.5/7.1	#7F4870		#86608E	
d.P 224 Dark Purple	(3-9P) 6.3P2.8/4.9	#472A3F		#563C5C	

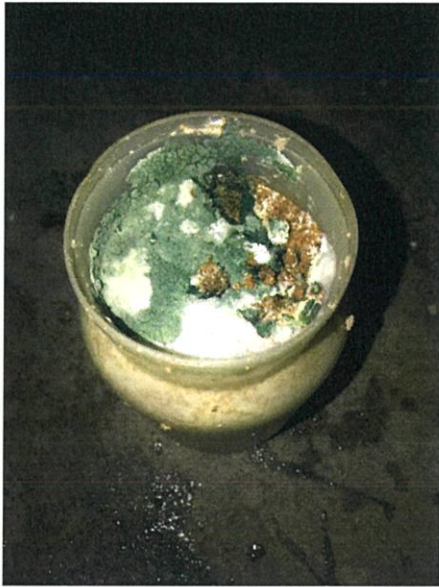
v.d.P 225 Very Dark Purple	(3-9P) 6.9P1/4.5	#230D21		#301934	
v.p.P 226 Very Pale Purple	(9PB-3P,3-9P) 5.5P8.2/3.2	#E6BBC1		#D6CADD	
p.P 227 Pale Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 7.9P6.4/3.1	#AE848B		#AA98A9	
gy.P 228 Grayish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 8.1P4.5/2.7	#72525C		#796878	
d.gy.P 229 Dark Grayish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 0.5RP2.8/2	#452D35		#50404D	
blackish P 230 Blackish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 0.8RP0.9/1.6 OUT	#1D1018		#291E29	
pWhite 231 Purplish White	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 2.5RP9/0.8	#FADBC8		#E8E3E5	
l.pGy 232 Light Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 0.3RP7.5/1.1	#C8A99E		#BFB9BD	
pGy 233 Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP5.5/0.9	#88706B		#8B8589	
d.pGy 234 Dark Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP3.6/1	#564042		#5D555B	
pBlack 235 Purplish Black	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 9.54P0.9/0.6 OUT	#1B1116		#242124	

Reddish Purple					
v.rP 236 Vivid Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP3/14 OUT	#7E0059		#870074	
s.rP 237 Strong Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP4.4/10.2	#9A366B		#9E4F88	
deep rP 238 Deep Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP2.8/9.5	#641349		#702963	
v.deep rP 239 Very Deep Reddish Purple	(9P-3RP) 0.9RP1.9/8.9	#470736		#54194E	
l.rP 240 Light Reddish Purple	(9P-3RP) 0.7RP6/6.9	#BB6C8A		#B784A7	
m.rP 241 Moderate Reddish Purple	(9P-3RP) 0.8RP4.5/7	#8C4566		#915C83	
d.rP 242 Dark Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP2.8/4.8	#4F273A		#5D3954	
v.d.rP 243 Very Dark Reddish Purple	(9P-3RP) 1.5RP1/4.8	#270A1F		#341731	
p.rP 244 Pale Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP6/4.2	#AC7580		#AA8A9E	
gy.rP 245 Grayish Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP4.5/4.2	#7D4D5D		#836479	
Purplish Pink					
brill.pPk 246 Brilliant Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 6RP8.5/11 OUT	#FF97BB		#FFC8D6	
s.pPk 247 Strong Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 5.6RP6.8/9	#F6768E		#E68FAC	

deep pPk 248 Deep Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.4RP6/12.2	#EB5284		#DE6FA1	
l.pPk 249 Light Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.6RP8/5.5	#FFA8AF		#EFBBCC	
m.pPk 250 Moderate Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.6RP6.8/6.7	#E28090		#D597AE	
d.pPk 251 Dark Purplish Pink	(3-9RP) 6.4RP5.9/7	#C76574		#C17E91	
p.pPk 252 Pale Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 3.7RP8.4/3.3	#FDBDBA		#E8CCD7	
gy.pPk 253 Grayish Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 3.7RP7/3.5	#CC9293		#C3A6B1	
Purplish Red					
v.pR 254 Vivid Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.6RP4.9/13.6	#D5265B		#CE4676	
s.pR 255 Strong Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.3RP4.4/11.4	#B32851		#B3446C	
deep pR 256 Deep Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.3RP2.6/10.1	#6F0035		#78184A	
v.deep pR 257 Very Deep Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 6.8RP1.7/8	#470027		#54133B	
m.pR 258 Moderate Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.1RP4.5/9	#A73853		#A8516E	
d.pR 259 Dark Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.1RP2.7/6	#5B1E31		#673147	
v.d.pR 260 Very Dark Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 6.6RP0.9/4.8 OUT	#28071A		#38152C	

l.gy.pR 261 Light Grayish Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.8RP5.9/4.2	#B27070		#AF868E	
gy.pR 262 Grayish Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7RP4.5/5.1	#8C4852		#915F6D	
Neutral					
White 263 White	(all) 2.5PB9.5/0.2	#FFC9D7		#F2F3F4	
l.Gy 264 Light Gray	(all) 6.7Y7.4/0.2	#C2A894		#B9B8B5	
med.Gy 265 Medium Gray	(all) 3.3GY5.4/0.1	#817066		#848482	
d.Gy 266 Dark Gray	(all) 2.5PB3.5/0	#49423D		#555555	
Black 267 Black	(all) 2.5PB0.8/0 OUT	#131313		#222222	

ภาคผนวก ค
ภาพถ่ายตัวอย่างเห็ด



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

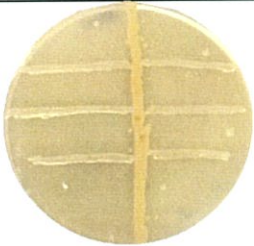
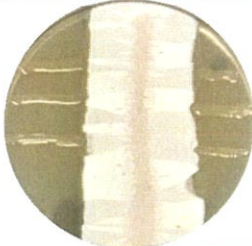

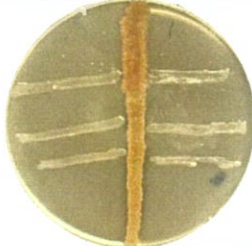
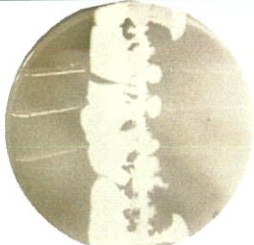
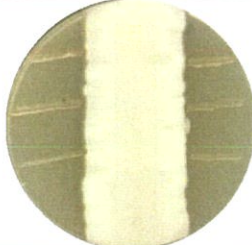

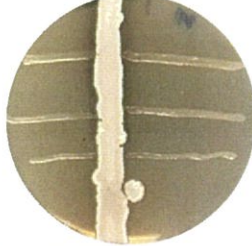

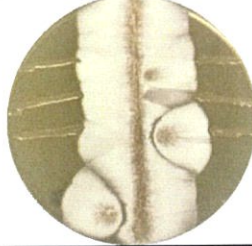
รูปที่ ค (1) แสดงภาพถ่ายตัวอย่างดอกเห็ดที่มีเชื้อ *Trichoderma* spp. (ก) และ *Pseudomonas* spp. (ข) (ค) และ (ง) ปนเปื้อน

ภาคผนวก ง

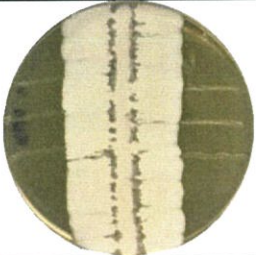
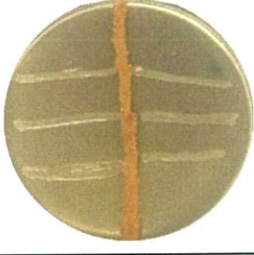
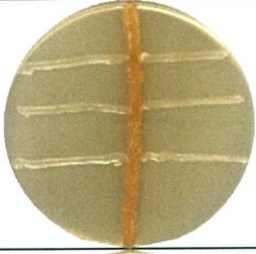
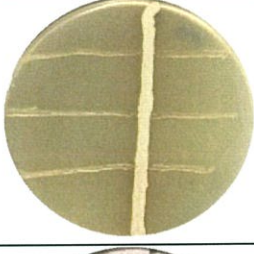
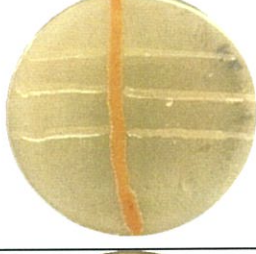



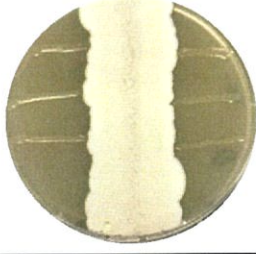


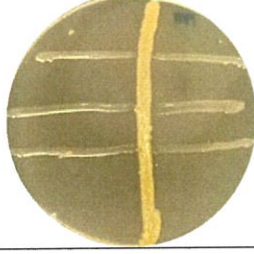
ผลการทดลอง

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. โดยเชื้อปฏิปักษ์
ด้วยวิธี T-streak

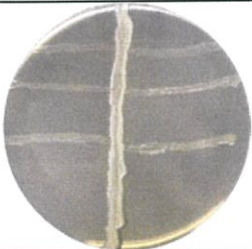
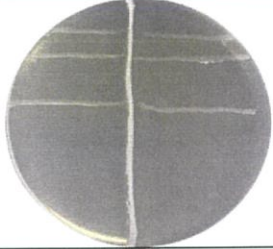
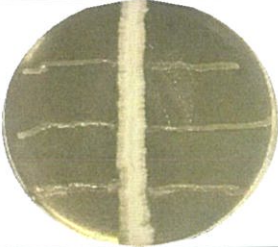
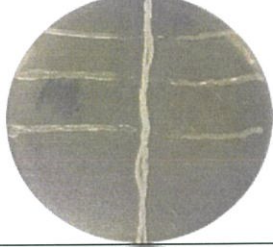
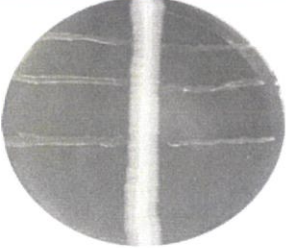
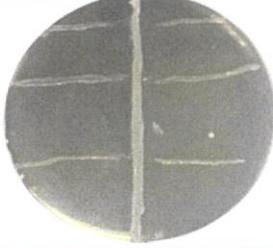
ตารางที่ ง (1) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ
Pseudomonas spp. PS1 ด้วยวิธี T-streak

