รายงานวิจัย

การพัฒนาสูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์จากเพอร์ไลต์เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าว

Perlite-based bioformula development of antagonistic actinomycetes for controlled rice sheath blight disease

โดย

เจนจิรา เดชรักษา

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

2562

ชื่อโครงการ การพัฒนาสูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์จากเพอร์ไลต์เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าว

ชื่อผู้วิจัย เจนจิรา เดชรักษา

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ทำการทดสอบการใช้แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ตรึงเพอร์ไลต์เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยแยกแอคติโนมัยสีทจากดินนาข้าวในจังหวัดลพบุรี นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *R. solani* ด้วยวิธี dual culture พบว่าแอคติโนมัยสีท AL13-2 และ AL14-2 มีการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 87.61 เปอร์เซ็นต์ และ 92.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นทดสอบการตรึงแอคติโนมัยสีทกับตัวกลางเพอร์ไลต์ พบว่าปริมาณแอคติโนมัยสีท AL13-2 และ AL14-2 ในเพอร์ไลต์เท่ากับ 2.0×10^9 และ 2.6×10^9 CFU/g เมื่อทดสอบการควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวพันธุ์ กข 41 ในระดับกระถาง พบว่าแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์สามารถลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ตรึงเพอร์ไลต์สามารถพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวได้

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีท *Rhizoctonia solani* เพอร์ไลต์ โรคกาบใบแห้งในข้าว

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

Research Title Perlite-based bioformula development of antagonistic actinomycetes for controlled rice sheath blight disease

Researcher Janejira Detraksa

Abstract

The present study investigates the use antagonistic actinomycetes immobilized with perlite for controlling rice sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. A total of actinomycete isolates were isolated from soil samples collected from rice fields in Lopburi province. All the isolates were screened for antagonistic properties using the dual culture technique. The actinomycete AL13-2 and AL14-2 showed the highest growth inhibition of *R. solani* at 87.61% and 92.38%, respectively. The perlite was evaluated as a carrier material for cell immobilization. The results showed the number of the AL13-2 and AL14-2 cells in the perlite at 2.0×10^9 and 2.6×10^9 CFU/g, respectively. In pot experiments, the actinomycetes immobilized with perlite was significantly suppressed sheath blight disease of RD41 rice variety when compared to control. These results suggest that the antagonistic actinomycetes immobilized with perlite could be a promising candidate for utilization in rice biocontrol agent of sheath blight disease.

Keywords: actinomycetes, *Rhizoctonia solani*, perlite, rice sheath blight disease

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย การพัฒนาสูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์จากเพอร์ไลต์เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการพิจารณาทุนวิจัยที่ได้อนุมัติทุนวิจัยในครั้งนี้ และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรีที่ช่วยให้ข้อเสนอแนะในโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

ธันวาคม 2562

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แอคติโนมัยสีท	3
2.2 การควบคุมโรคโดยชีววิธี	8
2.3 รูปแบบของสูตรสำเร็จจุลินทรีย์	10
2.4 เพอร์ไลต์	11
2.5 โรคข้าว	
3. วิธีการดำเนินการวิจัย	14
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย	15
4. ผลการวิจัย	18
4.1 สายพันธุ์แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani*	18

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสูตรสำเร็จสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่ตรึงบนตัวกลางเพอร์ไลต์ 19
4.3 การศึกษาอายุการเก็บรักษาแอคติโนมัยสีทตรึงกับเพอร์ไลต์ 21
4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวในระดับกระถาง 22

5. สรุปและข้อเสนอแนะ 24
5.1 สรุป 24
5.2 ข้อเสนอแนะ 24

บรรณานุกรม 25

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 ที่ตรวจพบในเพอร์ไลต์หลังการตรึงเชื้อแบบมีการเขย่าและไม่มีการเขย่า	20
2	ปริมาณแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 ที่ตรวจพบในเพอร์ไลต์หลังการตรึงเชื้อกับเพอร์ไลต์เผาที่อุณหภูมิต่างๆ	21
3	ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวในระดับกระถาง	23

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วงจรชีวิตของแอคติโนมัยสีท	5
2	2 การยับยั้งของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL13-2 ต่อเชื้อรา *R. solani* บนอาหาร PDA เวลา 3 วัน	18
3	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร Oatmeal agar (ก) และ เส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของไอโซเลต AL13-2	19
4	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร Oatmeal agar (ก) และ เส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของไอโซเลต AL14-2	19
5	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของแอคติโนมัยสีท AL13-2 และ AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็น (5-8 องศาเซลเซียส)	22
6	ลักษณะแผลบนต้นข้าวที่มีการปลูกเชื้อ *R. solani*	22

