



# โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคในปาล์ม

**ชื่อนิสิต** นางสาวณัฐมณ วาจรัส รหัสประจำตัว 5932316923

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา  
**ปีการศึกษา** 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคในปาล์ม  
Antagonistic bacteria against *Marasmius* sp., pathogenic fungus of oil palm

ชื่อนิสิต นางสาวณัฐมณ วาจรัส

เลขประจำตัว 5932316923

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

## เรื่อง

แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคในปาล์ม

## โดย

นางสาวณัฐมณ วาจรัส

เลขประจำตัว 5932316923

## อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


ประจำปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

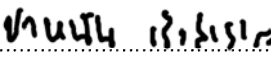
หัวข้อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรค  
ในปาล์ม  
โดย นางสาวณัฐมณ วาจรัส รหัสนิสิต 5932316923  
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ  
ปีการศึกษา 2562


---


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

  
..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญรณ์)

ชื่อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคในปาล์ม

นิสิตผู้ทำโครงการ นางสาวณัฐมณ วาจรัส รหัสประจำตัว 5932316923

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

---

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมัน โดยนำแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้สูงที่สุดสามอันดับแรกคือ สายพันธุ์ M27, M25 และ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 22.34, 21.99 และ 19.86 % ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา ซึ่งพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 65.59% รองลงมาคือสายพันธุ์ M25 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 62.37% และสายพันธุ์ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 55.91% จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปทดสอบเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *Marasmius* sp. คือ อาหาร LB โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งรามากที่สุดคือ สายพันธุ์ M27 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 65.59%, รองลงมาคือ สายพันธุ์ M25 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.37% และสายพันธุ์ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.91% จากนั้นทดสอบเพื่อหา pH ของอาหาร LB ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ซึ่งพบว่าค่า pH ของอาหาร LB เท่ากับ 7 ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งรา โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งรามากที่สุดคือ สายพันธุ์ M27 ที่แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ 67.78%, รองลงมาคือ สายพันธุ์ M25 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.23% และสายพันธุ์ M22 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 61.11% งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงความสามารถของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคในต้นปาล์ม น้ำมัน และทราบถึงภาวะเบื้องต้นที่ส่งเสริมความสามารถในการยับยั้งราของแบคทีเรีย ที่อาจนำไปปรับใช้เพื่อการควบคุมราที่ก่อโรคในพืชได้ต่อไป

**Project:** Antagonistic bacteria against *Marasmius* sp., pathogenic fungus of oil palm

**Student:** Miss Nattamon Vajaras ID 5932316923

**Advisor:** Assoc. Prof. Dr. Panan Rerngsamran

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University**

---

### Abstract

This research aimed to find bacteria that have ability to inhibit *Marasmius* sp. that causes Marasmius bunch rot in oil palm. Ten strains of bacteria were tested for their antifungal abilities using dual culture assay. The result found that top three bacteria that showed the highest antifungal ability against *Marasmius* sp. were strain M27, M25 and M22 with percentage of inhibition at 22.34, 21.99 and 19.86%, respectively. Therefore, these 3 bacterial strains were further evaluated for the antifungal activity using cell free supernatant. The result showed that the cell free supernatant of strain M27 gave the highest percentage of inhibition against *Marasmius* sp. at 65.59%, followed by strain M25 with 62.37% and strain M22 with 55.91% inhibition. After that, suitable media and pH conditions for these 3 strains to yield effective inhibition against *Marasmius* sp. were tested. It was found that LB medium gave the highest antifungal activity for all tested strains with 65.59%, 62.37% and 55.91% inhibition by strain M27, M25 and M22, respectively. Then pH of LB medium was varied, and it was found that pH 7 showed the highest inhibition against *Marasmius* sp. with 67.78%, 62.23% and 61.11% inhibition by strain M27, M25 and M22, respectively. This research demonstrated the ability of the three bacterial strains to inhibit *Marasmius* sp. which causes disease in oil palm, and obtained basic conditions that enhance antifungal ability of bacteria which may be applied to control fungal plant pathogens.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการฯ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ในการทำโครงการนี้ อีกทั้งยังกรุณาตรวจสอบและแก้ไขปรับปรุงโครงการฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อโครงการ และอำนวยความสะดวกให้การวิจัยราบรื่นและเป็นไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ ซึ่งได้แก่นางสาวสิริตา เสียมไหม นายสิรภพ ภูมิภูติกุล และนายอัษฎาวุธ แก้วกล้า ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ คำปรึกษาชี้แนะแนวทางการดำเนินงานในการทำโครงการนี้ จนโครงการนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นายธนพล กุลวิจิตร นิสิตในห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ ที่เป็นเพื่อนคู่คิด ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี และร่วมกันแก้ปัญหา ตลอดการทำโครงการนี้ ขอขอบคุณ นางสาวฟิล์มภา ทองอ่อน ห้องปฏิบัติ 1904/14 นายทรงเกียรติ สุขมงคลชัย ห้องปฏิบัติ 1804/15 เพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติชั้น 19 และห้องปฏิบัติ 1704/13 1804/13 1804/16 รวมถึงพี่ ๆ ปริญญาเอกและปริญญาโท และเพื่อน ๆ นิสิตปริญญาตรีในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนที่สนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว รวมถึงกัลยาณมิตรทุกคน ที่คอยสนับสนุน และเป็นกำลังใจสำคัญในการทำโครงการ และสุดท้ายขอขอบคุณตนเองที่อดทน ตั้งใจศึกษาเล่าเรียน และนำความรู้ที่ได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยามาปรับใช้ในการดำเนินงานในการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

## สารบัญ

	หน้า
หน้าอนุมัติโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์การทดลอง	12
บทที่ 2 เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์	13
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	23
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	38
ภาคผนวก ข สารละลายและบัฟเฟอร์	40
ภาคผนวก ค ความสามารถในการยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp. โดยแบคทีเรีย	41



## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1: ภาพตัดขวางของผลปาล์มน้ำมัน	1
รูปที่ 2: สถิติส่งออกน้ำมันปาล์มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 ถึง 2561	4
รูปที่ 3: ลักษณะอาการของทะลายปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคทะลายเน่า	6
รูปที่ 4: กลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการต้านทานของพืชด้วยกลไก systemic acquired resistance (SAR) และ induce systemic resistance (ISR)	9
รูปที่ 5: การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp. ด้วยวิธี dual culture	16
รูปที่ 6: การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา (cell free supernatant)	17
รูปที่ 7: การยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของสายพันธุ์ M27 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม	24
รูปที่ 8: การยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของสายพันธุ์ M25 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม	24
รูปที่ 9: การยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของสายพันธุ์ M22 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม	24

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp. โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture	23
ตารางที่ 2: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27, M25 และ M22	25
ตารางที่ 3: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27, M25 และ M22 เมื่อเลี้ยงใน LB, NB และ TSB	25
ตารางที่ 4: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27, M25 และ M22 ในอาหาร LB ที่ค่า pH 6, 7 และ 8	26

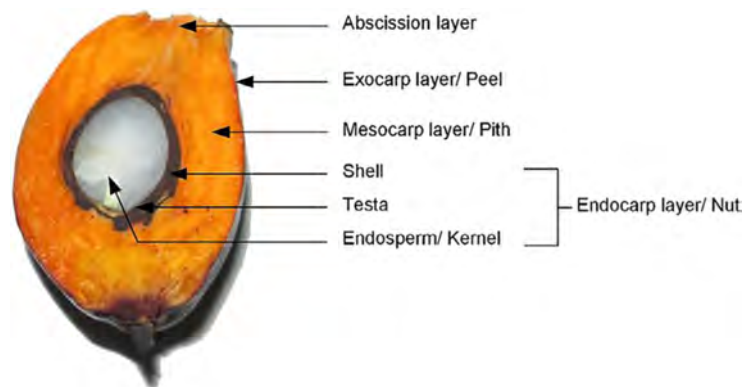
# บทที่ 1

## บทนำ

### ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Elaeis guineensis* Jacq. เป็นพืชที่เหมาะสมกับภูมิประเทศที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น มีปริมาณน้ำฝนกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอตลอดปี เจริญได้ดีในดินร่วนถึงเหนียว ดั้งนั้นประเทศที่อยู่ในแนวแถบเส้นศูนย์สูตรจึงนิยมปลูกปาล์มน้ำมัน (Konan และคณะ, 2006) โดยเฉพาะประเทศในทวีปแอฟริกา, แอฟริกาใต้, อเมริกากลาง รวมทั้งประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งได้แก่ อินโดนีเซีย, มาเลเซีย และไทย (Vijay และคณะ, 2016) ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทั่วโลกและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงถึง 50 ล้านดอลลาร์สหรัฐ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ให้ผลผลิตสูงคือให้ปริมาณน้ำมันมากเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น (Konan และคณะ, 2006) และผลผลิตสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง, สารเคมีทางการเกษตร และเชื้อเพลิงชีวภาพ (Nicholas และคณะ, 2018)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชยืนต้น อยู่ในวงศ์ Arecaceae หรือ Palmae วงศ์ย่อย (subfamily) Arecoideae เช่นเดียวกับมะพร้าว และอยู่ในสกุล *Elaeis* (Kok และคณะ, 2015) *Elaeis* มีสองสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจคือ สายพันธุ์ *E. oleifera* ที่มีถิ่นกำเนิดบริเวณทวีปอเมริกา จึงอาจเรียกว่า American oil palm และสายพันธุ์ *E. guineensis* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดบริเวณทวีปแอฟริกา จึงอาจเรียกว่า Africa oil palm ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในเชิงการค้าในปัจจุบัน (Kok และคณะ, 2015) ผลของปาล์มน้ำมันประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย ส่วนเปลือกนอก (exocarp), ชั้นมีโซคาร์ป (mesocarp), ส่วนเอนโดคาร์ป (endocarp) ที่ประกอบด้วยเปลือกเมล็ด (shell), เทสตา (testa), และเอนโดสเปิร์ม (endosperm)



รูปที่ 1 : ภาพตัดขวางของผลปาล์มน้ำมัน (Harun และคณะ, 2016)