หมายเลข ไอโซเลท	PS1	หมายเลข ไอโซเลท	PS1
BKH 00431		BKH 02030	
BKH 00722		BKH 222	
BKH 00723		BKH 232	
BKH 01722		BKH 241	
BKH 01724		BKH 422	

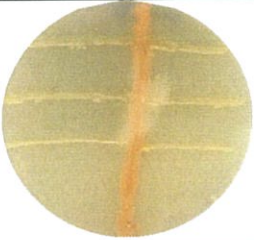

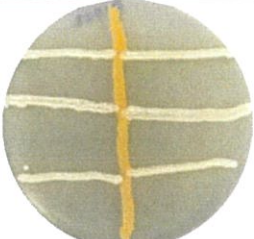

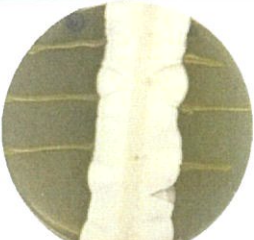
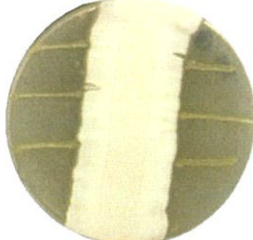

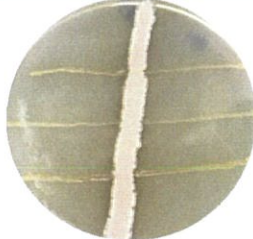


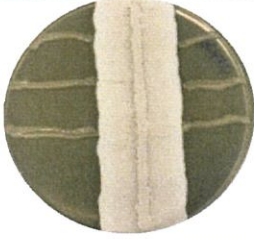

ตารางที่ ง (1) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS1 ด้วยวิธี T-streak

หมายเลข ไอโซเลท	PS1	หมายเลข ไอโซเลท	PS1
BKH 01730		BKH 431	
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		BKH 1941	

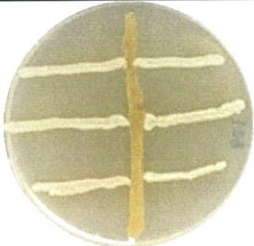
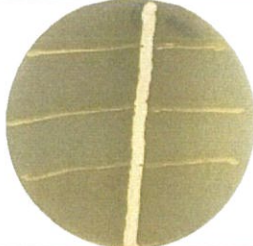
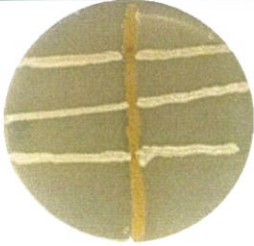
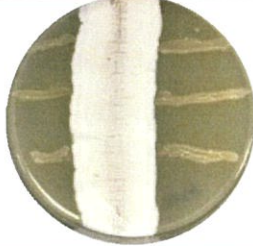
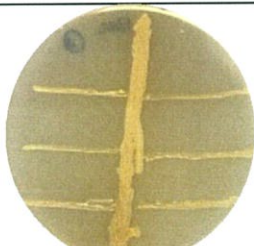

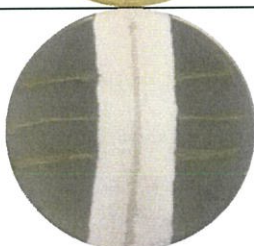
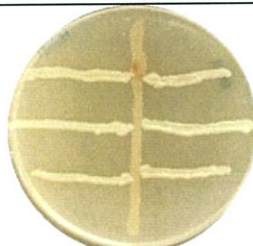

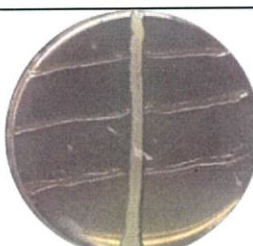
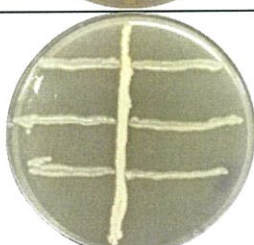
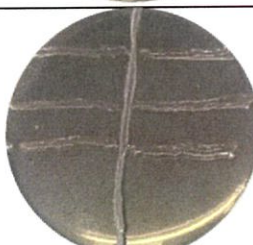
ตารางที่ ง (1) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS1 ด้วยวิธี T-streak

หมายเลข ไอโซเลท	PS1	หมายเลข ไอโซเลท	PS1
TISTR 8411		TISTR 612	
TISTR 412		TISTR BCA002	
TISTR p13A1		TISTR BCALg2	

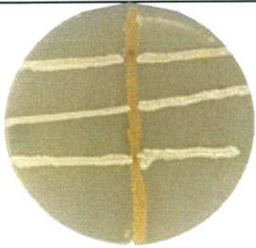
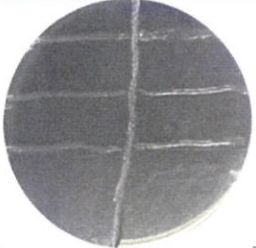
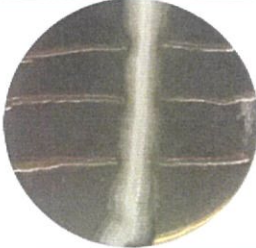
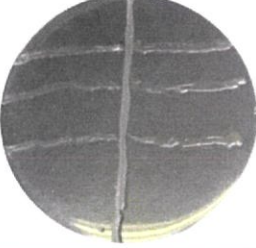
ตารางที่ ง (2) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS3.2 ด้วยวิธี T-streak

หมายเลข ไอโซเลท	PS3.2	หมายเลข ไอโซเลท	PS3.2
BKH 00431		BKH 02030	
BKH 00722		BKH 222	
BKH 00723		BKH 232	
BKH 01722		BKH 241	
BKH 01724		BKH 422	
BKH 01730		BKH 431	


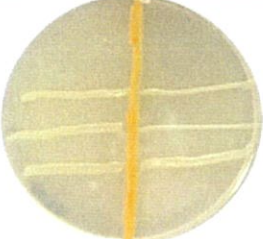
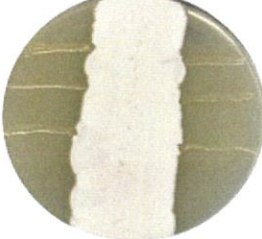

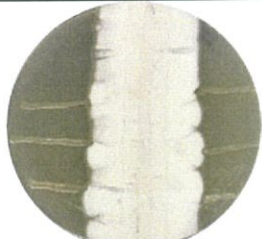
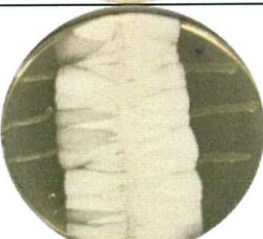
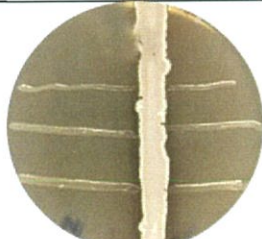
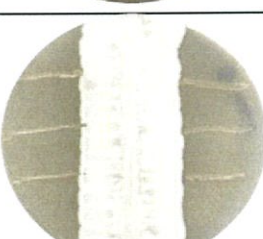

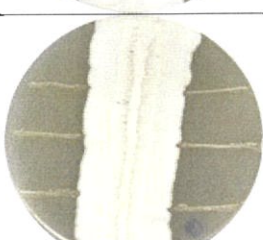

ตารางที่ ง (2) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS3.2 ด้วยวิธี T-streak (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	PS3.2	หมายเลข ไอโซเลท	PS3.2
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		TISTR 8411	
BKH 1941		TISTR 612	

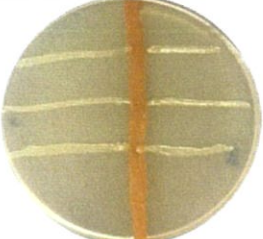

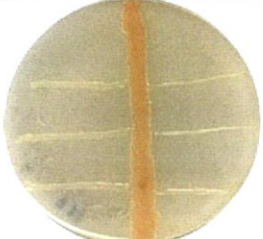
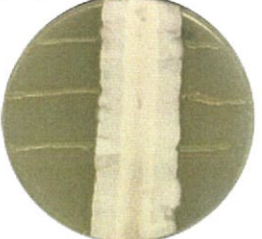


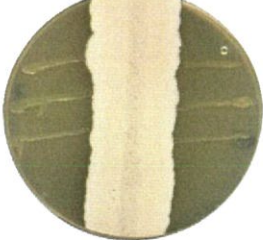

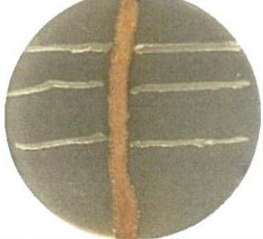
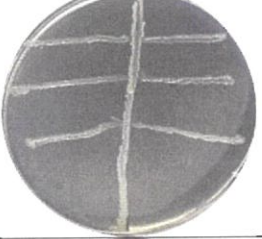