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในรอบปีปลูกข้าว พ.ศ. 2559/2560 จังหวัดลพบุรีมีพื้นที่ปลูกข้าวนาปีทั้งหมด 663,818 ไร่ อำเภอที่ปลูกข้าวมากที่สุด คือ บ้านหมี่ โคกสำโรง เมืองและท่าวุ้ง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) อย่างไรก็ตามหนึ่งในปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของข้าว คือ โรคข้าวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา โดยเฉพาะโรคกาบใบแห้งที่มีสาเหตุเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งทำเกิดแผลสีเขียวปนเทาตาม กาบใบบริเวณใกล้ระดับน้ำ แผลจะขยายใหญ่ขึ้นจนถึงใบข้าว ใบธง และกาบหุ้มมรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้ง เกษตรกรมักจะใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อ วาลิดามัยซิน โพรพิโคนาโซล เพนไซคูรอน (สำนักงานพัฒนาข้าว, 2561) แต่การใช้สารเคมีในนาข้าวที่มากเกินความจำเป็นก่อให้เกิดเป็นอันตรายต่อทั้งเกษตรกรและผู้บริโภคข้าว รวมทั้งเกิดปัญหาสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นที่ยอมรับในการเป็นส่วนหนึ่งของการจัดการโรคพืชแบบผสมผสาน หรือการผลิตพืชอินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งนำไปสู่การควบคุมโรคพืชอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต (อนันต์, 2557)

แอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการศึกษาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เนื่องจากพบในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ โคลน และบริเวณรอบรากพืช เป็นต้น มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์และทำให้เกิดการหมุนเวียนแร่ธาตุในระบบ จีนัสที่พบมากที่สุดในดินคือ *Streptomyces* โดยมีรายงานการศึกษาถึงกลไกการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชของ *Streptomyces* ได้แก่ ความสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ amylase, cellulase, protease, β-1,3-glucosidase และ chitinase ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา การสร้างสารปฏิชีวนะ การสร้าง siderophore และ ฮอร์โมน Indoe acetic acid เป็นต้น (Faheem et al., 2015; Gopalakrishnan et al., 2011) อย่างไรก็ตามการความสำเร็จในการนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ในสภาวะธรรมชาตินั้น ต้องมีการมีปริมาณเพียงพอและไม่สูญหายไป ซึ่งต้องผลิตจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปของสูตรสำเร็จจุลินทรีย์ โดยการนำไปเพิ่มจำนวนในวัสดุพาหะของแข็ง (solid-based inoculant) ที่เหมาะสม เช่น ถ่านหิน เบนโทไนท์ แร่ดินเหนียว เวมิคูไลท์ และพีท เพื่อช่วยให้มั่นใจว่าจุลินทรีย์เจริญและมีชีวิตรอดในดินและช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เพอร์ไลต์เป็นวัสดุตรึงจุลินทรีย์ เนื่องจากเมื่อนำไปเผาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในเวลาที่รวดเร็ว จะขยายตัว มีน้ำหนักเบา และมีความพรุนสูง (สำนักเหมืองแร่และสัมปทาน, 2018) ซึ่งรูพรุนของเพอร์ไลต์จะสามารถช่วย

ตรึงจุลินทรีย์ได้ มีรายงานการใช้เพอร์ไลต์เป็นวัสดุตรึงเชื้อส่งเสริมการเจริญของพืช *Sinhorhizobium fredii* และ *Bradyrhizobium japonicumachieving* โดยมีปริมาณเชื้อในวัสดุตรึงเท่ากับ 10^9–10^{10} $CFUg^{-1}$ (Bejarano et al., 2017; Daza et al., 2000) อีกทั้งแหล่งผลิตเพอร์ไลต์ที่สำคัญแหล่งหนึ่งในประเทศไทย คือ อำเภอสระโบสถ์ จังหวัดลพบุรี จากที่กล่าวมาข้างต้นโครงการวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาการผลิตสูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์จากเพอร์ไลต์เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าว โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นต้นแบบในการพัฒนาชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ลดผลกระทบจากสารเคมีที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม และสามารถต่อยอดเพื่อปรับปรุงระบบการผลิตทางการเกษตรอินทรีย์แบบยั่งยืนในพื้นที่การปลูกข้าวในประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์กับวัสดุตัวกลางเพอร์ไลต์และศึกษาอายุการเก็บรักษา

2) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวของสูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ในระดับกระถาง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในระดับห้องปฏิบัติการ มาผลิตเป็นสูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ โดยทดสอบการตรึงเซลล์กับตัวกลางเพอร์ไลต์ที่ สภาวะต่างๆ และทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมการเกิดโรคกาบใบแห้งในข้าวของสูตรสำเร็จ แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ในระดับกระถาง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้สูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าว