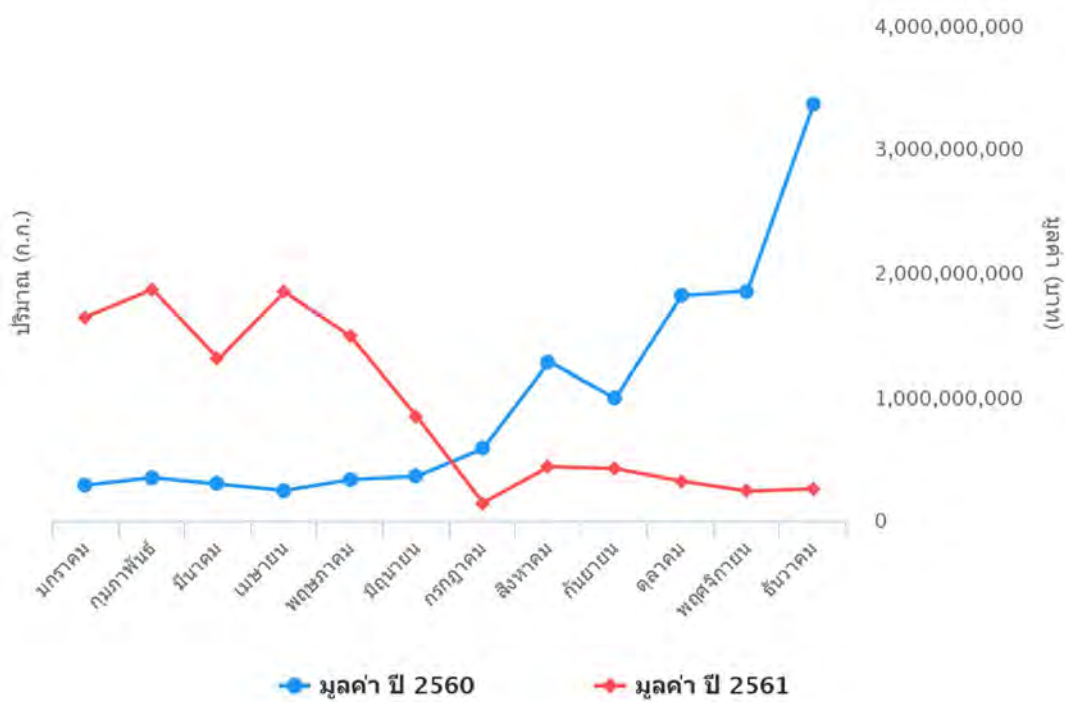
สายพันธุ์ *E. oleifera* มีถิ่นกำเนิดทางอเมริกาใต้และอเมริกากลาง สายพันธุ์นี้ไม่นิยมปลูกในทางการค้าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ *E. guineensis* เนื่องจากให้ผลผลิตที่น้อย แต่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวมีสมบัติเด่นบางประการที่เป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณภาพมากขึ้น เช่น มีความต้านทานต่อโรคตาเน่า (Corley และคณะ, 2015b) การผสมกันของสายพันธุ์ *E. oleifera* กับสายพันธุ์ *E. guineensis* ทำให้ได้สายพันธุ์ลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคตาเน่าซึ่งเป็นลักษณะเด่นของสายพันธุ์ *E. oleifera* และได้ผลผลิตที่สูงเหมือนสายพันธุ์ *E. guineensis* (Corley และคณะ, 2015b) ในทวีปอเมริกานิยมปลูกปาล์มน้ำมันในหลายประเทศ ได้แก่ บราซิล, โคลัมเบีย, คอสตาริกา และเอกวาดอร์ เป็นต้น โดยประเทศโคลัมเบียเป็นประเทศที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันรายใหญ่ของอเมริกาใต้ ซึ่งในปี พ.ศ. 2553 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันถึง 2,525,000 ไร่ และเพิ่มขึ้นอีก 406,250 ไร่ในปี พ.ศ. 2556 และในปี พ.ศ. 2555 โคลัมเบียสามารถผลิตปาล์มน้ำมันได้ถึง 900,000 ตัน และส่งออกมากกว่า 300,000 ตันในปี พ.ศ. 2550 และ 2551 แต่การส่งออกปาล์มน้ำมันของโคลัมเบียลดลงในปี พ.ศ. 2554 เนื่องจากภายในประเทศมีความต้องการปาล์มน้ำมันมากขึ้นเพื่อนำไปผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยใช้ปาล์มน้ำมันมากกว่า 400,000 ตัน เมื่อมีการระบาดของโรคตาเน่าในปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ *E. oleifera* ในอเมริกาใต้ โคลัมเบียจึงแก้ปัญหาโดยปลูกสายพันธุ์ลูกผสมของสายพันธุ์ *E. oleifera* กับสายพันธุ์ *E. guineensis* ประเทศบราซิลมีภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมสำหรับการปลูกปาล์มน้ำมัน โดยในปี พ.ศ. 2555 บราซิลผลิตน้ำมันได้ 300,000 ตัน จากปาล์มน้ำมัน 687,500 ไร่ (Corley และคณะ, 2015b) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการปลูกปาล์มน้ำมันในทวีปอเมริกาจะมีการพัฒนามากขึ้นแต่ยังคงช้ากว่าทวีปเอเชีย (Corley และคณะ, 2015b)

สายพันธุ์ *E. guineensis* มีถิ่นกำเนิดบริเวณทวีปแอฟริกาซึ่งนิยมปลูกในทางการค้ามากกว่าสายพันธุ์ *E. oleifera* พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกคือ พันธุ์ลูกผสมแบบเทเนอร์รา (*tenera*) ซึ่งเกิดจากการผสมของพันธุ์แมดูร่า (*Dura*) และพันธุ์พ็อพิซิเฟอรา (*pisifera*) พันธุ์แมดูร่ามีลักษณะจีโนไทป์เป็น  $sh^+sh^+$  ซึ่งผลปาล์มจะมีส่วนของเอนโดคาร์ปที่หนาและส่วนมีโซคาร์ปที่บาง ลักษณะดังกล่าวของสายพันธุ์แมดูร่าจึงให้ปริมาณน้ำมันต่อผลปาล์มที่ต่ำ นิยมนำมาใช้เป็นพันธุ์แม่ในการปรับปรุงพันธุ์ ส่วนพันธุ์พ็อพิซิเฟอรา มีลักษณะจีโนไทป์เป็น  $sh^-sh^-$  ซึ่งผลปาล์มจะไม่มีเอนโดคาร์ป และจะมีส่วนมีโซคาร์ปที่หนา ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันต่อผลปาล์มที่สูง แต่ทะลายของสายพันธุ์นี้มีขนาดเล็กและมักฝ่อเพราะช่อดอกตัวเมียในสายพันธุ์นี้มักเป็นหมัน ทำให้มักได้ปริมาณผลปาล์มที่ต่ำหรืออาจไม่มีเลย ด้วยสาเหตุนี้ในปัจจุบันจึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธีการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์พ็อพิซิเฟอราและพันธุ์แมดูร่า ทำให้ได้ลูกผสมพันธุ์เทเนอร์ราที่มีลักษณะจีโนไทป์เป็น  $sh^+sh^-$  ซึ่งทำให้สายพันธุ์นี้ผลปาล์มที่มีส่วนมีโซคาร์ปที่หนา และช่อดอกตัวเมียไม่เป็นหมันจึงมีปริมาณผลปาล์มที่สูงและสม่ำเสมอ สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ สายพันธุ์เทเนอร์ราจึงเป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน

(Hermine Bille และคณะ, 2013; Konan และคณะ, 2006) ถึงแม้สายพันธุ์เทเนอราจะเป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน แต่ขั้นตอนการปรับปรุงสายพันธุ์ดังกล่าวให้มีสมบัติตามที่ต้องการนั้นจำเป็นต้องใช้เวลาในการพัฒนานาน รวมถึงต้องอาศัยองค์ความรู้ในการพัฒนาสายพันธุ์ดังกล่าวให้ได้คุณสมบัติตามที่ต้องการด้วย (Khomphet และคณะ, 2018) สำหรับอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันในทวีปแอฟริกา พบว่าราคาผลิตภัณฑ์ปาล์มน้ำมันมีราคาค่อนข้างสูง ถึงแม้ค่าใช้จ่ายในการปลูกต่อไร่ใกล้เคียงกับประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ปริมาณผลผลิตที่ได้มีต่ำกว่า เนื่องจากข้อจำกัดทางภูมิอากาศ ทั้งนี้ในทวีปแอฟริกานิยมปลูกปาล์มน้ำมันในหลายประเทศ ได้แก่ ไนจีเรีย, คองโก และโกตดิวัวร์ เป็นต้น (Corley และคณะ, 2015b)

ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นแหล่งผลิตปาล์มน้ำมันที่สำคัญของโลก เนื่องจากมีสภาพอากาศร้อนชื้นและภูมิประเทศอยู่บริเวณเส้นศูนย์สูตร ประเทศเหล่านี้ ได้แก่ อินโดนีเซีย, มาเลเซีย และไทย (ศาตนันท์ สุจิตโต และคณะ, 2560) ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้น อินโดนีเซียถือเป็นผู้ผลิตปาล์มน้ำมันรายใหญ่ของเอเชียและของโลก มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุด และสภาพภูมิอากาศเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของปาล์ม (เอกนรินทร์ จันทร์รักษ์ และคณะ, 2558) ในปี พ.ศ. 2561 อินโดนีเซียสามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้ถึง 115,267 กิโลตัน ซึ่งเป็นอันดับหนึ่งของโลก รองลงมาคือมาเลเซียที่สามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้ถึง 98,419 กิโลตัน และอันดับสามคือ ไทย ที่สามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้ 15,535 กิโลตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) สำหรับการปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทยนั้น ภาคใต้เป็นพื้นที่ที่มีความเหมาะสมกับการปลูกปาล์มน้ำมันที่สุด โดยในปี พ.ศ. 2557 การปลูกปาล์มน้ำมันขยายไปยังภาคเหนือ ภาคอีสาน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากขึ้น (ศาตนันท์ สุจิตโต และคณะ, 2560) ในปี พ.ศ. 2562 ปริมาณการปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทยมีมากถึง 6,002,400 ไร่ โดยแบ่งเป็นภาคใต้ 5,183,324 ไร่ ภาคกลาง 521,411 ไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 209,072 ไร่ และภาคเหนือ 88,593 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทยที่นิยมปลูกปาล์มน้ำมันเป็นหลัก ได้แก่ จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง (ศิริวัลย์ สิริศักดิ์ และคณะ, 2560) สุราษฎร์ธานีเป็นจังหวัดที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุดในภาคใต้ โดยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากถึง 1,230,556 ไร่ และได้ผลผลิตปาล์มน้ำมัน 3,897,979 ตัน ในปี พ.ศ. 2562 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) ปาล์มน้ำมันมีความสำคัญอย่างมากในด้านเศรษฐกิจของโลกและประเทศไทย เนื่องจากผลผลิตสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้านดังที่กล่าวไปข้างต้น และสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ทั้งด้านอุปโภคและบริโภค โดยเฉพาะด้านอุตสาหกรรมอาหาร โดยปาล์มน้ำมันนิยมนำมาผลิตเป็นน้ำมันพืชเพื่อใช้ในการบริโภค และยังมีนิยมนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพภายในประเทศ โดยมีแนวโน้มการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพมากขึ้น (Jensen และคณะ, 2019) ประเทศไทยมีการส่งออกน้ำมันปาล์มมูลค่าสูงถึง 380 ล้านบาทในปี พ.ศ. 2560 และมีมูลค่า 280 ล้านบาทในปี พ.ศ. 2561 ดังรูปที่ 2

(สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) นอกจากนี้ ส่วนประกอบของปาล์มน้ำมันที่เหลือใช้ เช่น ทางใบปาล์มน้ำมัน (oil palm frond), กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน (palm kernel cake) และกากปาล์มน้ำมัน (oil palm meal) ยังสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ได้อีกด้วย (Seephueak และคณะ, 2018) โดยปกติแล้ว ทางใบปาล์มน้ำมันจะถูกทิ้งให้ย่อยสลายไปตามธรรมชาติจนกลายเป็นปุ๋ย แต่ในปัจจุบันทางใบปาล์มน้ำมัน, กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน และกากปาล์มน้ำมันสามารถนำมาผลิตเป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ แต่ยังมีข้อจำกัด และจำเป็นต้องศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณภาพเพิ่มเติม (ปิ่น จันจุฬา, 2558a, b)



รูปที่ 2 : สถิติส่งออกน้ำมันปาล์มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 ถึง 2561

([http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S\\_YEAR=2560&E\\_YEAR=2561&PRODUCT\\_GROUP=5255&wf\\_search=&WF\\_SEARCH=Y](http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S_YEAR=2560&E_YEAR=2561&PRODUCT_GROUP=5255&wf_search=&WF_SEARCH=Y))

### โรคของปาล์มน้ำมัน

ถึงแม้ว่าปาล์มน้ำมันจะให้ผลผลิตสูง แต่เกษตรกรยังประสบกับปัญหาผลผลิตต่ำ เนื่องจากการเกิดโรคต่าง ๆ มากมายที่มีสาเหตุจากทั้งที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์และที่ไม่ได้มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น โรคที่เกิดขึ้นระหว่างการงอกของเมล็ด ได้แก่ โรคบราวน์เจอร์ม (brown germ disease) ที่จะเกิดจุดสีน้ำตาลที่ปลายรากและยอดอ่อน จากนั้นจุดสีน้ำตาลจะพัฒนาเป็นแผลทำให้รากและยอดอ่อนเน่าตาย ซึ่งมีสาเหตุจากราหลายชนิด ได้แก่ *Aspergillus spp.*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* และ *Penicillium spp.* (Corley และคณะ, 2015a;