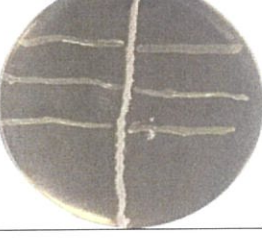
ตารางที่ ง (2) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS3.2 ด้วยวิธี T-streak (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	PS3.2	หมายเลข ไอโซเลท	PS3.2
TISTR 412		TISTR BCA002	
TISTR p13A1		TISTR BCALg2	

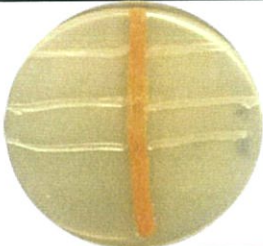
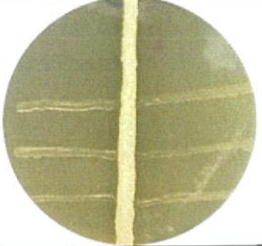
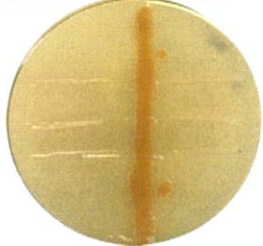
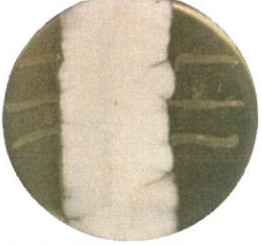


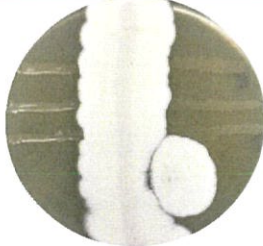
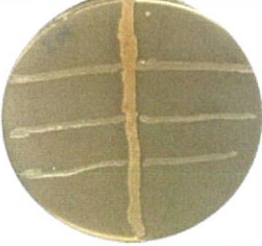
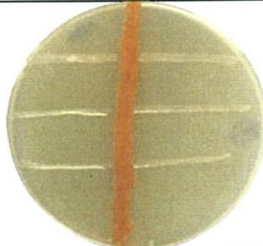
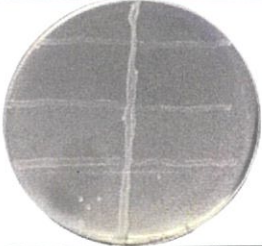
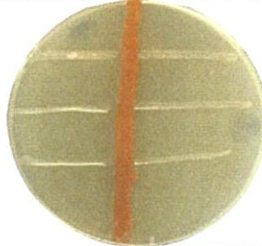
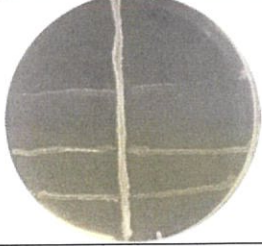
ตารางที่ ง (3) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS6 ด้วยวิธี T-streak

หมายเลข ไอโซเลท	PS6	หมายเลข ไอโซเลท	PS6
BKH 00431		BKH 02030	
BKH 00722		BKH 222	
BKH 00723		BKH 232	
BKH 01722		BKH 241	
BKH 01724		BKH 422	
BKH 01730		BKH 431	


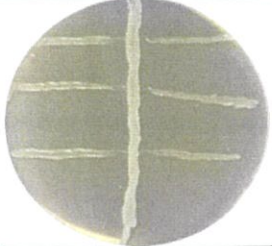
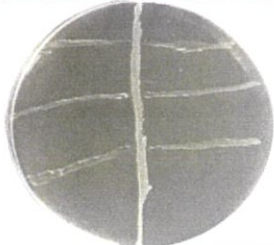
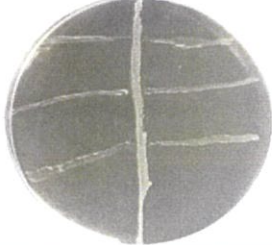
ตารางที่ ง (3) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS6 ด้วยวิธี T-streak (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	PS6	หมายเลข ไอโซเลท	PS6
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		TISTR 8411	
BKH 1941		TISTR 612	

ตารางที่ ง (4) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS7 ด้วยวิธี T-streak (ต่อ)

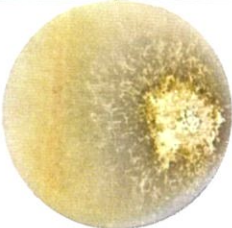
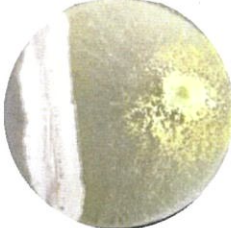
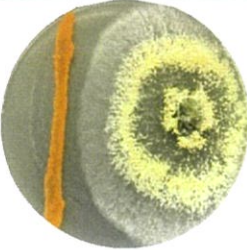
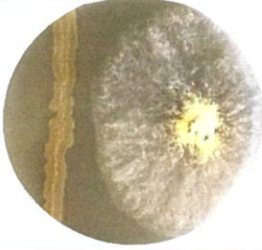
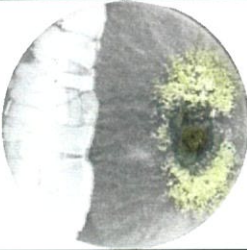
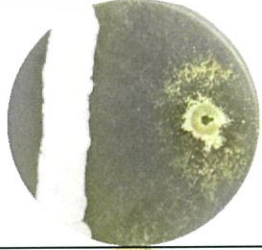
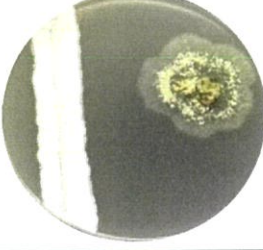
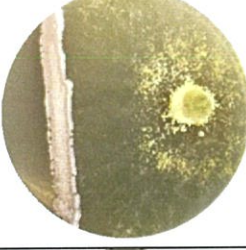


หมายเลข ไอโซเลท	PS7	หมายเลข ไอโซเลท	PS7
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		TISTR 8411	
BKH 1941		TISTR 612	

ตารางที่ ง (4) แสดงภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp. PS7 ด้วยวิธี T-streak (ต่อ)

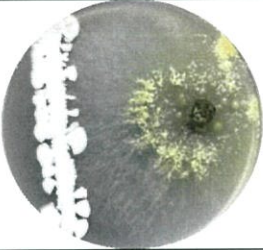
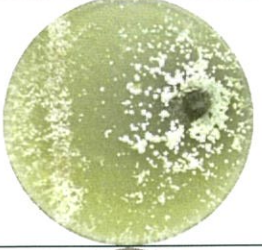

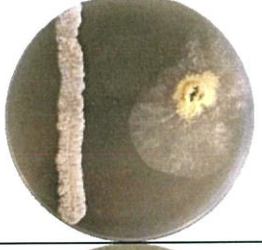
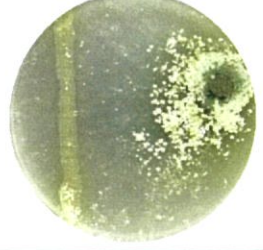

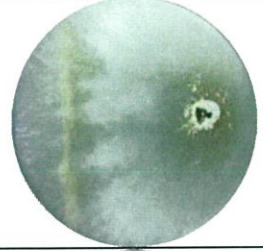
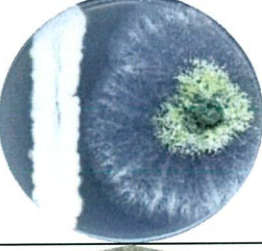
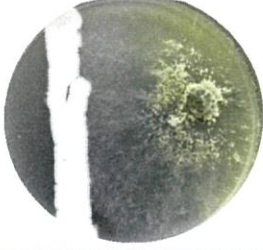
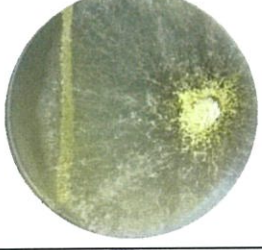

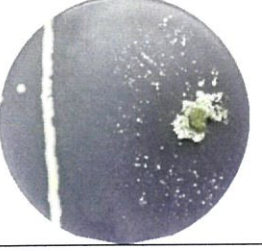
หมายเลข ไอโซเลท	PS7	หมายเลข ไอโซเลท	PS7
TISTR 412		TISTR BCA002	
TISTR p13A1		TISTR BCA Lg2	

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. โดยเชื้อปฏิปักษ์
ด้วยวิธี dual culture

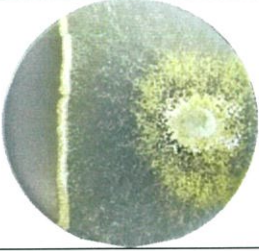
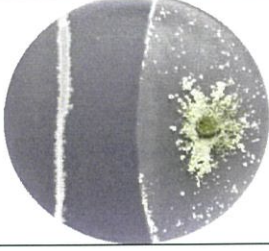
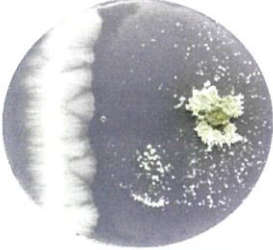
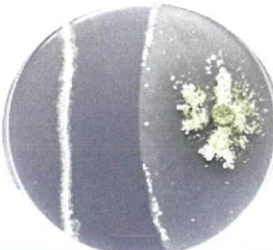
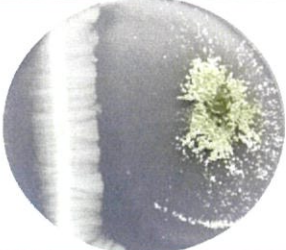

ตารางที่ ง (5) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญ
ของ *Trichoderma* spp. TM1 ด้วยวิธี dual culture

หมายเลข ไอโซเลท	TM1	หมายเลข ไอโซเลท	TM1
BKH 00431		BKH 02030	
BKH 00722		BKH 222	
BKH 00723		BKH 232	
BKH 01722		BKH 241	
BKH 01724		BKH 422	