2) ความรู้และผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์จะเป็นต้นแบบของการพัฒนาระบบการทำเกษตรแบบยั่งยืน โดยมุ่งที่การใช้วิธีที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในการควบคุมโรคข้าว และสามารถต่อยอดการพัฒนาชีวภัณฑ์จุลินทรีย์เพื่อการควบคุมเชื้อราโรคพืชชนิดอื่นต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)

ลักษณะทั่วไป

แอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกใน Class Actinobacteria มีลักษณะเด่น คือ มีเบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ในสารพันธุกรรมสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่มีรูปร่างลักษณะการเจริญภายนอกคล้ายเชื้อรา สร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ ลักษณะสำคัญของแอคติโนมัยซิทีสเป็นแบคทีเรียที่แท้จริง คือ มีผนังเซลล์ประกอบด้วย peptidoglycan และมีพวกกรดมิวรามิกและกรดไดอะมิโนไพมิลิก (diaminopiminolic acid, DAP) ไม่มีไคตินและเซลลูโลส โคโลนีมีลักษณะทึบแสง อาจมีผิวเรียบคล้ายหนังสัตว์หรือรอยย่น สามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น เขียว ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และดำ เป็นต้น สามารถสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร เรียกว่า substrate mycelium และเส้นใยเหนือผิวอาหาร เรียกว่า aerial mycelium แอคติโนมัยสีทพบได้ในสภาวะแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน น้ำ โคลน และปมราก เป็นต้น ในดินทั่วไปพบแอคติโนมัยสีทเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรีย เช่น ดิน 1 กรัม ที่มีสารอินทรีย์วัตถุจะพบแอคติโนมัยสีทประมาณ 10^5-10^8 เซลล์ ส่วนดินที่มีสภาพเป็นเบส อาจพบแอคติโนมัยซิทีสได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด แอคติโนมัยสีทมีการดำรงชีวิตอิสระ (saprophytic) ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลซับซ้อนได้เช่น ลิกนิน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน เคราตินและไคติน (ยุวดี, 2546)

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทค่อนข้างทนต่อความแห้งแล้งดังนั้นจึงสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่แห้งแล้งมาก เช่น ดินในทะเลทราย นอกจากนั้นยังชอบที่จะเจริญในสภาวะที่เป็นด่างหรือเป็นกลางแต่ไม่ทนในสภาวะเป็นกรด แอคติโนมัยซิทีสได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อมีการค้นพบว่าบางสกุลของแอคติโนมัยซิทีส เช่น *Streptomyces* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (สุบัณฑิต, 2549)

สัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท

การสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยซิทีส

โคโลนีของแอคติโนมัยสีทเกิดจากการสร้างเส้นใยจำนวนมาก จนเกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคโลนี (colony) ซึ่งความหมายของโคโลนีของแอคติโนมัยสีทจะต่างจากโคโลนีของแบคทีเรีย (ทิสนา, 2550) เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียจะเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนกัน แต่โคโลนีของแอคติโนมัยสีทเกิดจากการรวมกันของเส้นใย เป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดังแสดงภาพที่ 1 เป็นวงชีวิตของการสร้างโคโลนีของ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