Pornsuriya และคณะ, 2013), โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ซึ่งอาการของโรคจะเกิดแผลสีน้ำตาล ขึ้นที่ใบ ทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย รอบ ๆ แผลจะเป็นสีเหลือง โดยมีสาเหตุจาก *Collectotrichum* sp., โรคต้นกล้าไหม้ (seedling blight) ที่อาการจะเกิดกับใบอ่อน โดยเกิดเป็นจุดสีน้ำตาลบนใบ มีสาเหตุมาจาก *Curvularia* sp., โรคทางใบปิด (crown disease) ที่อาการของโรคจะเกิดบริเวณใบยอดตรงส่วนกลางใบ ซึ่งจะมีแผลสีน้ำตาล เมื่อแผลมีขนาดใหญ่ขึ้น ใบจะไม่สามารถลื้อออกมาได้ และเกิดอาการเน่า โดยโรคทางใบปิดนี้ไม่ได้เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ แต่สันนิษฐานว่าเป็นอาการที่เกิดจากสรีระของพืชและถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรม (Corley และคณะ, 2015a), โรคตาเน่า (fatal yellowing disease) เกิดจาก *Phytophthora palmivora* (De Assis Costa และคณะ, 2018), โรคใบจุด (leaf spot) เกิดจาก *Curvularia oryzae* (จิตรรา กิตติโมรากุล และคณะ, 2557), โรคเมล็ดเน่า (seed rot) เกิดจาก *Schizophyllum commune* (Pornsuriya และคณะ, 2013) และโรคทะลายเน่า (bunch rot) เกิดจาก *Marasmius palmivorus* เป็นต้น (พรสวรรค์ ต๊ะเสี้ยว และคณะ, 2561)

โรคทะลายเน่า เป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อเกษตรกรปาล์มน้ำมันอย่างมาก โดยมีการระบาดของโรคนี้เกือบทุกประเทศที่มีการปลูกปาล์มน้ำมัน การแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุ *M. palmivorus* จะแพร่กระจายได้ด้วยลมซึ่งทำให้การแพร่ระบาดเป็นไปอย่างรวดเร็ว ในการก่อโรคทะลายเน่านี้ *M. palmivorus* จะสร้างเส้นใยปกคลุมทั่วทั้งทะลายและผล ถ้ามีสภาพอากาศชื้นหรือความชื้นสูง เส้นใยราจะปกคลุมทะลายปาล์มอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการเน่าและเกิดสีน้ำตาล (รูปที่ 3) ผลและทะลายที่เน่าจะเป็นแหล่งแพร่กระจายราไปยังบริเวณอื่น ซึ่งเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคทะลายเน่าในสวนปาล์ม (พรสวรรค์ ต๊ะเสี้ยว และคณะ, 2561) ดังนั้นการควบคุมการระบาดของรา จึงต้องจัดการแยกทะลายและผลที่เน่าออกจากสวนปาล์มเพื่อไม่ให้มีการระบาด (Chung, 2012; พรสวรรค์ ต๊ะเสี้ยว และคณะ, 2561) ราในสกุล *Marasmius* พบได้ทั่วไปในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อยู่ในไฟลัม Basidiomycota วงศ์ Marasmiaceae และมีหลากหลายสปีชีส์ ยกตัวอย่างเช่น *M. apatelius*, *M. guyanensis*, *M. nigrobrunneus*, *M. ruforotula*, และ *M. straminiceps* นอกจากนี้ *M. palmivorus* ที่ก่อโรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมันดังกล่าว ยังก่อโรคได้ในพืชเศรษฐกิจอีกมากมาย เช่น สลัด, สับปะรด และกล้วย เป็นต้น (ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ, 2555)



รูปที่ 3 : ลักษณะอาการของทะลายปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคทะลายเน่า

(คลินิกปาล์มน้ำมัน - Palm Clinic, 2560)

ปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีกำจัดและควบคุมรา เช่น สารเคมีฆ่าราที่มีส่วนผสมของทองแดง ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้สมดุลของระบบนิเวศเสียหาย (Escribano-Viana และคณะ, 2018) และนอกจากนี้ การใช้สารเคมีกำจัดรายังส่งผลให้สมดุลของจุลินทรีย์ภายในดินเสียหาย ทำให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพืชลดลง และมีจุลินทรีย์ก่อโรคพืชเพิ่มมากขึ้น และอาจมีการพัฒนาเป็นสารพันธุื้อสารเคมีเหล่านี้ต่อไป (Shanmugam และคณะ, 2011) การใช้สารเคมีส่งผลทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในดิน โดยเฉพาะที่ประมาณ 15 เซนติเมตรจากผิวดิน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีจุลินทรีย์มากที่สุด (Al-Assiuty และคณะ, 2014) จึงส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม และมีข้อจำกัดมากมายในการใช้งาน ดังนั้นจึงมีมาตรการเพื่อควบคุมการใช้สารเคมีกำจัดรา และเปลี่ยนมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงและเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

### การควบคุมทางชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพ คือ การใช้สิ่งมีชีวิตใดสิ่งมีชีวิตหนึ่ง เช่น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) เพื่อลดจำนวนประชากรของอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่ง เช่น เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช (Bale และคณะ, 2008) การควบคุมทางชีวภาพเป็นแนวทางที่นิยมนำมาใช้เพื่อควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องจากปัจจุบันมีการตระหนักถึงผลเสียของการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชที่เกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อม, สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยเฉพาะมนุษย์ หรือทำให้เกิดสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคที่ต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ในการควบคุม จึงเป็นสาเหตุที่ปัจจุบันการควบคุมทางชีวภาพได้รับความสนใจอย่างมาก (Jamalizadeh และคณะ, 2011) กลไกที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชจะขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ทางนิเวศวิทยาโดยมีทั้งหมด 4 แบบ คือ (Jamalizadeh และคณะ, 2011)



## 1) ภาวะแข่งขัน (competition)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการแย่งสารอาหาร แร่ธาตุต่าง ๆ หรือปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อเชื้อก่อโรค แม้กระทั่งพื้นที่อยู่อาศัย โดยเมื่อสารอาหารและแร่ธาตุมีอย่างจำกัด จะส่งผลให้การเจริญและการงอกของเชื้อก่อโรคลดลง ทำให้หยุดการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคได้ (Kohl และคณะ, 2019) ตัวอย่างเช่น การควบคุมเชื้อก่อโรคโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ที่มีความสามารถในการแย่งธาตุเหล็กภายในดินโดยการผลิตสารซิเดอโรฟอรัส (siderophore) โดยซิเดอโรฟอรัสจะไปแย่งจับกับธาตุเหล็กภายในดินที่อยู่รอบ ๆ รากพืช ทำให้เชื้อก่อโรคได้รับผลกระทบจากการลดลงของธาตุเหล็กทำให้ไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้ และซิเดอโรฟอรัสยังเป็นสารที่เป็นประโยชน์แก่พืชไม่เพียงแต่ลดการเจริญของเชื้อก่อโรค แต่ยังสามารถนำเอาธาตุเหล็กไปใช้ประโยชน์และทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นด้วย (Wang และคณะ, 2018) นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้แก่ *Pseudomonas* sp. ที่มีความสามารถในการครอบครองพื้นที่บริเวณรากพืชโดยสามารถสร้างสารที่ช่วยทำให้ยึดเกาะกับพื้นผิวของพืชได้ดี และสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Jamalizadeh และคณะ, 2011; Wang และคณะ, 2018) การควบคุมโรคที่เกิดกับพืชหลังจากการเก็บเกี่ยวจะนิยมใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อก่อโรรมากกว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากคำนึงถึงความปลอดภัยในการบริโภคเป็นหลัก (Jamalizadeh และคณะ, 2011) การควบคุมแบบแข่งขันต้องคำนึงถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ด้วย เช่น ปริมาณสารอาหารในดิน ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่ต้องเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เป็นต้น (Kohl และคณะ, 2019)

## 2) ภาวะหลังสารยับยั้งการเจริญ (antibiosis)

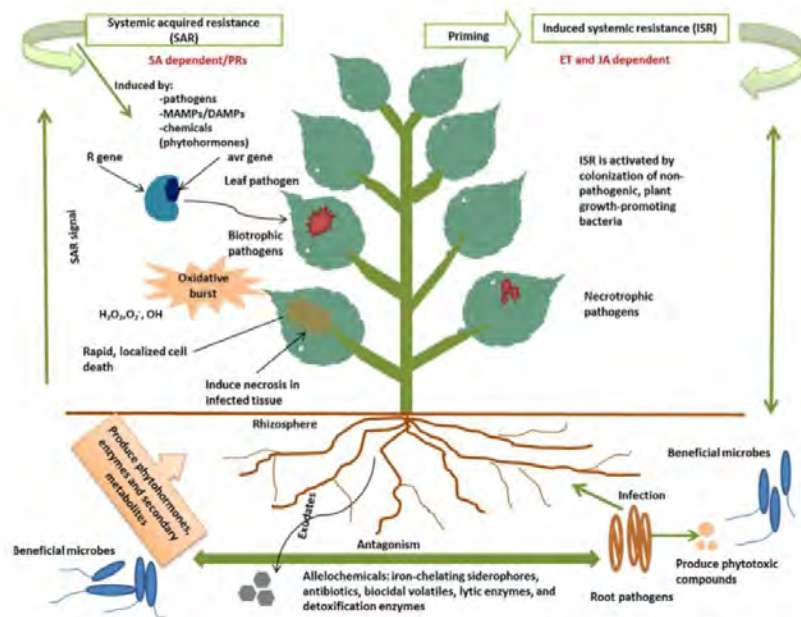
จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคโดยการหลั่งสารออกมานอกเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite), สารปฏิชีวนะ (antibiotic) และ เอนไซม์ (enzyme) เป็นต้น (Jamalizadeh และคณะ, 2011) กลไกนี้ได้รับการกล่าวว่าเป็นกลไกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรค เนื่องจากสารต้านจุลชีพที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิตมีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่กว้าง (broad-spectrum activity) ตัวอย่างเช่น *Bacillus* sp. ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ เช่น อิทูริน (iturin), เซอร์แฟคติน (surfactin) และเฟนไจซิน (fengycin) และ *Pseudomonas* sp. ซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น DAPG, ไพร์โรลนิตริน (pyrrolnitrin) และฟีนาซีน (phenazine) เป็นต้น (Kohl และคณะ, 2019)

### 3) ภาวะปรสิต (parasitism)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเข้าทำลายเชื้อก่อโรคได้โดยตรง เนื่องจากมีสมบัติเป็นปรสิต สามารถเข้าไปเจริญภายในเชื้อก่อโรคโดยการสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค เช่น โคติเนส เซลลูเลส และบีตา-1,3-กลูคาเนส เป็นต้น (Jamalizadeh และคณะ, 2011) โดยมีรายงานว่า *Pseudomonas* sp. สามารถผลิตโคติเนสและเซลลูเลส และในการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Pythium aphanidermatum* และ *Rhizoctonia solani* ได้ อีกตัวอย่างหนึ่งคือ *Trichoderma* sp. ซึ่งเป็นราที่อาศัยอย่างอิสระอยู่ภายในดิน ที่มีรายงานถึงความสามารถในการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีการเป็นปรสิตต่อเชื้อก่อโรค เช่น *R. solani* และ *Sclerotium rolfsii* (Elad และคณะ, 1983)