ตารางที่ ง (5) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM1 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM1	หมายเลข ไอโซเลท	TM1
BKH 01730		BKH 431	
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		TISTR 8411	

ตารางที่ ง (5) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM1 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM1	หมายเลข ไอโซเลท	TM1
BKH 1941		TISTR 612	
TISTR 412		TISTR BCA002	
TISTR p13A1		TISTR BCA Lg2	

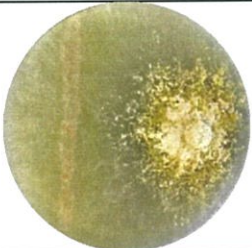
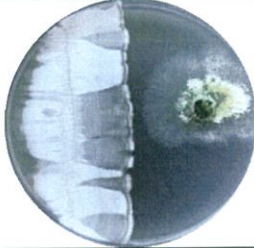
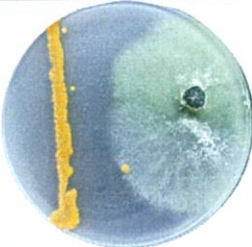
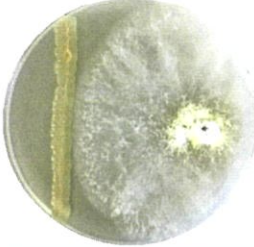
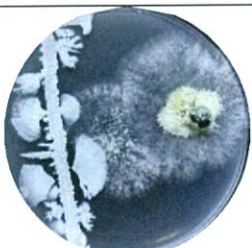
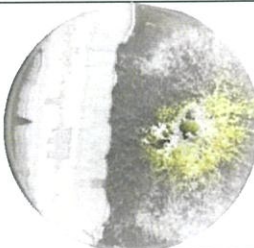


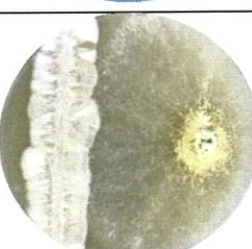
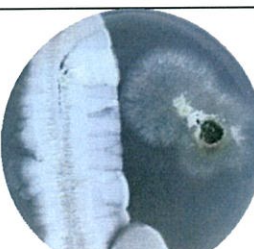
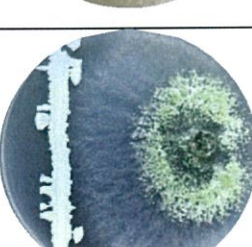
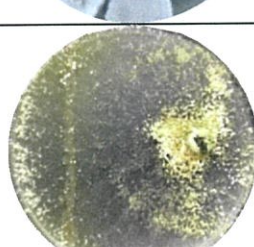
ตารางที่ ง (6) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM1 ด้วยวิธี dual culture

ไอโซเลท	TM1														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
Control		8.50	8.50	8.50		8.50	8.50	8.50		8.50	8.50	8.50			
BKH 00431		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00
BKH 00722		4.70	8.00	6.35	25.29	5.50	8.00	6.75	20.59	5.70	8.30	7.00	17.65	21.18	0.00
BKH 00723		5.00	8.00	6.50	23.53	5.60	8.30	6.95	18.24	6.00	8.50	7.25	14.71	18.82	3.15
BKH 01722		4.20	6.50	5.35	37.06	4.20	6.60	5.40	36.47	3.50	5.50	4.50	47.06	40.20	3.63
BKH 01724		5.00	6.50	5.75	32.35	5.20	7.50	6.35	25.29	5.20	7.40	6.30	25.88	27.84	4.86
BKH 01730		6.00	8.00	7.00	17.65	6.00	8.00	7.00	17.65	6.70	7.80	7.25	14.71	16.67	3.20
BKH 02030		5.90	8.50	7.20	15.29	5.50	8.50	7.00	17.65	5.70	8.50	7.10	16.47	16.47	1.39
BKH 222		5.20	7.10	6.15	27.65	5.60	6.80	6.20	27.06	6.00	5.50	5.75	32.35	29.02	0.96
BKH 232		5.30	8.50	6.90	18.82	5.60	8.50	7.05	17.06	5.30	8.50	6.90	18.82	18.24	2.37
BKH 241		5.70	8.50	7.10	16.47	6.00	8.50	7.25	14.71	6.20	8.50	7.35	13.53	14.90	0.83
BKH 422		5.50	7.30	6.40	24.71	5.30	6.50	5.90	30.59	5.40	7.50	6.45	24.12	26.47	1.21
BKH 431		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	2.92
BKH 521		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00


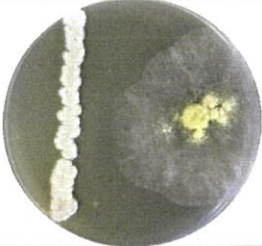
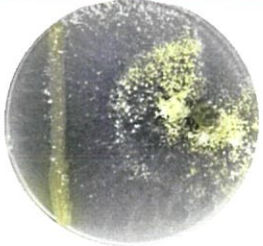

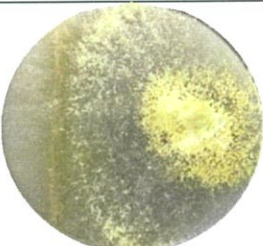
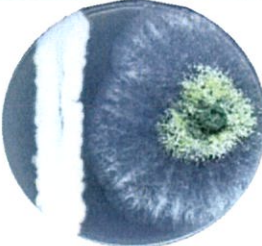
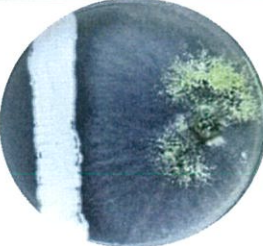

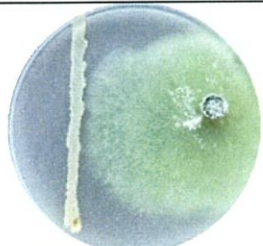
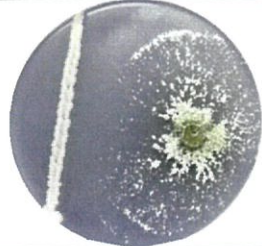
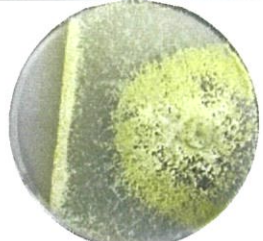
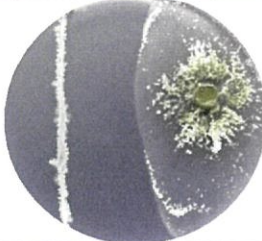
ตารางที่ ง (6) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM1 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

ไอโซเลท	TM1														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
BKH 731		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00
BKH 1322		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00
BKH 1731		5.40	8.40	6.90	18.82	5.60	8.20	6.90	18.82	5.50	8.30	6.90	18.82	18.82	0.00
BKH 1922		6.70	8.00	7.35	13.53	6.20	8.30	7.25	14.71	6.30	8.50	7.40	12.94	13.73	0.73
BKH 1941		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00
BKH 2023		2.80	6.00	4.40	48.24	4.00	4.20	4.10	51.76	4.00	5.00	4.50	47.06	49.02	2.00
BKH 2024		5.30	7.40	6.35	25.29	4.60	5.80	5.20	38.82	5.30	6.70	6.00	29.41	31.18	5.66
BKH 2026		5.70	7.90	6.80	20.00	5.60	8.00	6.80	20.00	5.70	8.00	6.85	19.41	19.80	0.28
BKH 2032		3.90	6.00	4.95	41.76	4.50	6.10	5.30	37.65	4.20	5.70	4.95	41.76	40.39	1.94
TISTR 8411		6.00	8.00	7.00	12.50	6.20	8.00	7.10	8.39	6.20	8.00	7.10	11.25	10.71	1.72
TISTR 612		4.00	8.00	6.00	25.00	4.10	7.50	5.80	25.16	4.30	7.90	6.10	23.75	24.64	0.63
TISTR 412		5.50	7.50	6.50	18.75	5.00	7.50	6.25	19.35	5.00	6.50	5.75	28.13	22.08	4.28
TISTR p13A1		5.00	7.00	6.00	25.00	4.70	7.00	5.85	24.52	4.50	7.00	5.75	28.13	25.88	1.60
TISTR BCA002		4.00	7.70	5.85	26.88	3.70	8.00	5.85	24.52	4.00	8.00	6.00	25.00	25.46	1.02
TISTR BCALg2		3.00	4.00	3.50	56.25	4.00	6.00	5.00	35.48	4.10	7.50	5.80	27.50	39.74	12.12


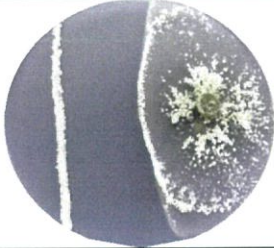
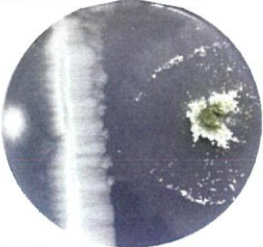
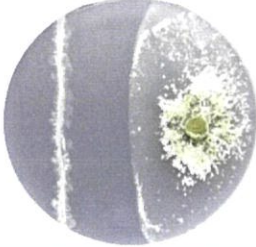
ตารางที่ ง (7) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM3 ด้วยวิธี dual culture

หมายเลข ไอโซเลท	TM3	หมายเลข ไอโซเลท	TM3
BKH 00431		BKH 02030	
BKH 00722		BKH 222	
BKH 00723		BKH 232	
BKH 01722		BKH 241	
BKH 01724		BKH 422	
BKH 01730		BKH 431	

ตารางที่ ง (7) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM3 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM3	หมายเลข ไอโซเลท	TM3
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		TISTR 8411	
BKH 1941		TISTR 612	