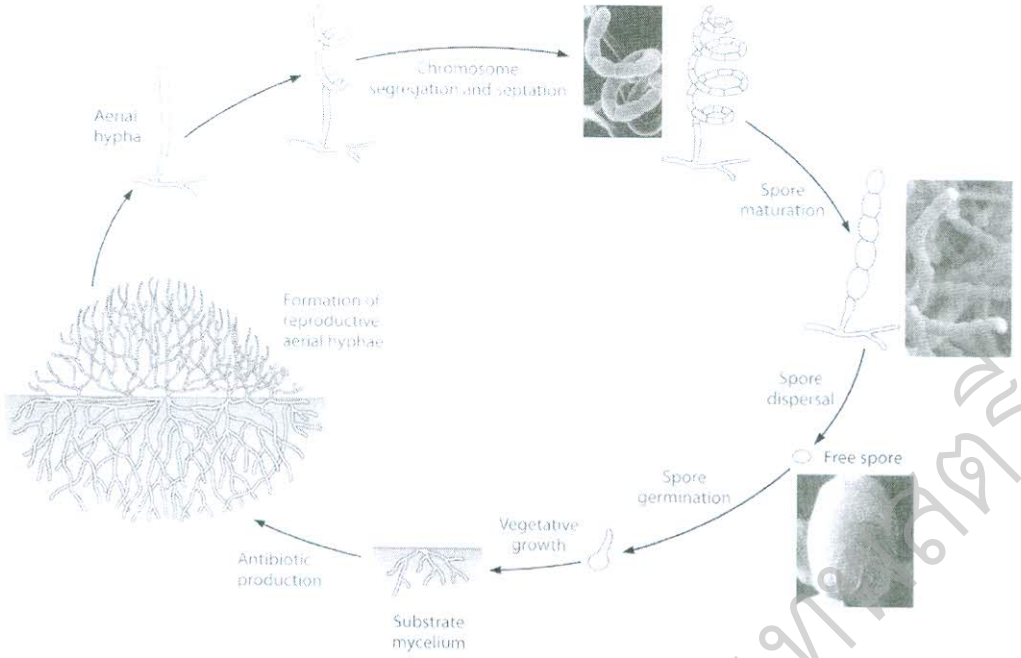
แอคติโนมัยสีท เริ่มจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่แตกหัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม จากนั้นเมื่อหัวเชื้อตกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะพัฒนาเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และสายใยอาหารเจริญโดยการแทงผ่านอาหารขึ้นมาเป็นเส้นใยอากาศ (aerial hyphae) ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนี เช่น สร้างสปอร์โดยการแบ่งตัวของเส้นใยเริ่มจากการสร้างผนังกั้นภายในเส้นใย โดยทั่วไปเส้นใยมักมีผนังกั้นชั้นเดียวเพื่อความคงตัว และสร้างเส้นใยแข็ง (ยุวดี, 2546)

ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันของแต่ละสปีชีส์ เช่น ใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยอากาศจะสร้างสปอร์และอับสปอร์ โคโลนีของแอคติโนมัยสีทมีลักษณะนูน (raised) เรียบแบน (flat) บางครั้งมีลักษณะคล้ายแผ่นหนัง (leather) มีความหลากหลายตั้งแต่นุ่มเหนียวจนถึงแข็ง สีโคโลนีมีสี ขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้า เขียว น้ำตาลและดำ ผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบ (smooth) สันนูน (ridged) ขรุขระ (rough) เป็นรอยย่น (wrinkled) เป็นเม็ดเล็ก (granular) เป็นผง (powder) หรือเป็นเกล็ด (squamous) ขนาดโคโลนีขึ้นอยู่กับสปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (ทิสนา, 2550)

การจัดจำแนกแอคติโนมัยสีท

การจำแนกแอคติโนมัยสีทในพื้นฐานจะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของสายใยอาหาร สายใยอากาศ (conidia) และอับสปอร์ นอกจากนี้ลักษณะทางเคมีของเซลล์ คือ Dibasic amino acid ในผนังเซลล์และการวิเคราะห์น้ำตาลภายในเซลล์ที่ถูกย่อย สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนก แอคติโนมัยสีทได้อีกด้วย จากการวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีของเซลล์ ได้แบ่งผนังเซลล์ของแอคติโนมัยสีท ออกได้เป็น 4 ชนิด แสดงดังตารางที่ 1 ผนังเซลล์ I คือมี diaminopimelic acid (DAP) ที่มีไอโซเมอร์แบบ L- พบในกลุ่ม Streptomycetes และในสกุลที่ใกล้เคียงกันซึ่งทำให้สามารถจำแนกกลุ่มดังกล่าว ออกจากแอคติโนมัยสีทกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน (กิ่งจันทน์, 2555)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของแอคติโนมัยสีท

ที่มา: Actinomycetes (2018)

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของผนังเซลล์และน้ำตาลในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยสีท

ชนิดของผนังเซลล์	รูปแบบของกรดอะมิโนและน้ำตาล
I	L- diaminopimelic acid ไกลซีน
II	Meso* diaminopimelic acid ไกลซีน
III	meso diaminopimelic acid ไม่พบไกลซีน
IV	meso diaminopimelic acid อะราบิโนส กาแลคโตส ไม่พบไกลซีน

* อาจพบในรูปของ 3-hydroxy diaminopimelic acid

ที่มา: กิ่งจันทน์ (2555)

นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีท คือ ลักษณะรูปร่างและสีของเส้นใยและสปอร์ การสร้างรงควัตถุที่แพร่เข้าในอาหาร การสร้างรงควัตถุเมลานีน และลำดับของเบส 16S rDNA สามารถใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยสีทออกเป็น 8 กลุ่มใหญ่ (วีระวัฒน์, 2544)