### 4) การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการต้านทาน (induce systemic resistance)

การเหนี่ยวนำให้เกิดการต้านทานของพืชสามารถเกิดได้จากการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคและเชื้อไม่ก่อโรค ดังรูปที่ 4 เมื่อพืชถูกกระตุ้นโดยเชื้อก่อโรคจะทำให้เซลล์พืชเกิดการตายอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response) จากนั้นจะมีการส่งสัญญาณทางชีวเคมีไปยังส่วนต่าง ๆ ซึ่งโมเลกุลส่งสัญญาณ คือ กรดซาลิซิลิก (salicylic acid) เพื่อไปกระตุ้นชุดยีน PR ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานของพืชให้ตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อก่อโรคต่อไป โดยเรียกกลไกนี้ว่า systemic acquired resistance หรือ SAR (Choudhary และคณะ, 2007; Syed Ab Rahman และคณะ, 2018) นอกจากนี้การเหนี่ยวนำให้เกิดการต้านทานของพืชยังสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยเชื้อที่ไม่ก่อโรค ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) (Ramamoorthy และคณะ, 2001) โดยเชื้อที่ไม่ก่อโรคจะไปกระตุ้นการแสดงของชุดยีน PR โดยการส่งสัญญาณของกรดจัสโมนิก (jasmonic acid, JA) และฮอร์โมนเอทิลีน (ethylene) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืช เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค โดยเรียกกลไกนี้ว่า induce systemic resistance หรือ ISR (Choudhary และคณะ, 2007)



รูปที่ 4 : กลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการต้านทานของพืชด้วยกลไก systemic acquired resistance (SAR) และ induce systemic resistance (ISR) (Syed Ab Rahman และคณะ, 2018)

การควบคุมทางชีวภาพสามารถใช้จุลินทรีย์ได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น เอนโดไฟติกแบคทีเรีย (Wang และคณะ, 2020), แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Carolina และคณะ, 2019) หรือแม้กระทั่งราเพื่อควบคุมโรคพืชที่เกิดจากรากโรค (Carolina และคณะ, 2019; Susanto และคณะ, 2005; Wang และคณะ, 2020)

ตัวอย่างการใช้ราและแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืช เช่น โรคลำต้นเน่า (basal stem rot disease) ที่มีสาเหตุมาจาก *Ganoderma boninense* ซึ่งเป็นราก่อโรคที่อาศัยอยู่ในดิน โดยโรคลำต้นเน่าเป็นโรคที่ร้ายแรงสำหรับต้นปาล์มน้ำมัน มักจะพบการระบาดของโรคนี้ที่ประเทศอินโดนีเซีย และมาเลเซีย และมีรายงานว่า *Trichoderma harzianum* และ *Gliocladium viride* สามารถใช้เป็นตัวควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน โดยสามารถป้องกันการก่อโรคของ *G. boninense* ในต้นปาล์มน้ำมันได้หลังจากใส่ *T. harzianum* และ *G. viride* เป็นเวลา 1 ปี (Susanto และคณะ, 2005; Wang และคณะ, 2020)

โรคเน่าของดอกบัว (lotus rot disease) เป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างมาก โดยมีสาเหตุมาจาก *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคที่อาศัยอยู่ในดิน มีรายงานว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* B-36 ที่คัดแยกมาจากเนื้อเยื่อของดอกบัวมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *F. oxysporum* ทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดลองในกระถางบัว และยังสามารถในการครอบครองพื้นที่บริเวณรากของบัว ซึ่งจะเห็นได้ว่า *B. velezensis* B-36 เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับ

การนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมโรคเน่าของบัวที่มีสาเหตุมาจาก *F.oxysporum* (Wang และคณะ, 2020)

โรคแอนแทรคโนส (anthracnose disease) เป็นโรคที่เกิดขึ้นในมะละกอ มีสาเหตุมาจาก *Colletotrichum gloeosporioides* โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่เกิดได้กับพืชหลายชนิด ซึ่งมะละกอเป็นหนึ่งในพืชที่ได้รับผลกระทบจากโรคนี้ และทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ เนื่องจากราสามารถเข้าทำลายทุกส่วนของพืชทั้ง ลำต้น ใบ ก้าน ดอก ผล และเมล็ด โดยมีรายงานว่า *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกมาจาก Tepache ซึ่งเป็นเหล้าที่ทำจากสับปะรด และ Tejuino ซึ่งเป็นเหล้าที่ทำจากข้าวโพด โดยพบว่า *L. plantarum* ที่คัดแยกมาจากเหล้าสองชนิดดังกล่าว สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยของ *C. gloeosporioides* จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรีย *L. plantarum* เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะละกอได้ (Carolina และคณะ, 2019)

โรคราสีเทา (gray mold disease) มีสาเหตุมาจาก *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกลุ่มนีโครโทรฟิค (necrotrophic pathogen) โดยสามารถก่อโรคราสีเทาได้กับพืชผลหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น สตอเบอร์รี่, องุ่น, พริกหวาน และมะเขือเทศ ซึ่งมีรายงานว่า *Bacillus velezensis* มีศักยภาพและมีความสามารถเป็นปฏิปักษ์ต่อ *B. cinerea* และสามารถใช้ควบคุมโรคราสีเทาได้ นอกจากนี้ยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพริกหวานได้ ในการศึกษาเชิงลึกถึงกลไกการควบคุมทางชีวภาพพบว่า *B. velezensis* สามารถลดการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของ *B. cinerea* โดยการหลั่งสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ หรือปล่อยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compound; VOC) และยังมีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันพื้นฐานของพืชด้วย (Jiang และคณะ, 2018) ทั้งนี้มีรายงานว่า *Streptomyces pratensis* LMM15 มีความสามารถเป็นปฏิปักษ์ต่อ *B. cinerea* ทั้งในการทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดลองในเรือนกระจก โดยสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ และยังสามารถแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืช (Lian และคณะ, 2017)

### ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมทางชีวภาพ

จากข้างต้น เมื่อได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรค จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงภาวะที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ไม่ว่าจะเป็นสารที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลั่งออกมาระหว่างการเจริญเติบโต (growth associate) หรือสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างมีประสิทธิภาพ

ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการศึกษาภาวะต่าง ๆ เพื่อหาว่าภาวะใดที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพสูงสุด มีดังนี้

*Bacillus subtilis* MS21 ที่คัดแยกมาจากดินตะกอนทะเลทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย โดยพบว่ามีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Gleosporium gleosporioides*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* และ *Phytophthora infestans* เป็นต้น จากนั้นคณะผู้วิจัยศึกษาถึงภาวะที่ *B. subtilis* MS21 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งราก่อโรคดังกล่าวโดยศึกษา อายุของเชื้อ (ที่ 0-48 ชั่วโมง), ความเร็วของการกวน (ที่ 50, 100, 150 และ 200 rpm), ค่าความเป็นกรดเบส (ที่ pH = 5, 6, 7, 8, 9 และ 10), อุณหภูมิการบ่ม (ที่ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส), ค่าความเค็ม (ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% และ 3%), แหล่งคาร์บอน (ได้แก่ น้ำตาลมอลโทส, น้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, แป้ง และเซลลูโลส), ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (ที่ 1.0-5%), แหล่งไนโตรเจน (ได้แก่ เปปโตเน, ผงสกัดจากเนื้อ, ผงสกัดจากยีสต์, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท), และความเข้มข้นของผงสกัดจากเนื้อ (ที่ 0.5-2.5%) โดยผลการทดลองพบว่า ภาวะที่ทำให้ *B. subtilis* MS21 มีประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคได้สูงสุด ได้แก่ อายุของเชื้อที่เหมาะสม คือ 36 ชั่วโมง, ความเร็วของการกวน คือ 150 rpm, ค่าความเป็นกรดเบสที่ pH = 8, อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35 องศาเซลเซียส, ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 1.0%, แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 2% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ผงสกัดจากเนื้อที่ความเข้มข้น 1% (Anjhana และคณะ, 2017)

*Bacillus megaterium* มีประสิทธิภาพและศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดแยกมาจากดินบริเวณรากของต้นขมิ้นชัน การทดสอบศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์ปฏิบัติภายใต้ภาวะดังนี้ ค่าความเป็นกรดเบส (ที่ pH = 3, 4, 5, 6, 7 และ 8), แหล่งคาร์บอน (ได้แก่ ไชโลส, ซูโครส, กลูโคส และแลคโทส), อายุของเชื้อ (ที่ 24 - 120 ชั่วโมง) และอุณหภูมิการบ่ม (ที่ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส) ผลการทดลองพบว่า *B. megaterium* สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงที่ ค่าความเป็นกรดเบสที่ pH = 6, แหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส, อายุของเชื้อที่ 96 ชั่วโมง อุณหภูมิการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส (Mbajiuka และคณะ, 2019)

*Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus stratosphericus* เป็นแบคทีเรียสองสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคพืช ได้แก่ *Xanthomonas oxyzae*, *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum* และ *Ralstonia solanacearum* การทดสอบศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์ปฏิบัติโดยการแปรผันภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด, แหล่งคาร์บอน (ได้แก่ ซูโครส, แลคโทส, กลูโคส และแป้ง), แหล่งไนโตรเจน (ได้แก่ ไกลซีน, เปปโตเน,

แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์) และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (0.1, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 กรัม) โดยผลการทดลองพบว่าสำหรับ *P. aeruginosa* ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงที่ pH 8 โดยมีน้ำตาลแลคโทสเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน คือ 0.1 กรัม และ *B. stratosphericus* ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงที่ pH 7 โดยมีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน มีเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน คือ 0.2 กรัม (Durairaj และคณะ, 2017)

ในการทดลองครั้งนี้ จะศึกษาค้นหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อรา *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคทะลายเน่าในต้นปาล์มน้ำมัน โดยจะใช้แบคทีเรียทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ที่ได้มาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์คัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี และพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของราก่อโรคได้หลายชนิด (คงยุทธ เลิศมวงธรรม, 2549) และอีก 2 สายพันธุ์คัดแยกมาจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง และพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคได้หลายชนิด (ดรุณี จิวเจริญ, 2552) ดังนั้นแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์จึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจและคาดว่าจะมีความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้ จึงนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราดังกล่าวและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้สูงสุด

#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

งานวิจัยนี้มุ่งหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมัน จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้โดยมีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นสารชีวภาพในการยับยั้งราที่ก่อโรคแทนการใช้สารเคมีฆ่าราต่อไป

## บทที่ 2

### เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 2.1 เครื่องมือ

1. กระจกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. เครื่องแก้ว ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Pyrex, USA
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, US
4. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Science, USA
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น T-42K ของบริษัท Beckman, USA
7. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries., USA
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
9. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
10. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 15X60 มิลลิเมตร ของบริษัท Bioscan, Thailand
11. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
12. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น j2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
13. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
14. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
15. ไมโครปิเปตและทีปรุ่น P200 และ P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Nichiryo, Japan
16. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
17. Cock Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

## 2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
2. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Productora the Agar SA, Chili
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
5. อาหารสำเร็จรูป TSB (Tryptic Soy Broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
6. อาหารสำเร็จรูป NB (Nutrient Broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
7. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท Himedia, india

## 2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
8F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	(Kaewklom และคณะ, 2014)
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	(Kaewklom และคณะ, 2014)



## บทที่ 3

### วิธีการทดลอง

#### 1) การเตรียมแบคทีเรีย และรา *Marasmius* sp.

นำแบคทีเรียจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์คัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) และอีก 2 สายพันธุ์คัดแยกมาจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง (ดร.ณัฐ จิวเจริญ, 2552) รวมทั้งหมด 10 สายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

เลี้ยงรา *Marasmius* sp. บนอาหาร โดยวางชิ้นวุ้น (agar plug) ของราที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

#### 2) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา *Marasmius* sp.

##### 2.1) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture

2.1.1) เตรียมแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ N1, N3, M10, M22, M23, M25, M26, M27, TD2-11 และ TW1-1ng โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2.1.2) เตรียมรา *Marasmius* sp. โดยวางชิ้นวุ้นของราที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