ตารางที่ ง (7) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM3 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM3	หมายเลข ไอโซเลท	TM3
TISTR 412		TISTR BCA002	
TISTR p13A1		TISTR BCA Lg2	

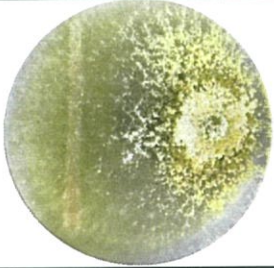

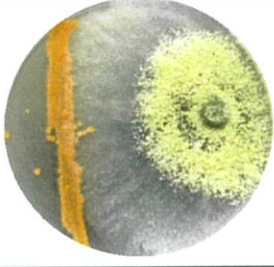
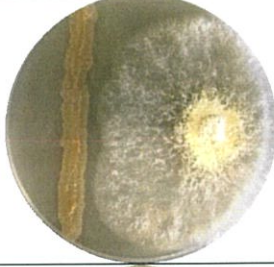
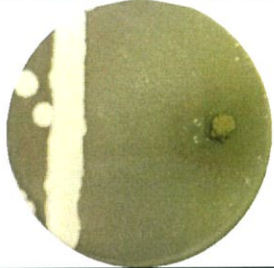

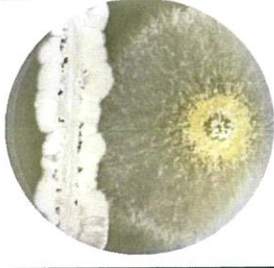
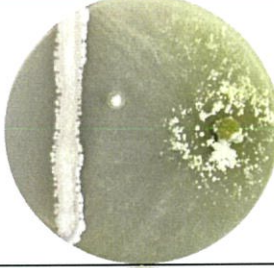
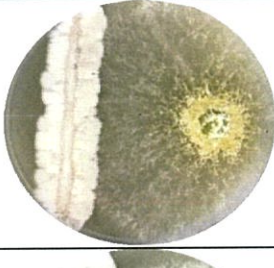
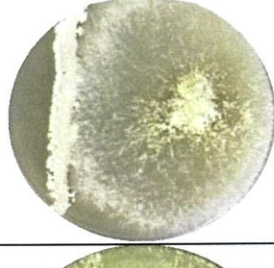
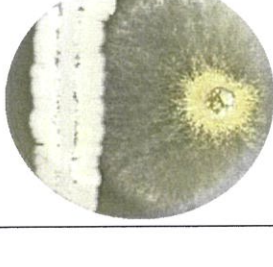
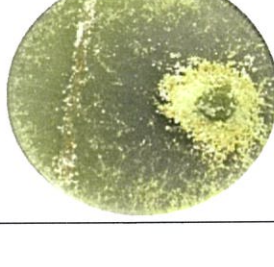
ตารางที่ ง (8) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM3 ด้วยวิธี dual culture

ไอโซเลท	TM3														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
Control		8.50	8.50	8.50		8.50	8.50	8.50		8.50	8.50	8.50			
BKH 00431		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00
BKH 00722		4.90	8.50	6.70	21.18	5.50	8.10	6.80	20.00	7.50	8.50	8.00	5.88	15.69	6.95
BKH 00723		4.50	7.00	5.75	32.35	4.20	7.30	5.75	32.35	6.00	7.40	6.70	21.18	28.63	5.27
BKH 01722		6.00	7.80	6.90	18.82	5.20	8.30	6.75	20.59	5.50	8.00	6.75	20.59	20.00	0.83
BKH 01724		5.00	7.80	6.40	24.71	5.00	7.70	6.35	25.29	5.30	7.50	6.40	24.71	24.90	0.28
BKH 01730		5.70	8.00	6.85	19.41	6.10	8.30	7.20	15.29	6.00	8.00	7.00	17.65	17.45	1.69
BKH 02030		4.40	6.00	5.20	38.82	4.00	5.80	4.90	42.35	3.00	6.80	4.90	42.35	41.18	1.66
BKH 222		6.00	7.90	6.95	18.24	4.00	4.20	4.10	51.76	5.90	8.00	6.95	18.24	29.41	15.81
BKH 232		5.00	8.50	6.75	20.59	4.50	8.50	6.50	23.53	4.90	8.50	6.70	21.18	21.76	1.27
BKH 241		6.10	8.50	7.30	14.12	6.00	8.50	7.25	14.71	6.00	8.50	7.25	14.71	14.51	0.28
BKH 422		3.50	6.00	4.75	44.12	4.00	8.00	6.00	29.41	3.00	6.30	4.65	45.29	39.61	7.23
BKH 431		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00
BKH 521		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00

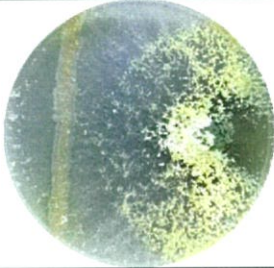
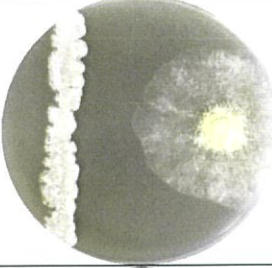
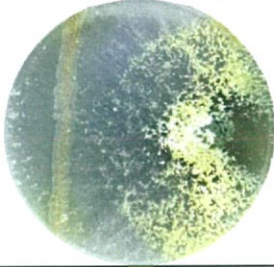



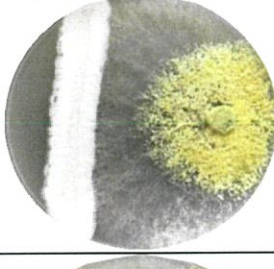
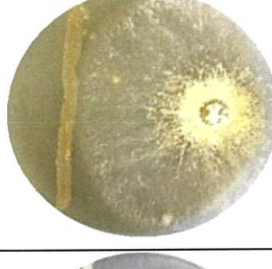
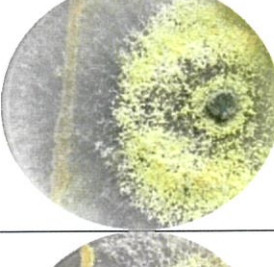
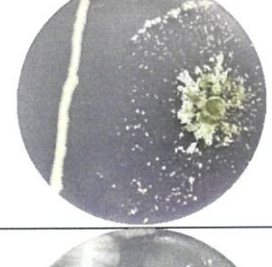


ตารางที่ ง (8) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM3 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

ไอโซเลท	TM3														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
BKH 731		8.50	8.50	8.50	0.00	6.30	8.50	7.40	12.94	8.50	8.50	8.50	0.00	4.31	6.10
BKH 1322		8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	0.00	0.00
BKH 1731		5.50	8.00	6.75	20.59	5.70	8.30	7.00	17.65	5.80	8.50	7.15	15.88	18.04	1.94
BKH 1922		8.30	8.50	8.40	1.18	6.00	8.50	7.25	14.71	5.60	8.50	7.05	17.06	10.98	7.00
BKH 1941		6.20	8.50	7.35	13.53	6.40	8.50	7.45	12.35	6.30	8.50	7.40	12.94	12.94	0.48
BKH 2023		4.20	5.20	4.70	44.71	3.10	3.30	3.20	62.35	3.50	5.00	4.25	50.00	52.35	7.39
BKH 2024		4.00	5.50	4.75	44.12	5.30	8.00	6.65	21.76	5.50	6.20	5.85	31.18	32.35	9.16
BKH 2026		4.50	8.20	6.35	25.29	5.70	8.00	6.85	19.41	5.00	8.30	6.65	21.76	22.16	2.42
BKH 2032		7.00	8.30	7.65	10.00	6.80	8.20	7.50	11.76	7.00	8.10	7.55	11.18	10.98	0.73
TISTR 8411		6.00	6.50	6.25	24.24	6.50	7.00	6.75	16.15	6.30	7.60	6.95	15.24	18.55	4.05
TISTR 612		4.20	7.60	5.90	28.48	4.00	7.50	5.75	28.57	4.00	7.80	5.90	28.05	28.37	0.23
TISTR 412		5.00	6.40	5.70	30.91	5.20	6.50	5.85	27.33	5.30	6.00	5.65	31.10	29.78	1.73
TISTR p13A1		5.00	6.50	5.75	30.30	4.80	4.70	4.75	40.99	5.20	7.00	6.10	25.61	32.30	6.44
TISTR BCA002		4.00	7.50	5.75	30.30	4.50	8.00	6.25	22.36	4.60	7.50	6.05	26.22	26.29	3.24
TISTR BCALg2		4.00	7.60	5.80	29.70	4.30	5.30	4.80	40.37	4.20	7.80	6.00	26.83	32.30	5.83

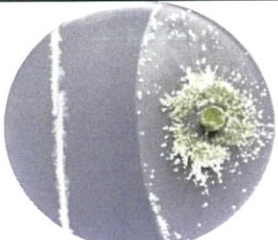
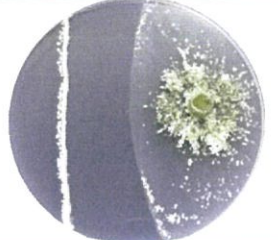


ตารางที่ ง (9) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM4 ด้วยวิธี dual culture

หมายเลข ไอโซเลท	TM4	หมายเลข ไอโซเลท	TM4
BKH 00431		BKH 02030	
BKH 00722		BKH 222	
BKH 00723		BKH 232	
BKH 01722		BKH 241	
BKH 01724		BKH 422	
BKH 01730		BKH 431	

ตารางที่ ง (9) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM4 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM4	หมายเลข ไอโซเลท	TM4
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		TISTR 8411	
BKH 1941		TISTR 612	

ตารางที่ ง (9) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM4 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM4	หมายเลข ไอโซเลท	TM4
TISTR 412		TISTR BCA002	
TISTR p13A1		TISTR BCA Lg2	