1) Nocardioform actinomycetes ประกอบด้วย

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สกุล Nocardia

สกุล Rhodococus

สกุล Nocaridioides

สกุล Pseudonocardia

สกุล Oerskovis

สกุล Saccharopolyspora

สกุล Micropolyspora

สกุล Promicromonospora

สกุล Intersporangium

สกุล Actinopolyspora

สกุล Saccharomonospora

สกุล Amycolatopsis

สกุล Amycolata

2) Actinomycetes with multi-locular sporangia ประกอบด้วย

สกุล Geodermatophilus

สกุล Dermatophilus

สกุล Frankia

3) Actinoplanetes ประกอบด้วย

สกุล Actinoplanes

สกุล Ampullariella

สกุล Pilimelia

สกุล Dactylosporangium

สกุล Micromonospora

4) Sterptomycetes and related genera ประกอบด้วย

สกุล Sterptomyces

สกุล Sterptoveticllium

สกุล Kineosporia

สกุล Sporichtpya

5) Madurometes ประกอบด้วย

สกุล Actinomadura

สกุล Microbispora

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สกุล Microtetraspora

สกุล Planobispora

สกุล Spirillospora

สกุล Streptosporangium

6) Themomonospora and related genera ประกอบด้วย

สกุล Thermomonospora

สกุล Actinosynnema

สกุล Nocardiopsis

สกุล Streptoalloterichus

7) Thermoactinomycetes ประกอบด้วย

สกุล Thermoactinomyces

8) Other genera ประกอบด้วย

สกุล Glycomyces

สกุล Kibdelosporangium

สกุล Kiasatosporia

สกุล Saccharothix

ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีท

ประโยชน์ที่เกิดจากแอคติโนมัยสีท ได้แก่ ช่วยย่อยสลายวัตถุในดินโดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างยากต่อการย่อยสลายโดยแบคทีเรียหรือเชื้อรา แอคติโนมัยสีทหลายสายพันธุ์สามารถย่อยสลาย แป้ง (starch) อินูลิน (inulin) หรือไคตินได้ ความสามารถในการย่อยไคตินเป็นคุณสมบัติพิเศษของแอคติโนมัยสีท แอคติโนมัยสีทยังมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายยากบางตัวที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียและเชื้อราได้ เช่น *Nocardia* ย่อยสลายสารจำพวกพาราฟิน (paraffins) ฟีนอล (phenols) และไพริมิดีน (pyrimidine) *Micromonospora* ย่อยสลายไคติน (chitin) เซลลูโลส (cellulose) กลูโคไซด์ (glucosides) เพนโดแซน (pentosan) และลิกนิน (lignin)

ในธรรมชาติ *Streptomyces* มีบทบาทสำคัญในการซากพืชและซากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ดี สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) *Streptomycetes* หลายชนิดสามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของหญ้า ไม้เนื้ออ่อน และไม้เนื้อแข็ง รวมทั้งย่อยสลายไคติน เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เคอราติน เปคติน รวมทั้งผนังเซลล์ของเชื้อรา นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังสามารถสร้างเมลานินซึ่งเป็นรงควัตถุคล้ายๆ กรดฮิวมิค ซึ่งอาจช่วย

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สร้างฮิวมัสในดินด้วย จึงทำให้แอคติโนมัยสีทมีบทบาทที่สำคัญมากในการทำปุ๋ยหมัก โดยเฉพาะพวกที่ชอบเจริญในช่วงอุณหภูมิสูงๆ (thermophilic) เพราะเนื่องจากขนวนการหมักปุ๋ยหมักจะเกิดความร้อน ทำให้อุณหภูมิในกองปุ๋ยสูงมาก แอคติโนมัยสีทที่พบในกองปุ๋ยหมัก ได้แก่ *Streptomyces, Thermoactinomyces* และ *Thermomonospora* (ศรีสกุล, 2553)

2.2 การควบคุมโรคโดยชีววิธี

การควบคมโรคโดยชีวิธี (biological control) หมายถึง การลดปริมาณเชื้อสาเหตุของโรคหรือลดกิจกรรมการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคหรือปรสิตที่อยู่ในระยะที่มีปฏิกิริยา โดยการใช้สิ่งมีชีวิตหนึ่งหรือมากกว่ามาใช้ในการควบคุม และอาจรวมถึงการใช้สารพันธุกรรม (ยีนหรือผลิตภัณฑ์จากยีน) จากสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นไม่รวมถึงมนุษย์ (มัลลิกา, 2550)

กลไกการควบคุมโรคโดยชีววิธีประกอบด้วย

เชื้อปฏิปักษ์ไม่ว่าจะเกิดเองในธรรมชาติหรือที่นักวิชาการนำมาเลี้ยงและขยายให้ผลิตเป็นการค้าได้มีวิธีการทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายรูปแบบ แต่ละรูปแบบก็มีผลแตกต่างกันออกไปดังนี้