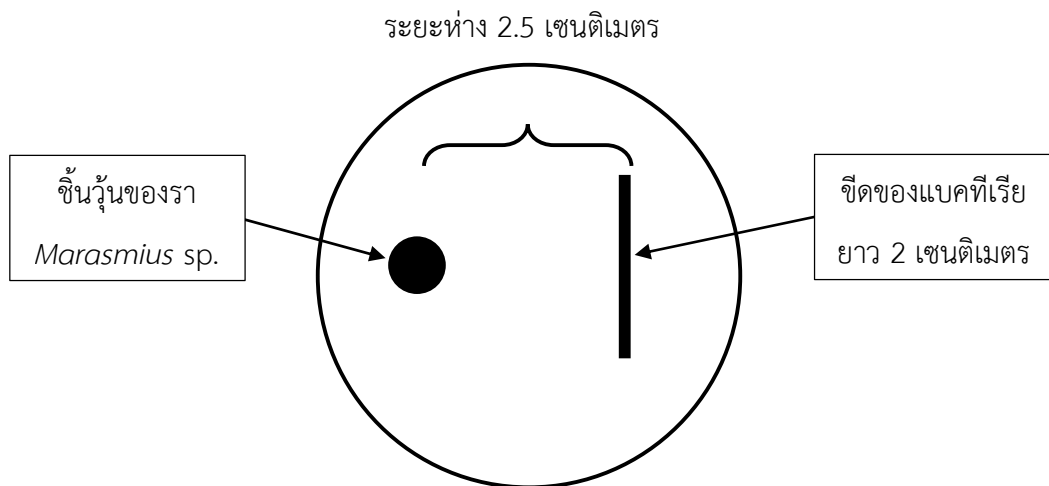
2.1.3) ขีดแบคทีเรียในข้อ 2.1.1) โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลงบนอาหาร PDA ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แล้ววางชิ้นวุ้นของ *Marasmius* sp. ที่เจาะด้วย cork borer ขนาด 6 มิลลิเมตร จากเพลทในข้อ 2.1.2) โดยให้มีระยะห่างระหว่างแบคทีเรียและรา 2.5 เซนติเมตร ดังรูปที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรด้านล่าง (Wang และคณะ, 2018) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงโดยวิธีเดียวกันแต่ไม่มีแบคทีเรีย คัดเลือกแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 3 อันดับแรก นำไปทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 1 - \left[ \frac{B}{A} \right] \times 100$$

เมื่อ A คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดควบคุม (เซนติเมตร)

B คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดทดสอบ (เซนติเมตร)



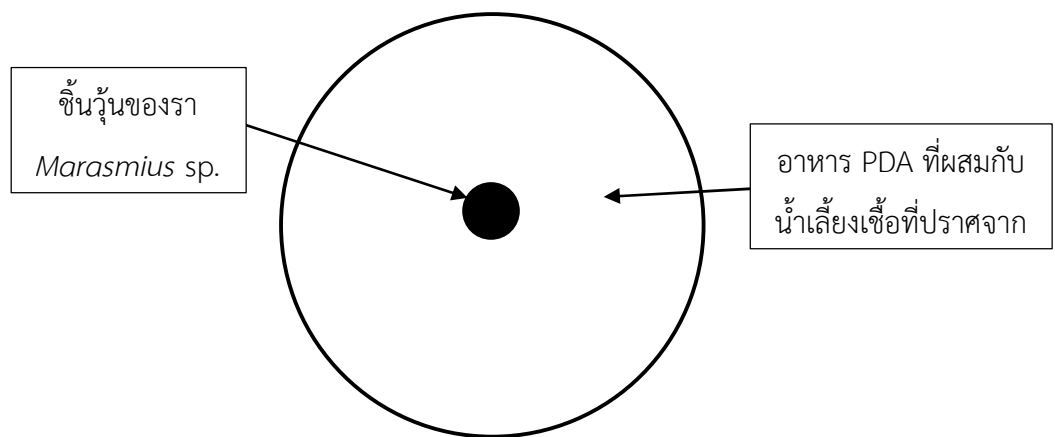
รูปที่ 5 : การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius sp.* ด้วยวิธี dual culture

2.2) ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา (cell free supernatant)

2.2.1) เตรียม *Marasmius sp.* โดยวางชิ้นวุ้นของราที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

2.2.2) เตรียมแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดในขั้นตอนทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture มาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-bertani broth (LB) (ภาคผนวก ก2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มากรองด้วยแผ่นกรองเซลล์ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำของเหลวผลกรองมาผสมกับอาหาร PDA ที่หอมไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส อัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ 2 ส่วน ต่ออาหาร PDA 10 ส่วน เมื่ออาหารแข็งแล้ว วางชิ้นวุ้นของราตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 6 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงรากับอาหาร PDA ที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 6 : การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา (cell free supernatant)

### 3) การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

ภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่ทดสอบ ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, pH และอุณหภูมิ

#### 3.1) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ ได้แก่ Tryptic soy broth (TSB) (ภาคผนวก ก3), Luria-bertani broth (LB) และ Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก4)

3.1.1) เตรียมรา *Marasmius* sp. โดยวางชิ้นวุ้นของราที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

3.1.2) นำแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร LB, NB และ

TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มากรองด้วยแผ่นกรองเซลล์ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำของเหลวผลกรองมาผสมกับอาหาร PDA ที่หลอมไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ 2 ส่วน ต่ออาหาร PDA 10 ส่วน เมื่ออาหารแข็งแล้ว วางชิ้นวุ้นของราตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 6 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงราบนอาหาร PDA ที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ เลือกอาหารที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

### 3.2) ค่า pH

ค่า pH ที่ทดสอบ ได้แก่ 5, 6, 7 และ 8

3.2.1) เตรียม *Marasmius* sp. โดยวางชิ้นวุ้นของราที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

3.2.2) เตรียมแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ให้มีความเท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งรามากที่สุดจากข้อ 3.1.2) ที่ปรับค่า pH ด้วย 1M HCl หรือ 1M NaOH ให้เป็น pH 6, 7 และ 8 ตามลำดับ บ่มแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มากรองด้วยแผ่นกรองเซลล์ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำของเหลวผลกรองมาผสมกับอาหาร PDA ที่หลอมไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ 2 ส่วน ต่ออาหาร PDA 10 ส่วน เมื่ออาหารแข็งแล้ว วางชิ้นวุ้นของราตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 6 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงราบนอาหาร PDA ที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ และเลือกภาวะค่า pH ที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

### 3.3) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ได้แก่ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

3.2.1) เตรียม *Marasmius* sp. โดยวางชิ้นส่วนของราที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

3.2.2) เตรียมแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งมากที่สุดจากข้อ 3.1.2) ที่ปรับค่า pH ที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งมากที่สุดจากข้อ

3.2.2) บ่มแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิ ได้แก่ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มากรองด้วยแผ่นกรองเซลล์ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำของเหลวผลกรองมาผสมกับอาหาร PDA ที่หลอมไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ 2 ส่วน ต่ออาหาร PDA 10 ส่วน เมื่ออาหารแข็งแล้ว วางชิ้นส่วนของราตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 6 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงรบบนอาหาร PDA ที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ

### 4) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางกายภาพ, วิธีทางชีวเคมี, และวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ดังนี้

#### 4.1) การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางกายภาพโดยการย้อมสีแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียในอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

#### 4.2) การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีวเคมีโดยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

4.2.1) ทดสอบความสามารถการใช้ออกซิเจนในการเจริญของแบคทีเรีย

4.2.2) ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส และทดสอบสมบัติในการสร้างเอนไซม์  
อะตาเลส

#### 4.3) การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับ  
นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่ได้มาจากปฏิกิริยาแลงคาชท์พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 8F และ  
1492R

##### 4.3.1) การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit  
ดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียให้อยู่ในช่วง ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) ในอาหารเหลว LB นำมา  
ตกตะกอนเซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปริมาตรรวม 3 มิลลิลิตร โดยปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm  
เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม TE Buffer 100 ไมโครลิตร ลงในตะกอนเซลล์  
จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) และเติมเอนไซม์ lysozyme 10  
ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม TE buffer 100  
ไมโครลิตรกับเอนไซม์ Proteinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร แล้วนำไป  
บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ RNase A 5 ไมโครลิตร  
ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2  
นาที ถ่ายสารละลายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม BL buffer 220  
ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 100  
เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา  
20 วินาที จากนั้นถ่ายตัวอย่างผ่าน HiBind® DNA Mini Column ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร  
นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออก แล้วนำคอลัมน์  
HiBind® DNA Mini Column ใส่กลับในหลอดเดิม เติม HBC buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่น  
เหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออก จากนั้นเติม DNA Wash  
buffer 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ผ่าน  
คอลัมน์ออก เติม DNA Wash buffer 700 ไมโครลิตร อีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000  
rpm เป็นเวลา 2 นาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออก แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000

rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นนำ HiBind® DNA Mini Column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่ แล้วเติม elution buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

#### 4.3.2) การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 4.3.1) มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเตรียมสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ดังนี้ (Kaewklom และคณะ, 2014)

5X PCR buffer	10 ไมโครลิตร
50 $\mu$ M 8F (forward primer)	1.0 ไมโครลิตร
50 $\mu$ M 1492R (reverse primer)	1.0 ไมโครลิตร
20 mM dNTPs	1.0 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1.0 ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase (1–5 units/ $\mu$ L)	0.25 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่อง PCR (Biorad) และปรับอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนดดังนี้ (Kaewklom และคณะ, 2014)

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	} 30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที	

#### 4.3.3) การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 4.3.2) มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลโดยใช้บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE) (ภาคผนวก ข1) โดยเตรียมอะกาโรสเจล 0.9% (ภาคผนวก ข2) แล้วโหลดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็น 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) ลงในช่องใส่ตัวอย่าง ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีเคลื่อนที่มาเกือบถึงปลายสุดของอะกาโรสเจล นำเจลออก จากนั้นนำไปส่องภายใต้ UV และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

#### 4.3.4) การทำบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอออกจากเจล

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ ดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป GeneJet Gel extraction kit (Thermo Scientific, USA) โดยตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการละลายใน binding buffer ปริมาตรเท่ากับเจล ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ประกอบคอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์เข้ากับหลอดเก็บสารละลาย จากนั้นใส่สารละลายเจลลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วเติม wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน คอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงต่ออีก 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เปล่ามาประกอบเข้ากับคอลัมน์แทนหลอดเก็บสารละลาย ใส่ elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 4.3.5) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA โดยส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์ในข้อที่ 4.3.4) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเทียบกับ ฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา *Marasmius* sp.