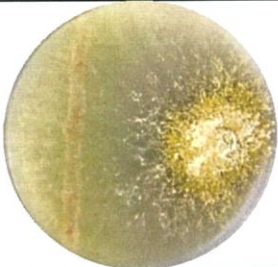
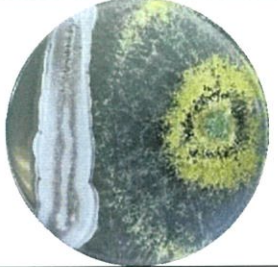
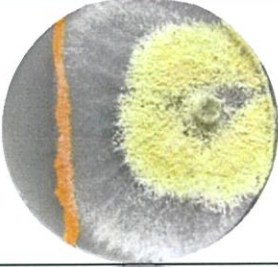
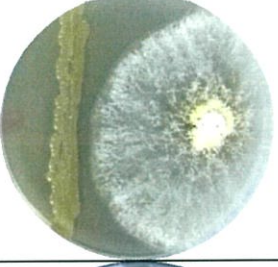
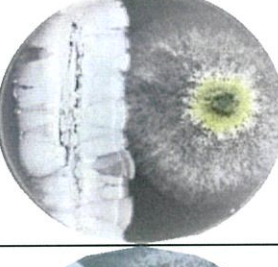
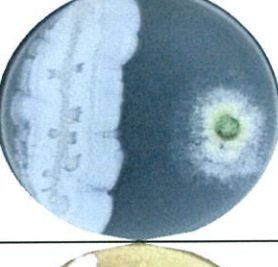

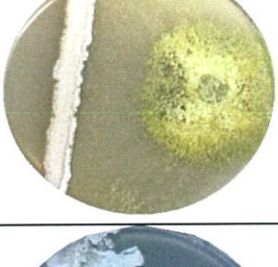

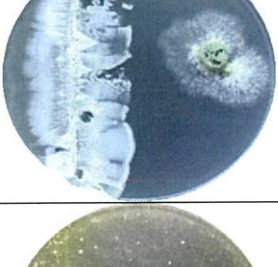

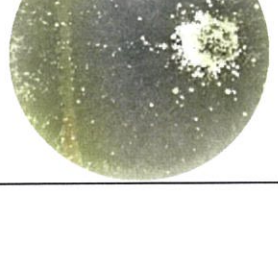
ตารางที่ ง (10) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM4 ด้วยวิธี dual culture

ไอโซเลท	TM4														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
Control		8.30	8.50	8.40		8.20	8.50	8.35		8.30	8.50	8.40			
BKH 00431		8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	-1.80	8.50	8.50	8.50	-1.19	-1.39	0.29
BKH 00722		6.00	8.50	7.25	13.69	8.00	8.50	8.25	1.20	7.00	8.50	7.75	7.74	7.54	5.10
BKH 00723		5.60	8.50	7.05	16.07	5.80	8.50	7.15	14.37	5.50	8.50	7.00	16.67	15.70	0.97
BKH 01722		5.10	7.20	6.15	26.79	6.40	8.10	7.25	13.17	5.00	7.00	6.00	28.57	22.84	6.88
BKH 01724		5.50	8.00	6.75	19.64	5.30	8.10	6.70	19.76	5.20	7.90	6.55	22.02	20.48	1.10
BKH 01730		5.10	7.90	6.50	22.62	5.10	8.00	6.55	21.56	4.90	7.70	6.30	25.00	23.06	1.44
BKH 02030		4.00	7.70	5.85	30.36	4.00	7.60	5.80	30.54	4.50	8.00	6.25	25.60	28.83	2.29
BKH 222		5.10	6.50	5.80	30.95	4.00	8.00	6.00	28.14	5.40	6.30	5.85	30.36	29.82	1.21
BKH 232		5.50	8.30	6.90	17.86	6.00	8.00	7.00	16.17	8.30	8.50	8.40	0.00	11.34	8.05
BKH 241		6.10	8.30	7.20	14.29	6.10	8.50	7.30	12.57	6.00	8.00	7.00	16.67	14.51	1.68
BKH 422		6.00	8.00	7.00	16.67	6.10	8.10	7.10	14.97	6.20	7.90	7.05	16.07	15.90	0.70
BKH 431		8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	-1.80	8.50	8.50	8.50	-1.19	-1.39	0.29
BKH 521		8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	-1.80	8.50	8.50	8.50	-1.19	-1.39	0.29

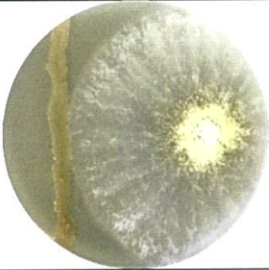
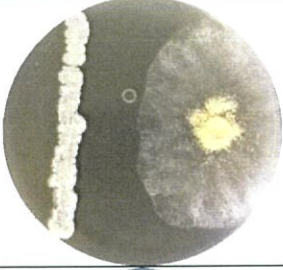
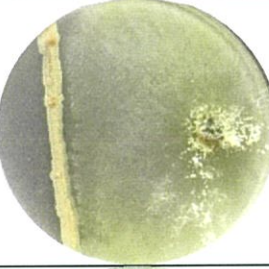
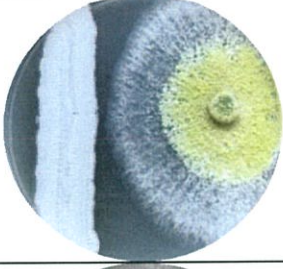
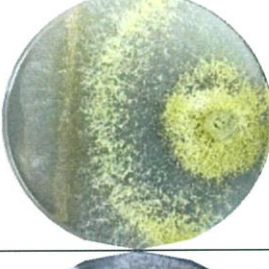
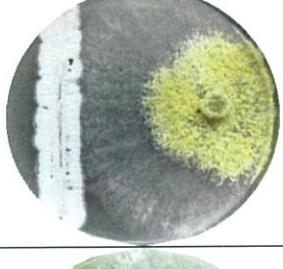
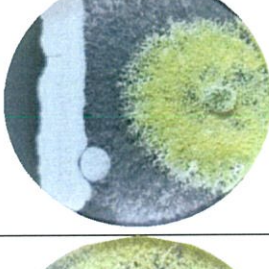
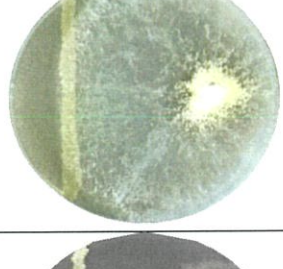
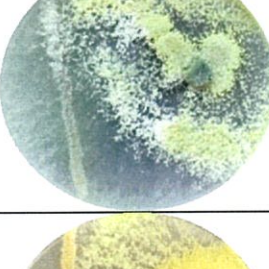
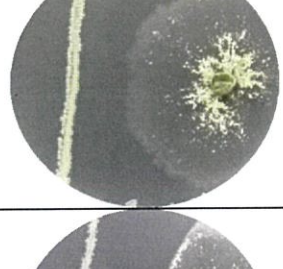

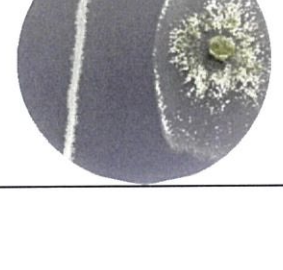
ตารางที่ ง (10) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM4 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

ไอโซเลท	TM4														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
BKH 731		5.70	8.50	7.10	15.48	8.50	8.50	8.50	-1.80	6.00	8.50	7.25	13.69	9.12	7.76
BKH 1322		7.20	8.50	7.85	6.55	8.50	8.50	8.50	-1.80	8.50	8.50	8.50	-1.19	1.19	3.80
BKH 1731		5.70	8.20	6.95	17.26	5.80	8.50	7.15	14.37	5.70	8.20	6.95	17.26	16.30	1.36
BKH 1922		8.20	8.50	8.35	0.60	8.10	8.50	8.30	0.60	8.20	8.50	8.35	0.60	0.60	0.00
BKH 1941		6.80	8.50	7.65	8.93	7.00	8.50	7.75	7.19	6.00	8.50	7.25	13.69	9.93	2.75
BKH 2023		3.00	5.50	4.25	49.40	3.50	5.00	4.25	49.10	3.20	6.00	4.60	45.24	47.91	1.90
BKH 2024		5.50	8.50	7.00	16.67	5.60	8.00	6.80	18.56	5.30	8.50	6.90	17.86	17.70	0.78
BKH 2026		4.30	6.80	5.55	33.93	5.00	7.00	6.00	28.14	4.00	5.70	4.85	42.26	34.78	5.79
BKH 2032		6.00	7.30	6.65	20.83	6.00	7.50	6.75	19.16	5.20	5.00	5.10	39.29	26.43	9.12
TISTR 8411		6.50	7.90	7.20	12.73	6.30	7.00	6.65	19.39	6.20	6.30	6.25	23.31	18.48	4.37
TISTR 612		3.70	7.60	5.65	31.52	4.00	7.90	5.95	27.88	4.00	7.70	5.85	28.22	29.20	1.64
TISTR 412		5.50	6.00	5.75	30.30	5.00	5.70	5.35	35.15	4.70	6.30	5.50	32.52	32.66	1.98
TISTR p13A1		5.00	6.50	5.75	30.30	5.00	6.50	5.75	30.30	4.90	6.30	5.60	31.29	30.63	0.46
TISTR BCA002		4.00	8.00	6.00	27.27	3.90	7.90	5.90	28.48	4.20	7.90	6.05	25.77	27.17	1.11
TISTR BCALg2		4.00	7.90	5.95	27.88	4.00	7.50	5.75	30.30	4.10	6.30	5.20	36.20	31.46	3.49