1. การเป็นปรสิตโดยตรง หมายถึง การที่เชื้อปฏิปักษ์เข้าทำลายส่วนต่างๆ ภายในของเชื้อก่อโรคพืชได้โดยตรง เช่น การสร้างเอนไซม์ chitinase ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งมีไคตินเป็นองค์ประกอบหลัก โดยแบคทีเรียที่สังเคราะห์เอนไซม์ chitinase การใช้ *Streptomyces* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชโดยสามารถผลิตเอนไซม์ chitinase, β-1,3-glucosidase, cellulase and protease ที่ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรค เช่น *V. dahliae* (Xue et al., 2013) *Fusarium oxysporum* (Gopalakrishnan et al., 2011) *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Sclerotium rolfsii* (Prapagdee et al., 2008) เป็นต้น

2. การแข่งขันกัน คือ การที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งเข้าไปยึดพื้นที่หรือเจริญเติบโตก่อนที่เชื้อสาเหตุโรคพืชจะสามารถเข้าทำลายพืชได้

3. การสร้างสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในดินหลายชนิด

4. การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อโรค (induction of resistant in plant) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปกระตุ้นให้ต้นพืชไปสร้างภูมิคุ้มกัน หรือสร้างสารต่างๆ ที่มีผลในการต่อต้านหรือยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช

ตัวอย่างการศึกษาการนำแอคติโนมัยสีทมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ได้แก่

มัลลิกา (2550) ทำการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณรอบรากพริกและมะเขือเทศที่เก็บจากสวนในพื้นที่อำเภอแม่ริมและอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยก *Streptomyces, Nocardiopsis, Norcardia* และ *Actinomadura* เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา

ก่อโรคเน่าระดับคอดินของพริกโดยวิธี dual culture พบว่า *Streptomyces* สามารถยับยั้ง *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* เมื่อนำแอคติโนมัยสีทไปทำการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคบนกระดาษชื้น พบว่าลดดัชนีการทำลาย *Pythium* sp. และ *R. solani* ได้

นราวรรณและคณะ (2554) คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินนาข้าว นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าว *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* และ *Rhizoctonia solani* โดยวิธี dual culture พบว่า *Streptomyces hygroscopicus* RF 16-2 สามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบการงอกของเมล็ดข้าวในสภาวะที่มี *F. moniliforme* บนกระดาษชื้น พบว่าการปลูกเชื้อสปอร์แขวนลอยของ *S. hygroscopicus* RF 16-2 เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการงอก ความยาวรากของข้าว เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อปลูกเชื้อ *S. hygroscopicus* RF 16-2 ร่วมกับ *F. moniliforme* ทำให้การงอกของเมล็ดข้าวมีความยาวของรากเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อ *F. moniliforme* เพียงอย่างเดียว

Boukaew และ Prasertsan (2014) ศึกษาประสิทธิภาพของ *Streptomyces philanthi* RM-1-138 ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum capcisi*, *Ganoderma boninense*, *Fusarium fujikuroi* และ *Bipolaris oryzae* มีการยับยั้งระหว่าง 82.2-89.2 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถยับยั้ง *R. solani* ได้ดีที่สุด เมื่อนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ของ *S. philanthi* RM-1-138 ไปทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคกาบใบแห้งที่เกิดจาก *R. solani* กับต้นข้าวในสภาวะเรือนกระจก พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์

Ebrahimi Zarandi et al. (2009) ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* สาเหตุของโรคไหม้ในข้าวโดยใช้ *Streptomyces sindeneusis* 263 โดยเมื่อนำสปอร์แขวนลอยของ *M. oryzae* และ *S. sindeneusis* 263 ไปสเปรย์บนใบข้าวระยะต้นกล้าที่ปลูกในกระถาง พบว่าสามารถลดการเกิดโรคไหม้ที่ใบข้าวได้ โดย *S. sindeneusis* 263 ลดการเกิดรอยแผลไหม้บนใบข้าวได้อย่างชัดเจน

Jung et al. (2013) คัดแยก *Streptomyces* sp. BN1 จากเมล็ดข้าวที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusaruim graminearum* ที่ก่อโรครวงไหม้ (*Fusarium* head blight) โดยนำสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. BN1 ไปสเปรย์บนรวงข้าวสาลีที่ปลูกในกระถางสภาวะเรือนกระจก พบว่า *Streptomyces* sp. BN1 สามารถลดการเกิดแผลไหม้ที่รวงข้าวได้ โดยลดการเกิดโรครวงไหม้ได้ 32 เปอร์เซ็นต์