##### 1.1) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture

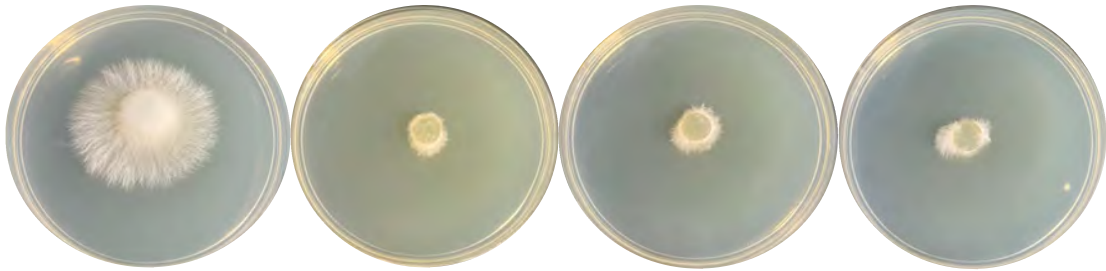
จากการขีดแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ ลงบนอาหารแข็ง PDA ที่มีชั้นวุ้นของรา *Marasmius* sp. โดยให้มีระยะห่างระหว่างแบคทีเรียและราประมาณ 2.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ มีความสามารถยับยั้งรา *Marasmius* sp. ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาคผนวก ค1 จากตารางที่ 1 พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้สูงที่สุดสามอันดับแรกคือ สายพันธุ์ M27, M25 และ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 22.34, 21.99 และ 19.86 % ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่เหลือมีความสามารถในการยับยั้งระหว่าง 14.89 – 19.15 % ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ข้างต้นไปทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา

ตารางที่ 1 : ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Marasmius* sp. โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture

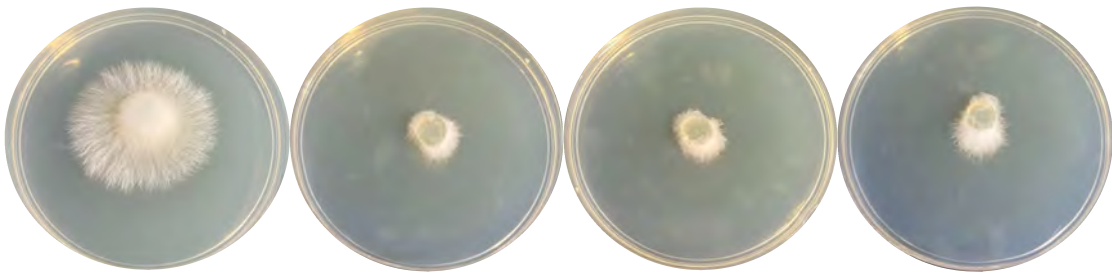
สายพันธุ์แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (เซนติเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
M10	4.70 ± 0.11	4.00 ± 0.08	14.89
M22	4.70 ± 0.11	3.77 ± 0.31	19.86
M23	4.70 ± 0.11	3.97 ± 0.17	15.60
M25	4.70 ± 0.11	3.67 ± 0.17	21.99
M26	4.70 ± 0.11	3.80 ± 0.27	19.15
M27	4.70 ± 0.11	3.65 ± 0.04	22.34
N1	4.70 ± 0.11	3.98 ± 0.21	15.25
N3	4.70 ± 0.11	3.82 ± 0.16	18.79
TD12-11	4.70 ± 0.11	4.00 ± 0.04	14.89
TW1-1ng	4.70 ± 0.11	3.90 ± 0.11	17.02

1.2) ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา

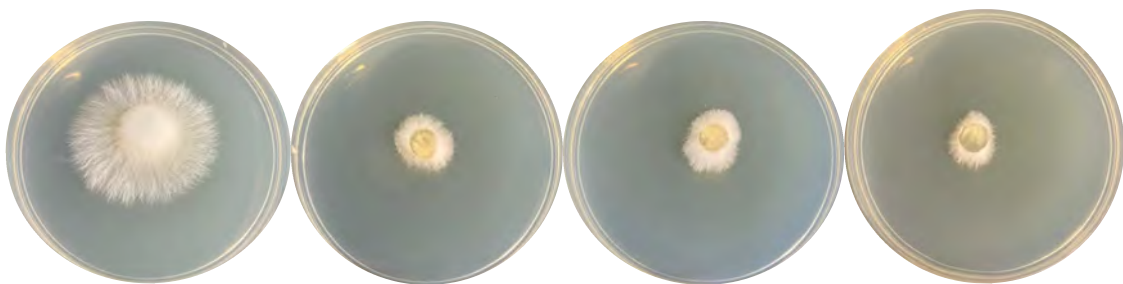
จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27, M25 และ M22 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราโดยนำมาผสมกับอาหาร PDA ด้วยอัตราส่วน 2:10 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้ดัง แสดงในรูปที่ 7 – 9 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ดังตารางที่ 2



รูปที่ 7 : การยับยั้ง *Marasmius* sp ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของสายพันธุ์ M27 (3 ซ้ำ)  
เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้ายสุด)



รูปที่ 8 : การยับยั้ง *Marasmius* sp ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของสายพันธุ์ M25 (3 ซ้ำ)  
เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้ายสุด)



รูปที่ 9 : การยับยั้ง *Marasmius* sp ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของสายพันธุ์ M22 (3 ซ้ำ)  
เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้ายสุด)

ตารางที่ 2 : ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Marasmius* sp. โดย น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27, M25 และ M22

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (เซนติเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
M27	3.10 ± 0.19	1.07 ± 0.05	65.59
M25	3.10 ± 0.19	1.17 ± 0.05	62.37
M22	3.10 ± 0.19	1.52 ± 0.05	55.91

จากตารางที่ 2 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 65.59% รองลงมาคือสายพันธุ์ M25 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 62.37% และสายพันธุ์ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 55.91% จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปทดสอบเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา โดยภาวะที่ทดสอบ ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, pH และอุณหภูมิ

## 2) การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

### 2.1) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27, M25 และ M22 ที่เลี้ยงในอาหาร LB, NB และ TSB มาผสมกับอาหาร PDA ด้วยอัตราส่วน 2:10 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาคผนวก ค2 – ค4

ตารางที่ 3 : ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Marasmius* sp. โดย น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27, M25 และ M22 เมื่อเลี้ยงใน LB, NB และ TSB

อาหารเลี้ยงเชื้อ	แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (เซนติเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
		ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
LB	M27	3.10 ± 0.19	1.07 ± 0.05	65.59
	M25	3.10 ± 0.19	1.17 ± 0.05	62.37
	M22	3.10 ± 0.19	1.52 ± 0.05	55.91
NB	M27	3.10 ± 0.19	2.97 ± 0.05	4.30
	M25	3.10 ± 0.19	2.63 ± 0.12	15.05
	M22	3.10 ± 0.19	2.70 ± 0.42	12.90
TSB	M27	3.10 ± 0.19	1.60 ± 0.08	48.39
	M25	3.10 ± 0.19	1.57 ± 0.05	49.46
	M22	3.10 ± 0.19	1.70 ± 0.08	45.16

จากตารางที่ 3 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร LB, NB และ TSB พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Marasmius* sp. สูงสุด โดยสายพันธุ์ M27 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 65.59% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M25 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.37% และสายพันธุ์ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.91% ความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSB มีอันดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรารองลงมาจาก LB โดยมีช่วงการยับยั้งของทั้ง 3 สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าการยับยั้งระหว่าง 45.16 – 49.46 % สำหรับการยับยั้งราของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งระหว่าง 4.30 – 15.05 % จากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่า อาหารที่ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุดเพื่อนำไปศึกษาต่อไปคือ อาหาร LB ซึ่งในการทดลองนี้ยังไม่มีการปรับค่า pH ของอาหาร LB

## 2.2) ค่า pH

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ที่ผ่านการกรองของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่ปรับค่า pH ด้วย 1M HCl หรือ 1M NaOH ให้เป็น pH 6, 7 และ 8 ตามลำดับ โดยนำมาผสมกับอาหาร PDA ด้วยอัตราส่วน 2:10 เพื่อหาค่า pH ที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุด ผลการทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารที่ค่า pH ทั้ง 3 ค่าสามารถยับยั้งรา *Marasmius* sp. ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาคผนวก ค5 – ค7

ตารางที่ 4 : ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Marasmius* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27, M25 และ M22 ในอาหาร LB ที่ค่า pH ต่าง ๆ

ค่า pH ของอาหาร LB	แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (เซนติเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
		ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
6	M27	3.00 ± 0.20	1.30 ± 0.08	56.67
	M25	3.00 ± 0.20	1.33 ± 0.09	55.56
	M22	3.00 ± 0.20	1.13 ± 0.05	62.22
7	M27	3.00 ± 0.20	0.97 ± 0.12	67.78
	M25	3.00 ± 0.20	1.13 ± 0.09	62.23
	M22	3.00 ± 0.20	1.16 ± 0.09	61.11
8	M27	3.00 ± 0.20	1.07 ± 0.00	64.44
	M25	3.00 ± 0.20	1.43 ± 0.17	52.22
	M22	3.00 ± 0.20	1.30 ± 0.05	56.67

จากตารางที่ 4 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหาร LB ที่ค่า pH 6, 7 และ 8 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Marasmius* sp. สูงสุด โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุดคือ สายพันธุ์ M27 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 67.78% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M25 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.23% และสายพันธุ์ M22 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 61.11% ดังนั้นจึงเลือกอาหาร LB ที่ค่า pH 7 ที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

### 3) ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับสำหรับการทดลองที่จะศึกษาต่อไป

#### 3.1) การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ใน LB ที่ค่า pH 7 โดยบ่มที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส หาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา คาดว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมน่าจะเป็นที่ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุด

#### 3.2) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 3 อันดับแรก ได้แก่ สายพันธุ์ M27, M25 และ M22 เป็นแบคทีเรียที่ได้มาจากงานวิจัยก่อนหน้าของ คงยุทธ เลิศมวงคชธรรม (คงยุทธ เลิศมวงคชธรรม, 2549) ซึ่งคัดแยกมาจากดินในจังหวัดกาญจนบุรี งานวิจัยดังกล่าวได้พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น การย้อมสีแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง (bacilli) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 ยังพบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วย จากการทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมีโดยงานวิจัยดังกล่าวพบว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต และสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสโดยไม่มีการสร้างแก๊ส นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 และ M25 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับคู่มือ Practical Atlas for Bacterial Identification คาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 อยู่ในสกุล *Brochothrix* sp., แบคทีเรียสายพันธุ์ M25 คาดว่าอยู่ในสกุล *Corynebacterium* sp. และแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 คาดว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp. (คงยุทธ เลิศมวงคชธรรม, 2549) แต่จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียพบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับโคโลนีส่วนใหญ่ของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ดังนั้นจึงยังจำเป็นต้องนำแบคทีเรียเหล่านี้มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องแม่นยำต่อไป

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยวิธี dual culture โดยแบคทีเรียที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 10 สายพันธุ์ พบว่าทั้ง 10 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุด 3 อันดับคือ สายพันธุ์ M27, M25 และ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 22.34, 21.99 และ 19.86 % ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ข้างต้นไปทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ซึ่งผลของการทดสอบพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 มีความสามารถสูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 65.59%, รองลงมาคือ สายพันธุ์ M25 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 62.37% และสายพันธุ์ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 55.91% จากการทดสอบกล่าวได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา และหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารชนิดใด และจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

การทดสอบการยับยั้งราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ M27, M25 และ M22 พบว่ามีประสิทธิภาพการยับยั้งราสูงกว่าเมื่อใช้เซลล์โดยวิธี dual culture 2.94, 2.84 และ 2.81 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลทำให้มีสารซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งมากขึ้น ซึ่งมักพบได้กับการทดสอบการยับยั้งราของแบคทีเรียในหลายงานวิจัย ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Mu และคณะ (2020) พบว่า *Bacillus atrophaeus* สายพันธุ์ J-1 มีความสามารถในการยับยั้ง *Botryosphaeria dothidea* ซึ่งก่อโรคผลเน่าในแอปเปิ้ลหลังการเก็บเกี่ยว โดยผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture พบว่า *B. atrophaeus* สายพันธุ์ J-1 สามารถยับยั้ง *B. dothidea* ได้ 55.1% และผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์พบว่า *B. atrophaeus* สายพันธุ์ J-1 แสดงความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคได้สูงถึง 79.8% ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งมากกว่าเมื่อใช้เซลล์โดยวิธี dual culture และงานวิจัยของ Eber และคณะ (2019) พบว่า *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ TE3 มีความสามารถในการยับยั้ง *Bipolaris sorokiniana* ซึ่งเป็นราก่อโรคใบจุดสีน้ำตาล (spot blotch) ในข้าวสาลี เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวด้วยวิธี dual culture พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ TE3 แสดงบริเวณการยับยั้งต่อ *B. sorokiniana* โดยมีความกว้างเท่ากับ 6.7 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของสายพันธุ์ TE3 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์สามารถลดการเจริญของเส้นใย *B. sorokiniana* ได้ถึง 98% อย่างไรก็ตาม มีรายงานงานวิจัยของ Tian และคณะ (2020) ที่คัดแยก *Bacillus* sp. w176 จากดินบริเวณไร่ส้ม และพบว่า