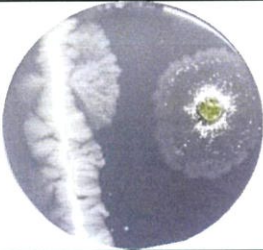
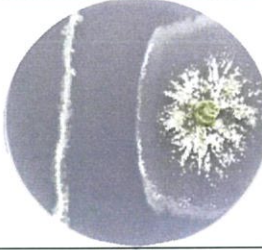
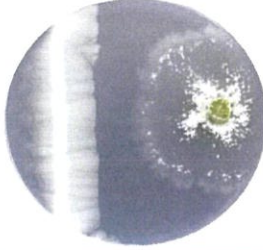
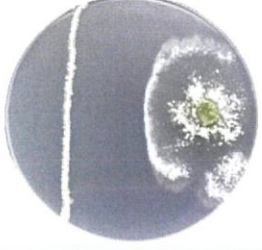
ตารางที่ ง (11) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญ
ของ *Trichoderma* spp. TM5 ด้วยวิธี dual culture

หมายเลข ไอโซเลท	TM5	หมายเลข ไอโซเลท	TM5
BKH 00431		BKH 02030	
BKH 00722		BKH 222	
BKH 00723		BKH 232	
BKH 01722		BKH 241	
BKH 01724		BKH 422	
BKH 01730		BKH 431	

ตารางที่ ง (11) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM5 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM5	หมายเลข ไอโซเลท	TM5
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		TISTR 8411	
BKH 1941		TISTR 612	

ตารางที่ ง (11) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM5 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM5	หมายเลข ไอโซเลท	TM5
TISTR 412		TISTR BCA002	
TISTR p13A1		TISTR BCA Lg2	



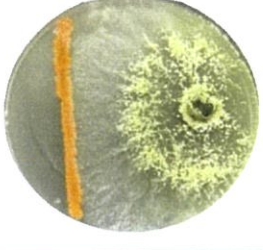
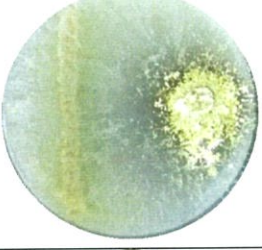

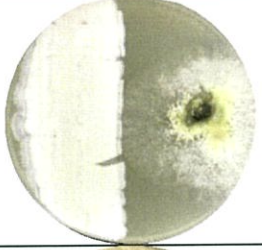

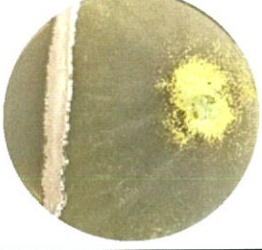
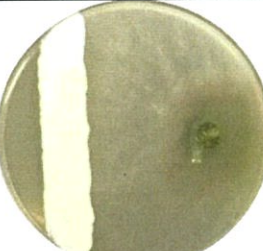
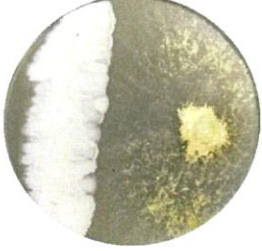
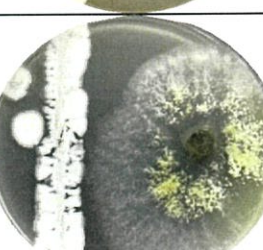

ตารางที่ ง (12) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM5 ด้วยวิธี dual culture

ไอโซเลท	TM5														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
Control		7.6	8.5	8.05		8.3	8.5	8.4		8.3	8.5	8.4			
BKH 00431		8.50	8.50	8.50	-5.59	8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	-1.19	-2.66	1.83
BKH 00722		6.20	8.20	7.20	10.56	6.00	8.00	7.00	16.67	6.00	8.50	7.25	13.69	13.64	2.49
BKH 00723		5.00	8.20	6.60	18.01	4.70	7.50	6.10	27.38	4.70	8.00	6.35	24.40	23.27	3.83
BKH 01722		5.80	8.30	7.05	12.42	5.70	8.50	7.10	15.48	5.80	8.40	7.10	15.48	14.46	1.27
BKH 01724		5.20	8.50	6.85	14.91	5.30	8.50	6.90	17.86	5.10	8.50	6.80	19.05	17.27	1.28
BKH 01730		6.00	8.50	7.25	9.94	5.70	8.50	7.10	15.48	6.00	8.50	7.25	13.69	13.03	2.27
BKH 02030		5.30	8.50	6.90	14.29	5.60	8.50	7.05	16.07	5.30	8.50	6.90	17.86	16.07	0.84
BKH 222		6.00	7.70	6.85	14.91	5.80	8.00	6.90	17.86	5.30	6.90	6.10	27.38	20.05	2.11
BKH 232		3.50	5.50	4.50	44.10	3.30	6.00	4.65	44.64	3.60	6.00	4.80	42.86	43.87	0.33
BKH 241		5.30	8.50	6.90	14.29	7.30	8.50	7.90	5.95	6.00	8.50	7.25	13.69	11.31	3.45
BKH 422		2.70	3.50	3.10	61.49	3.00	3.50	3.25	61.31	2.40	4.20	3.30	60.71	61.17	0.13
BKH 431		8.50	8.50	8.50	-5.59	8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	-1.19	-2.66	1.83
BKH 521		6.10	8.00	7.05	12.42	5.80	7.50	6.65	20.83	4.50	6.50	5.50	34.52	22.59	4.44

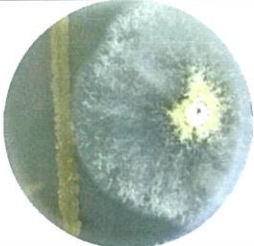
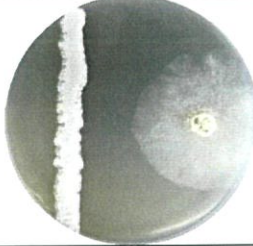
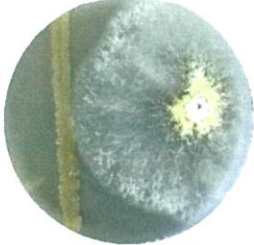
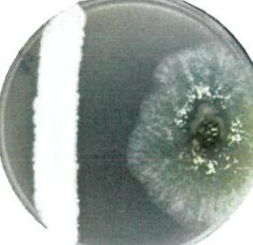
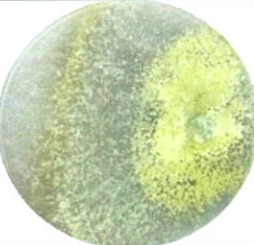
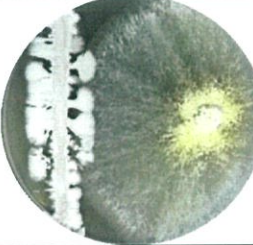
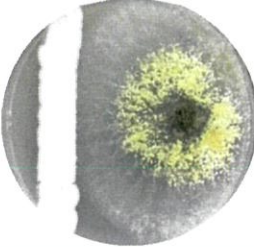
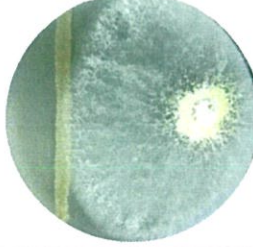
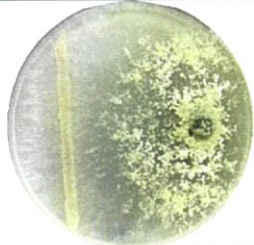

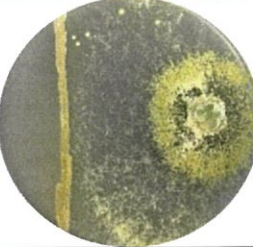
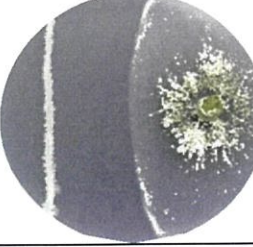
ตารางที่ ง (12) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM5 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

ไอโซเลท	TM5														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
BKH 731		8.50	8.50	8.50	-5.59	8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	-1.19	-2.66	1.83
BKH 1322		7.50	8.50	8.00	0.62	7.90	8.50	8.20	2.38	7.90	8.50	8.20	2.38	1.79	0.73
BKH 1731		6.00	8.10	7.05	12.42	5.80	8.00	6.90	17.86	5.70	8.20	6.95	17.26	15.85	2.24
BKH 1922		6.50	8.50	7.50	6.83	6.40	8.50	7.45	11.31	8.30	8.50	8.40	0.00	6.05	2.32
BKH 1941		7.50	8.50	8.00	0.62	6.00	8.50	7.25	13.69	6.20	8.50	7.35	12.50	8.94	5.40
BKH 2023		4.00	6.00	5.00	37.89	4.00	5.50	4.75	43.45	4.10	4.90	4.50	46.43	42.59	2.45
BKH 2024		4.60	8.00	6.30	21.74	5.10	8.10	6.60	21.43	4.60	7.90	6.25	25.60	22.92	0.64
BKH 2026		6.00	8.50	7.25	9.94	5.80	8.50	7.15	14.88	5.70	8.50	7.10	15.48	13.43	2.07
BKH 2032		6.20	8.00	7.10	11.80	7.00	8.30	7.65	8.93	6.00	8.00	7.00	16.67	12.47	1.53
TISTR 8411		5.00	6.70	5.85	29.09	5.30	6.60	5.95	28.74	4.70	6.00	5.35	36.31	31.38	3.49
TISTR 612		3.70	6.60	5.15	37.58	3.80	4.60	4.20	49.70	4.00	6.50	5.25	37.50	41.59	5.73
TISTR 412		3.60	3.90	3.75	54.55	3.70	3.50	3.60	56.89	3.50	4.30	3.90	53.57	55.00	1.39
TISTR p13A1		4.50	5.20	4.85	41.21	4.00	5.00	4.50	46.11	3.90	3.60	3.75	55.36	47.56	5.87
TISTR BCA002		3.80	6.00	4.90	40.61	4.00	6.00	5.00	40.12	4.00	6.00	5.00	40.48	40.40	0.21
TISTR BCALg2		3.80	3.50	3.65	55.76	3.90	6.00	4.95	40.72	3.60	4.10	3.85	54.17	50.21	6.75