Prabavathy et al. (2006) ศึกษาสารต่อต้านเชื้อรา SPM5C-1 และ SPM5C-2 ที่สกัดด้วย ethyl acetate จากน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. PM5 และทำให้บริสุทธิ์โดย gel column chromatography และ thin layer chromatography เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ก่อโรคโดยวิธี well diffusion สาร SPM5C-1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และ *Rhizoctonia solani* ที่ก่อโรคใบไหม้และกาบใบไหม้ในข้าวได้ และทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในแปลงทดลองพบว่า การสเปรย์สาร SPM5C-1 บนต้นข้าวสามารถลดการเกิดโรคใบไหม้และกาบใบไหม้ได้ 76.1 และ 82.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Prapagdee et al. (2008) ทำการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณรอบรากพืช และทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Sclerotium rolfsii* พบว่า *Streptomyces hygroscopicus* ที่สามารถสร้าง chitinase and β -1,3-glucanase ยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้

Gopalakrishnan et al. (2011) ทำการแยกแอคติโนมัยสีทจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินและทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในถั่วเขียวโดยวิธี dual culture พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้ง *Fusarium oxysporum* ได้ 5 ไอโซเลต ซึ่งสามารถผลิต siderophore, cellulase, protease, hydrocyanic acid, indole acetic acid (IAA) โดยเฉพาะเอนไซม์ cellulose และ protease นอกจากจะช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์แล้ว ยังสามารถช่วยในเรื่องการควบคุมทางชีววิธีโดยสามารถย่อยสลายเซลลูโลสและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์เชื้อก่อโรคพืชได้ ซึ่งเมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของแอคติโนมัยสีททั้ง 5 ไอโซเลตโดยใช้ลำดับเบสยีน 16srRNA พบว่าคือจีนัส *Streptomyces*

2.3 รูปแบบของสูตรสำเร็จจุลินทรีย์

เมื่อทำการคัดเลือกได้เชื้อที่มีคุณสมบัติที่ต้องการแล้ว จำเป็นที่จะต้องดำเนินการพัฒนารูปแบบสูตร (formulation) ที่จะทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้และได้ประสิทธิภาพสูง รูปแบบสูตรสำเร็จจุลินทรีย์ที่นิยมพัฒนาและนำไปใช้มี 3 รูปแบบ ได้แก่ (อนุเทพ, 2561)

1. รูปแบบสูตรน้ำ (liquid formulation) เป็นรูปแบบสูตรที่ผลิตได้ง่ายแต่เก็บรักษาได้ยาก ไม่สะดวกในการขนส่ง การผลิตสูตรน้ำทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว และนำมาผสมกับน้ำหรือสารละลายที่เหมาะสม

2. รูปแบบสูตรผง (powder formulation) เป็นรูปแบบสูตรที่ผลิตได้ง่าย สามารถเก็บรักษาได้ยาวนานกว่าสูตรน้ำ ขนส่งได้สะดวก โดยการผลิตเริ่มจากการเตรียมเชื้อผงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแบบเหลวแล้วผสมกับสารป้องกันเซลล์ เช่น กลีเซอรีน น้ำตาล แป้งมัน และสารผง ได้แก่ ทัลกัม (talcum) คาร์บอกซิลเมทธิลเซลลูโลส (carboxyl methyl cellulose) ไดอะตอมไมต์ (diatomite) แล้วนำส่วนผสมมาอบให้แห้งแล้วบดให้เป็นผงละเอียด

3. รูปแบบสูตรเม็ด (granular formulation) เป็นรูปแบบสูตรที่นิยมนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนประกอบของรูปแบบสูตรคล้ายกับรูปแบบสูตรผง กล่าวคือมีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์และผสมกับ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

สารป้องกันเชลล์ สารผงและสารจับตัวหรือสารยึดเกาะในการทำเม็ด และนำไปทำให้แห้งในรูปของเม็ด เชื้อสูตรเม็ดสามารถใช้ในรูปของการละลายน้ำหรือหว่านลงดิน

จุลินทรีย์ในรูปแบบสูตรต่าง ๆ จะต้องได้รับการตรวจสอบคุณภาพของรูปแบบสูตร โดยศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ความคงตัวของรูปแบบสูตร การละลายตัวในน้ำ การมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และการศึกษาประสิทธิภาพของรูปแบบสูตรจุลินทรีย์ทั้งในห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง และในสภาพไร่

2.4 เพอร์ไลต์ (Perlite)