*Bacillus* sp. w176 มีความสามารถในการยับยั้ง *Penicillium digitatum* ซึ่งเป็นราก่อโรคราเขียวในส้ม หลังการเก็บเกี่ยว เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture พบว่ามีความกว้างของบริเวณยับยั้ง 58.41 เซนติเมตร แต่เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ พบว่ามีความกว้างของบริเวณยับยั้งเพียง 33.50 เซนติเมตร

สำหรับการทดสอบเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Marasmius* sp. พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *Marasmius* sp. คือ อาหาร LB รองลงมาคืออาหาร TSB และสุดท้ายคืออาหาร NB โดยอาหาร LB แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุดคือ สายพันธุ์ M27 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 65.59%, รองลงมาคือ สายพันธุ์ M25 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.37% และสายพันธุ์ M22 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.91% ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญและสร้างสารที่ยับยั้งการเจริญของรา และหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นผงสกัดจากยีสต์ ซึ่งแตกต่างจากอาหาร NB และ TSB ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นผงสกัดจากเนื้อ และชอยโตน ตามลำดับ จากนั้นทำการทดลองต่อเพื่อหาภาวะค่า pH ของอาหาร LB ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Marasmius* sp. พบว่าค่า pH ของอาหาร LB เท่ากับ 7 ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งรา โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุดคือ สายพันธุ์ M27 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 67.78%, รองลงมาคือ สายพันธุ์ M25 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.23% และสายพันธุ์ M22 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 61.11% จากการทดสอบสรุปผลได้ว่า ภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Marasmius* sp. คือ การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB ที่มีค่า pH ของอาหารเท่ากับ 7

แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงสุดในการยับยั้ง *Marasmius* sp. จากการทดลองเบื้องต้นในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางกายภาพก่อนหน้านี (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) ได้คาดหมายว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 อยู่ในสกุล *Brochothrix* sp., แบคทีเรียสายพันธุ์ M25 คาดว่าอยู่ในสกุล *Corynebacterium* sp. และแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 คาดว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp. แบคทีเรียในสกุล *Brochothrix* ยังไม่มีรายงานว่ามีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคราในพืช โดยแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง ที่ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ และเจริญแบบไม่ใช้อากาศ และสามารถแยกได้จากเนื้อสัตว์ดิบทั่วไป (Xu และคณะ, 2010) ส่วนแบคทีเรียในสกุล *Corynebacterium* และ *Lactobacillus* พบว่ามีรายงานถึงความสามารถของแบคทีเรียสองสายพันธุ์นี้ในการใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมยับยั้งโรคราที่เกิดจากรากตัวอย่าง เช่น *Corynebacterium nitrolophilus* สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* และ *Alternaria solani* (Gebreel และคณะ, 2008) และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และ

การเจริญของเส้นใยของ *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งก่อโรคแอนแทรคโนสของมะละกอ (Carolina และคณะ, 2019) ลักษณะทั่วไปของ แบคทีเรียในสกุล *Corynebacterium* คือเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเรียวยาว ที่ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และสามารถสร้างเอนไซม์อะมิลเลส สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และสามารถแยกได้จากดิน น้ำ พืช และสัตว์ (Betts, 2006) สำหรับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* มีลักษณะทั่วไป คือเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งยาว อยู่เดี่ยวๆหรือต่อกันเป็นสายสั้น ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และเคลื่อนที่ไม่ได้ สามารถคัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์นม อาหารหมัก หรือหญ้าหมัก เป็นต้น (Yu และคณะ, 2018)

อย่างไรก็ตามจากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวในงานวิจัยนี้ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโคโลนีส่วนใหญ่ของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีรายงานมากมายว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ เช่น งานวิจัยของ Wang และคณะ (2020) ได้ใช้เอนโดไฟติกแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* B-36 ที่คัดแยกมาจากเนื้อเยื่อของดอกบัว และพบว่ามีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *F. oxysporum* ซึ่งก่อโรคน้ำของดอกบัว (lotus rot disease) และยังพบว่า *B. velezensis* B-36 มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดลองในกระถางบัว หรืออีกตัวอย่างหนึ่ง มีรายงานว่า *B. velezensis* มีศักยภาพและมีความสามารถเป็นปฏิปักษ์ต่อ *Botrytis cinerea* และสามารถใช้ควบคุมโรคราสีเทา (gray mold disease) ที่เกิดกับพืชผลหลายชนิด เช่น สตรอเบอร์รี่, องุ่น, พริกหวาน และมะเขือเทศ (Jiang และคณะ, 2018) นอกจากนี้งานวิจัยของ Wang และคณะ (2018) พบว่า *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* มีความสามารถยับยั้งราที่ก่อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Bipolaris sorokiniana*, *F. oxysporum*, *Alternaria* sp., *C. gloeosporioides* และ *Botryosphaeria ribis* เป็นต้น ดังนั้นจึงยังจำเป็นต้องนำแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ข้างต้นไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำต่อไป

งานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความสามารถของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคในต้นปาล์มน้ำมัน และทราบถึงภาวะเบื้องต้นที่ส่งเสริมความสามารถในการยับยั้งราของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ด้วยสถานการณ์การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 และประกาศสถานการณ์ฉุกเฉินในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร (ราชกิจจานุเบกษา, 2563) รวมถึงประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สืบเนื่องจากการระบาดดังกล่าว (ประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2563) ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองได้ครบตามที่วางแผนไว้ ซึ่งหากทำการทดลองได้ครบถ้วน จะทำให้ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้สูงที่สุด รวมทั้งทราบเอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นตัว



ควบคุมทางชีวภาพหรือไม่ โดยมีเป้าหมายเพื่อควบคุมโรคทะลายเน่าของปาล์มน้ำมันที่มีสาเหตุจาก *Marasmius* sp. ทั้งนี้ยังมีประเด็นอื่นที่ควรศึกษาเพิ่มเติม เช่น ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตอื่น ก่อนที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพสำหรับการควบคุมโรคของต้นปาล์ม

## เอกสารอ้างอิง

- Al-Assiuty, A.N., Khalil, M.A., Ismail, A.W., Van Straalen, N.M., Ageba, M.F., 2014. Effects of fungicides and biofungicides on population density and community structure of soil oribatid mites. *Science of the Total Environment* 466-467, 412-420.
- Anjhana, V.R., Sasikala, S.L., 2017. Isolation, screening and growth optimization of antagonistic *Bacillus subtilis* MS21 from thengapattanam estuary against plant fungal pathogens. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 4, 15-26.
- Bale, J.S., Van Lenteren, J.C., Bigler, F., 2008. Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 363, 761-776.
- Betts, G., 2006. Other spoilage bacteria, *Food Spoilage Microorganisms*, pp. 668-693.
- Carolina, B.R., Raymundo, R.Q., Miguel, S.F., Didiana, G.L., Alfredo, V.O., 2019. Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Bioscience* 29, 47-54.
- Choudhary, D.K., Prakash, A., Johri, B.N., 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Medical Microbiology* 47, 289-297.
- Chung, G.F., 2012. Effect of pests and diseases on oil palm yield. *Palm Oil: Production, Processing, Characterization and Uses*, 163-210.
- Corley, R.H.V., Tinker, P.B., 2015a. Diseases of the oil palm *The Oil Palm*, Fifth edition, 399-436.
- Corley, R.H.V., Tinker, P.B., 2015b. The origin and development of the oil palm industry *The oil palm*, fifth edition, 1-29.
- De Assis Costa, O.Y., Tupinamba, D.D., Bergmann, J.C., Barreto, C.C., Quirino, B.F., 2018. Fungal diversity in oil palm leaves showing symptoms of Fatal Yellowing disease. *PLOS One* 13, e0191884.
- Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J.H., Chang, W.S., Park, Y.J., Senthilkumar, P., Choi, K.M., Lee, J.H., Oh, B.T., 2017. Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting through both induced plant resistance and direct antagonism. *FEMS Microbiology Letters* 364, 2017, fnx225.

- Eber, V.R., Fannie, P.C., Ernestina, C.L., Jaime, L.C., Sergio de los, S.V., 2019. *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control* 132, 135-143.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., Henis, Y., 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73, 85-88.
- Escribano-Viana, R., Lopez-Alfaro, I., Lopez, R., Santamaria, P., Gutierrez, A.R., Gonzalez-Arenzana, L., 2018. Impact of chemical and biological fungicides applied to grapevine on grape biofilm, must, and wine microbial diversity. *Frontiers in Microbiology* 9, 59.
- Gebreel, H.M., El-Mehalawy, A.A., El-Kholy, I.M., Rifaat, H.M., Humid, A.A., 2008. Antimicrobial activities of certain bacteria isolated from egyptian soil against pathogenic fungi. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4, 331-339.
- Harun, M.Y., Azizi Che Yunus, M., Azian Morad, N., Shah Ismail, M.H., 2016. A comparative investigation on the effect of thermal treatments on the mechanical properties of oil palm fruitlet components. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 60, 582-587.
- Hermine Bille, N., Joseph Martin, B., Georges Franck Ngando, E., Lambert, N., Félix Chancelin, N., Godswill Ntsefong, N., 2013. Morphogenesis of oil palm Fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) in mesocarp and endocarp development. *Journal of Life Sciences* 7, 153-158.
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H.R., Aminian, H., Alizadeh, A., 2011. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *Plant Pests and Diseases Research Institute* 41, 65-71.
- Jensen, H.T., Keogh-Brown, M.R., Shankar, B., Aekplakorn, W., Basu, S., Cuevas, S., Dangour, A.D., Gheewala, S.H., Green, R., Joy, E.J.M., Rojroongwasinkul, N., Thaiprasert, N., Smith, R.D., 2019. Palm oil and dietary change: Application of an integrated macroeconomic, environmental, demographic, and health modelling framework for Thailand. *Food Policy* 83, 92-103.

- Jiang, C.H., Liao, M.J., Wang, H.K., Zheng, M.Z., Xu, J.J., Guo, J.H., 2018. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 126, 147-157.
- Kaewklom, S., Chueakhalm, W., Suthirawut, S., Aunpad, R., 2014. Development of a novel PCR primer to differentiate and identify *Bacillus subtilis* and closely related species isolated from thai fermented foods. *Food Biotechnology* 28, 354-368.
- Khomphet, T., Eksomtramage, T., Duangpan, S., 2018. Genetic variation of improved oil palm tenera hybrid populations using morphological and SSR markers. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 40, 1329-1335.
- Kohl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J., 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases : relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10, 845.
- Kok, S.Y., Ong-Abdullah, M., Cheng-Lian EE, G., Namasivayam, P., 2015. A histological study oil palm (*Elaeis guineensis*) endosperm during seed development *Journal of Oil Palm Research* 27, 107-112.
- Konan, E.E., Durand-Gasselien, T., Kouadio, J.Y., Flori, A., Rival, A., 2006. A modeling approach of the in vitro conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84, 100-113.
- Lian, Q., Zhang, J., Gan, L., Ma, Q., Zong, Z., Wang, Y., 2017. The biocontrol efficacy of *Streptomyces pratensis* LMM15 on *Botrytis cinerea* in tomato. *BioMed Research International* 2017, 9486794.
- Mbajiuka, C.S., Eze, V.C., Ifeanyi, V.O., 2019. Optimization of growth conditions of *Bacillus megaterium* for antifungal activities against cocoyam phytopathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8, 2184-2193.
- Mu, Y., Yue, Y., Gu, G., Deng, Y., Jin, H., Tao, K., 2020. Identification and characterization of the *Bacillus atrophaeus* strain J-1 as biological agent of apple ring rot disease. *Journal of Plant Diseases and Protection*.
- Nicholas, K., Fanzo, J., MacManus, K., 2018. Palm oil in myanmar : a spatiotemporal analysis of the effects of industrial farming on biodiversity loss. *Global Health: Science and Practice* 6, 210-222.
- Pornsuriya, C., Sunpapao, A., Srihanant, N., Worapattam, K., Kittimorak, J., Phithakkit, S., Petcharat, V., 2013. A survey of diseases and disorders in oil palms of southern thailand. *Plant Pathology Journal* 12, 169-175.

- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R., 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20, 1-11.
- Seephueak, P., Preecha, C., Seephueak, W., 2018. Diversity of macrofungi in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantation in southern thailand. *Walailak Journal* 15, 201-211.
- Shanmugam, V., Kanoujia, N., 2011. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control* 57, 85-93.
- Susanto, A., Sudharto, P.S., Purba, R.Y., 2005. Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantations. *Mycopathologia* 159, 153-157.
- Syed Ab Rahman, S.F., Singh, E., Pieterse, C.M.J., Schenk, P.M., 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science* 267, 102-111.
- Tian, Z., Chen, C., Chen, K., Liu, P., Fan, Q., Zhao, J., Long, C., 2020. Biocontrol and the mechanisms of *Bacillus* sp. w176 against postharvest green mold in citrus. *Postharvest Biology and Technology*.
- Vijay, V., Pimm, S.L., Jenkins, C.N., Smith, S.J., 2016. The impacts of oil palm on recent deforestation and biodiversity loss. *PLOS One* 11, e0159668.
- Wang, G.F., Meng, J.F., Tian, T., Xiao, X.Q., Zhang, B., Xiao, Y.N., 2020. Endophytic *Bacillus velezensis* strain B-36 is a potential biocontrol agent against lotus rot caused by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology* 128, 1153-1162.
- Wang, X., Wang, C., Li, Q., Zhang, J., Ji, C., Sui, J., Liu, Z., Song, X., Liu, X., 2018. Isolation and characterization of antagonistic bacteria with the potential for biocontrol of soil-borne wheat diseases. *Journal of Applied Microbiology* 125, 1868-1880.
- Xu, Y.Z., Anyogu, A., Ouoba, L.I., Sutherland, J.P., 2010. Genotypic characterization of *Brochothrix* spp. isolated from meat, poultry and fish. *Letters in Applied Microbiology* 51, 245-251.
- Yu, Q., Xingyao, L., Yanni, P., Guijie, L., Xin, Z., 2018. Isolation and identification of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* YS2) from yak yogurt and its probiotic properties. *Biomedical Research* 29, 815-820.

- คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549. การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คลินิกปาล์มน้ำมัน - Palm Clinic, 2560. โรคทะลายปาล์มเน่า (Marasmius bunch rot). (online).  
ค้นหาจาก <https://www.facebook.com/215227792323258/posts/273635779815792/>, วันที่ 23 พฤษภาคม 2563.
- จิตรภา กิติโมรากุล, วสันต์ เพชรรัตน์, เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2557. การควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในปาล์มน้ำมัน โดยการใช้สารเคมีและชีววิธี. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1 39-47.
- ชีรวลัย ลิทธิศักดิ์, ทศนี ขาวเนียม, สมปอง เตชะโต, 2560. ผลของการสับและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 4, 41-46.
- ดรุณี จิวเจริญ, 2552. แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราโรคพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2563. เรื่อง ขยายเวลาการปิดที่ทำการเป็นการชั่วคราวเนื่องจากการระบาดของเชื้อโรค COVID-19 (ฉบับที่ 2).
- ปีน จันจุฬา, 2558a. การพัฒนาและการใช้ประโยชน์ผลพลอยได้จากการปลูกปาล์มน้ำมัน และอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นอาหารสัตว์: 1. ศักยภาพ และการใช้ทางใบปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งอาหารเหยื่อสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2, 2-16.
- ปีน จันจุฬา, 2558b. การพัฒนาและการใช้ประโยชน์ผลพลอยได้จากการปลูกปาล์มน้ำมัน และอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นอาหารสัตว์: 2. การใช้ประโยชน์ของกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2, 1-12.
- พรสวรรค์ ต๊ะเสี้ยว, สมรัก ภูเดช, สัมรวย มีจินดา, กลุ่มอารักขาพืช สำนักงานเกษตร, 2561. โรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมัน (Marasmius bunch rot). ข่าวประชาสัมพันธ์และเตือนภัยการระบาดศัตรูพืช.
- ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี, อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย์ ภาสบุตร, ศรีนวล สุราษฎร์, 6, ก.ส.ก.ส., 2555. ศึกษาชนิดและชีววิทยาของเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของสละ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- ราชกิจจานุเบกษา, 2563. ประกาศสถานการณ์ฉุกเฉินในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร.  
[http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2563/E/069/T\\_0001.PDF](http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2563/E/069/T_0001.PDF), เมื่อวันที่ 6 พฤษภาคม 2563.

ศานันท์ สุจิตโต, อีระ เอกสมทราเมษฐ์, เสาวภา ดั่งปาน, 2560. การเจริญเติบโตและปริมาณโพรลินของต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราในสภาวะขาดน้ำ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 4, 14-18.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557. สถิติการส่งออก. (online). ค้นหาจาก  
[http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S\\_YEAR=2560&E\\_YEAR=2561&PRODUCT\\_GROUP=5255&wf\\_search=&WF\\_SEARCH=Y](http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S_YEAR=2560&E_YEAR=2561&PRODUCT_GROUP=5255&wf_search=&WF_SEARCH=Y), วันที่ 30 มีนาคม 2563.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศปี ๒๕๖๑.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี ๒๕๖๒.

เอกนรินทร์ จันทรักษ์, อีระ เอกสมทราเมษฐ์, 2558. การเปรียบเทียบผลผลิตของพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ปลูกในจังหวัดสงขลา. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2, 1-5.

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1) อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose broth 24 กรัม

Agar 15 กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 2) อาหารเหลว Luria-Bertani (LB)

Tryptone 10 กรัม

Yeast extract 5 กรัม

NaCl 10 กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 3) อาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB)

อาหารสำเร็จรูป Tryptic soy broth 24 กรัม

ผสมส่วนประกอบในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



4) อาหารเหลว Nutrient broth (NB)

อาหารสำเร็จรูป Nutrient broth (NB)

24 กรัม

ผสมส่วนประกอบในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอด  
ประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่  
อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### สารละลายและบัฟเฟอร์

#### 1) บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE)

Trizma base	121	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 2) 0.9% อะกาโรสเจล









ผงอะกาโรสเจล	0.18	กรัม
บัฟเฟอร์ 1X TAE	20	มิลลิลิตร













นำผงอะกาโรสเจลใส่ลงใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปอุ่นให้เจลละลาย จากนั้นนำไปเทลงในถาดแม่พิมพ์สำหรับขึ้นเจล ระวังอย่าให้มีฟอง และตั้งไว้จนอะกาโรสแข็งตัว













ภาคผนวก ค









ความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. โดยแบคทีเรีย

ตารางที่ ค1 ความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture


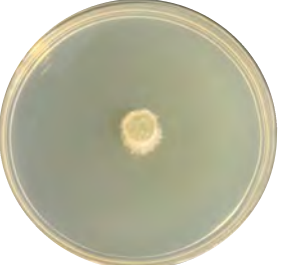
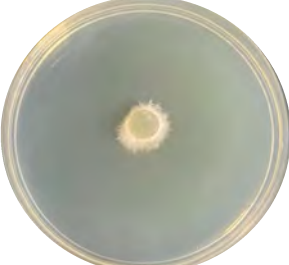
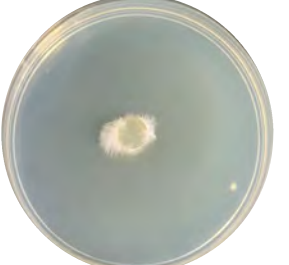


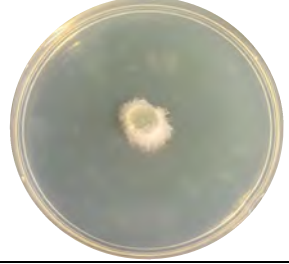


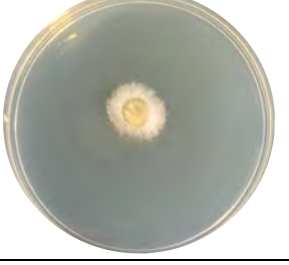

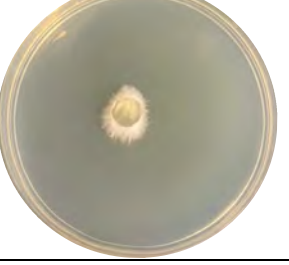
สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
M10				
M22				

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
M23				
M25				
M26				













สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
M27				
N1				
N3				

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
TD12-11				
TW1-1ng				

ตารางที่ ค2 ความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอาหาร LB













สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
M27				
M25				
M22				

ตารางที่ ค3 ความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอาหาร NB








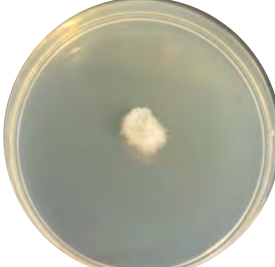

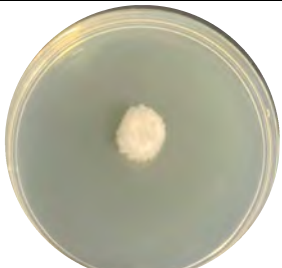
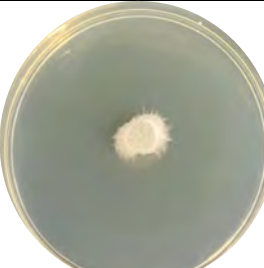

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
M27				
M25				
M22				





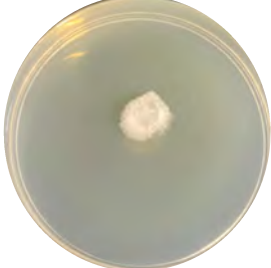
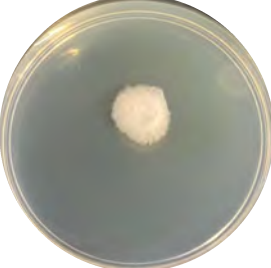






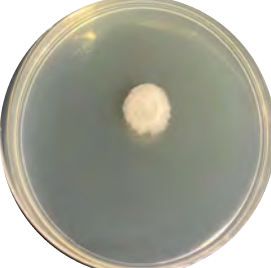

ตารางที่ ค4 ความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอาหาร TSB

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
M27				
M25				
M22				


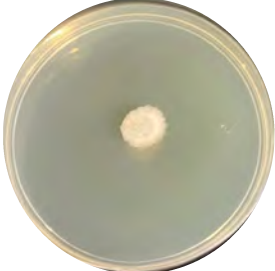
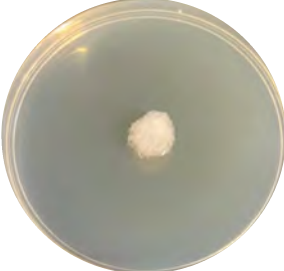


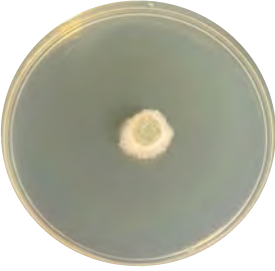
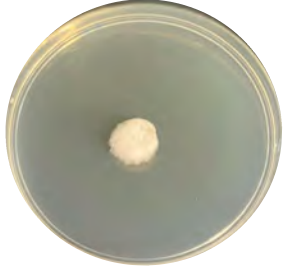

ตารางที่ ค5 ความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่ค่า pH 6, 7 และ 8

pH	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
6				
7				
8				

ตารางที่ ค6 ความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่ค่า pH 6, 7 และ 8

pH	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
6				
7				
8				

ตารางที่ ค7 ความสามารถในการยับยั้ง *Marasmius* sp. ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่ค่า pH 6, 7 และ 8

pH	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
6				
7				
8	