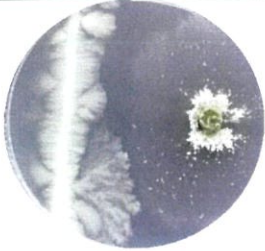

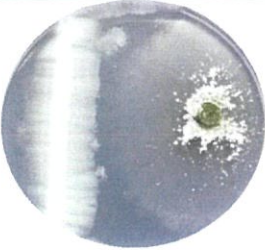

ตารางที่ ๑๓ (13) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM6 ด้วยวิธี dual culture

หมายเลข ไอโซเลท	TM6	หมายเลข ไอโซเลท	TM6
BKH 00431		BKH 02030	
BKH 00722		BKH 222	
BKH 00723		BKH 232	
BKH 01722		BKH 241	
BKH 01724		BKH 422	
BKH 01730		BKH 431	

ตารางที่ ง (13) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM6 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM6	หมายเลข ไอโซเลท	TM6
BKH 521		BKH 2023	
BKH 731		BKH 2024	
BKH 1322		BKH 2026	
BKH 1731		BKH 2032	
BKH 1922		TISTR 8411	
BKH 1941		TISTR 612	

ตารางที่ ง (13) แสดงรูปภาพการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM6 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	TM6	หมายเลข ไอโซเลท	TM6
TISTR 412		TISTR BCA002	
TISTR p13A1		TISTR BCA Lg2	

ตารางที่ ง (14) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM6 ด้วยวิธี dual culture

ไอโซเลท	TM6														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
Control		8.30	8.50	8.40		8.50	8.50	8.50		8.50	8.50	8.50			0.56
BKH 00431		8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	-0.40	4.27
BKH 00722		6.10	8.50	7.30	13.10	6.00	7.20	6.60	22.35	6.20	8.50	7.35	13.53	16.33	7.34
BKH 00723		3.50	6.10	4.80	42.86	4.20	8.00	6.10	28.24	5.00	7.50	6.25	26.47	32.52	3.05
BKH 01722		5.20	7.00	6.10	27.38	5.60	8.00	6.80	20.00	5.30	7.50	6.40	24.71	24.03	9.31
BKH 01724		8.00	8.50	8.25	1.79	5.00	8.50	6.75	20.59	8.50	8.50	8.50	0.00	7.46	2.27
BKH 01730		5.70	8.00	6.85	18.45	4.80	8.30	6.55	22.94	5.00	8.00	6.50	23.53	21.64	2.50
BKH 02030		6.00	8.00	7.00	16.67	6.70	8.10	7.40	12.94	7.20	8.00	7.60	10.59	13.40	2.50
BKH 222		8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	-0.40	0.56
BKH 232		4.50	4.50	4.50	46.43	3.50	7.00	5.25	38.24	4.40	8.00	6.20	27.06	37.24	7.94
BKH 241		6.00	8.50	7.25	13.69	6.00	8.50	7.25	14.71	6.10	8.50	7.30	14.12	14.17	0.42
BKH 422		5.00	8.50	6.75	19.64	4.90	8.50	6.70	21.18	5.20	8.50	6.85	19.41	20.08	0.78
BKH 431		8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	-0.40	0.56
BKH 521		7.00	8.10	7.55	10.12	4.30	6.00	5.15	39.41	5.80	7.00	6.40	24.71	24.75	11.96

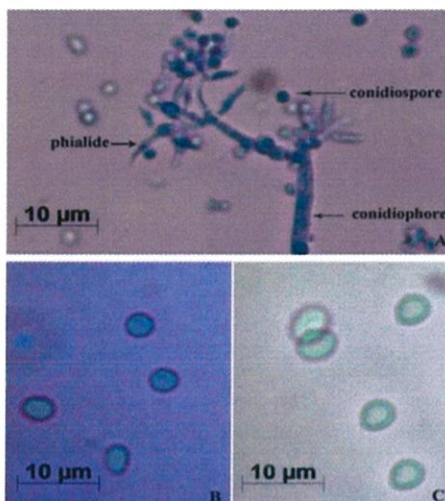
ตารางที่ ง (14) แสดงผลการทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. TM6 ด้วยวิธี dual culture (ต่อ)

ไอโซเลท	TM6														
	จำนวนซ้ำ	1	1	เฉลี่ย	% inhibition	2	2	เฉลี่ย	% inhibition	3	3	เฉลี่ย	% inhibition	Average % inhibition	S.D.
BKH 731		8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	-0.40	0.56
BKH 1322		8.50	8.50	8.50	-1.19	8.50	8.50	8.50	0.00	8.50	8.50	8.50	0.00	-0.40	0.56
BKH 1731		5.90	8.00	6.95	17.26	5.70	8.20	6.95	18.24	5.30	8.20	6.75	20.59	18.70	1.40
BKH 1922		6.40	8.50	7.45	11.31	8.00	8.50	8.25	2.94	6.30	8.30	7.30	14.12	9.46	4.75
BKH 1941		6.00	8.50	7.25	13.69	6.20	8.50	7.35	13.53	6.10	8.50	7.30	14.12	13.78	0.25
BKH 2023		4.40	5.40	4.90	41.67	3.30	4.40	3.85	54.71	3.90	4.50	4.20	50.59	48.99	5.44
BKH 2024		5.00	7.30	6.15	26.79	4.20	7.40	5.80	31.76	4.70	7.70	6.20	27.06	28.54	2.29
BKH 2026		4.90	8.00	6.45	23.21	5.40	8.10	6.75	20.59	5.20	8.00	6.60	22.35	22.05	1.09
BKH 2032		0.10	8.10	4.10	51.19	6.10	8.10	7.10	16.47	7.00	8.00	7.50	11.76	26.48	17.58
TISTR 8411		6.00	7.00	6.50	21.21	5.80	7.50	6.65	18.90	6.10	7.90	7.00	13.58	17.90	3.20
TISTR 612		4.20	7.50	5.85	29.09	4.10	7.50	5.80	29.27	4.40	7.50	5.95	26.54	28.30	1.24
TISTR 412		4.60	6.00	5.30	35.76	4.50	7.50	6.00	26.83	5.00	7.00	6.00	25.93	29.50	4.44
TISTR p13A1		4.50	8.00	6.25	24.24	5.00	7.50	6.25	23.78	5.00	6.50	5.75	29.01	25.68	2.36
TISTR BCA002		4.30	7.30	5.80	29.70	4.20	8.00	6.10	25.61	4.00	7.90	5.95	26.54	27.28	1.75
TISTR BCALg2		4.20	5.40	4.80	41.82	4.40	7.50	5.95	27.44	4.00	7.50	5.75	29.01	32.76	6.44

ภาคผนวก จ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

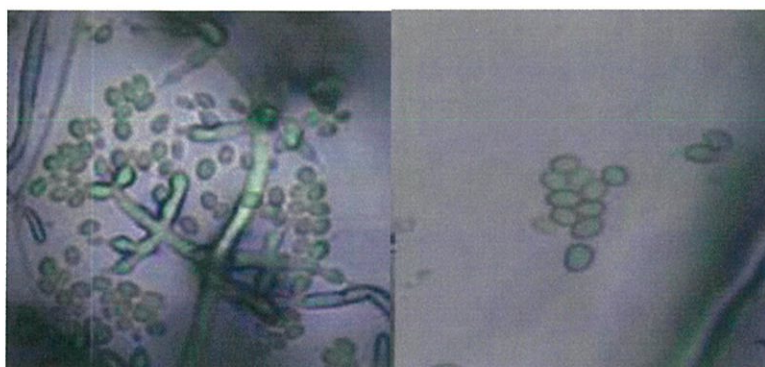
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM1, TM4 และ TM5 ทั้ง 3 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกับ เชื้อ *Trichoderma viride* (รูปที่ จ (1)) และ ไอโซเลท TM3 และ TM6 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* (รูปที่ จ (2))



ที่มา: Kannan *et. al.*, 2012

รูปที่ จ (1) แสดงลักษณะการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

Trichoderma viride



ที่มา: Shafiquzzaman, 2017

รูปที่ จ (2) แสดงลักษณะการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

Trichoderma longibrachitum

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวธิติยา รัตน์ะเควิล

E-mail 57050835@kmitl.ac.th



ประวัติการศึกษา

- 2557 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)
โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สอนกุลหลาบวิทยาลัย สมุทรปราการ
จังหวัดสมุทรปราการ
- 2560 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มสหกิจศึกษา

วันที่ 25 เดือน พฤษภาคม พ.ศ 2561

ข้าพเจ้า นางสาวธิตติยา รัตนะเควิล รหัสประจำตัว 57050835

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
ขอรับรองว่า

สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในโรงเพาะเห็ด
ชื่อภาษาอังกฤษ Potential Microbes Selection for Control Mushroom Pathogens in
Mushroom Farm

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความ
ซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจาก
เล่ม สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว
โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00 %

ลงชื่อ.....*ธิตติยา รัตนะเควิล*.....

(นางสาวธิตติยา รัตนะเควิล)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบสหกิจศึกษา
ของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลง
ชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....*คณิงกานต์ กลั่นบุศย์*.....

(ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ลงชื่อ.....*ตันติมา กำลั้ง*.....

(ดร.ตันติมา กำลั้ง)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ลงชื่อ.....*วิมลมาศ บุญมี*.....

(ดร.วิมลมาศ บุญมี)

กรรมการ