ในความหมายทางการค้า “เพอร์ไลต์” หมายถึงหินภูเขาไฟเนื้อแก้วหรือหินเพอร์ไลต์ เมื่อนำไปเผาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในเวลาที่รวดเร็ว จะขยายตัว มีน้ำหนักเบา และมีความพรุนสูง

หินเพอร์ไลต์ ได้แก่ หินภูเขาไฟเนื้อแก้ว ที่มีลักษณะรอยแตกเป็นวงๆ ซ้อนกันคล้ายกลีบหัวหอม และเมื่อถูกเผาที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ในเวลาที่รวดเร็วจะขยายตัวออกไปได้ ตั้งแต่ 4-20 เท่าของปริมาตรเดิม ทำให้เปลี่ยนสภาพเป็นสารที่มีน้ำหนักเบา มีความพรุนสูง และมีลักษณะคล้ายหินพัมมิส สารที่ได้จากการขยายตัวของหินเพอร์ไลต์นี้ เรียกว่า เพอร์ไลต์ (กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่, 2561)

หินเพอร์ไลต์เป็นหินภูเขาไฟเนื้อแก้ว ที่มีส่วนประกอบของออกไซด์ของธาตุซิลิกาค่อนข้างสูง ประมาณร้อยละ 70 หรือมากกว่า มีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 2-5 ไม่ทำปฏิกริยาทางเคมีกับสารเคมีอื่นๆ ได้ง่ายนัก จัดอยู่ในจำพวกสารเฉื่อยต่อปฏิกิริยาทางเคมี เนื้อแก้วของหินเพอร์ไลต์ จะมีการเปลี่ยนสภาพแก้วเป็นผลึก (devitrification)

แหล่งหินเพอร์ไลต์ในประเทศไทยพบเฉพาะกลุ่มหินภูเขาไฟลำนารายณ์ ในเขตจังหวัดลพบุรีและเพชรบูรณ์ ครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 1,200 ตารางกิโลเมตร ซึ่งองค์ประกอบของหินเพอร์ไลต์ในบริเวณนี้มีปริมาณ K_2O สูงกว่าแหล่งอื่น หินเพอร์ไลต์ใช้ประโยชน์ในลักษณะของวัสดุที่ผ่านการเผาแล้ว แบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ด้านการก่อสร้าง ด้านการเกษตร และอุตสาหกรรม เช่น ใช้เป็นวัสดุมวลเบา ฉนวนป้องกันความร้อนและเสียง ใช้เป็นวัสดุปรับปรุงดินและวัสดุที่ใช้ในการปลูกพืชแทนดิน เป็นตัวกรอง และวัสดุสำหรับการขัด เป็นต้น (ดรุณี, 2549)

ประโยชน์ของเพอร์ไลต์ในด้านการเกษตร

ในการรักษาและปรับสภาพของดินที่ใช้ในการเกษตร มีการใช้เพอร์ไลต์ผสมลงไปในดิน เนื่องจากเพอร์ไลต์มีคุณสมบัติเป็นตัวดูดซึมที่ดี และมีความพรุนในตัวสูง ทำให้สภาพดินเป็นดินร่วน และเพอร์ไลต์ยังสามารถช่วยรักษาความสมดุลระหว่างปริมาณของน้ำและอากาศในดินได้ด้วย

จากผลการทดลองของบริษัทผลิตเพอร์ไลต์ของประเทศญี่ปุ่น พบว่าเมื่อผสมเพอร์ไลต์ลงไปในดิน จะมีคุณสมบัติดังนี้ (กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่, 2561)

1) ความพรุนของเพอร์ไลต์มีมากกว่าดินเหนียวทั่วไปกว่า 5 เท่า ทำให้มีปริมาณของก๊าซออกซิเจนในดินเหนียวพอต่อความต้องการของพืช

2) สามารถกักเก็บความชื้นไว้ได้ดีกว่าดินทรายถึง 4 เท่า ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้ดินแห้งจนเกินไป และรักษาความสมดุลระหว่างปริมาณน้ำและอากาศในดิน ทำให้ดินรักษาสภาพไม่ชื้นหรือแห้งจนเกินไป

3) ทำให้ดินมีความยุ่ย ไม่จับตัวกันแข็ง

4) คุณสมบัติความเป็นฉนวน จะช่วยรักษาอุณหภูมิของดินไม่ให้เปลี่ยนแปลงมาก

5) ช่วยรากพืชในการดูดซึมอาหาร

6) มีสภาพเป็นกลาง มีความคงทนต่อปฏิกิริยาทางเคมี สามารถผสมเพอร์ไลต์กับปุ๋ยเคมีทุกชนิดได้

7) เพอร์ไลต์จัดเป็นพวกสารอนินทรีย์ เมื่อผสมลงในดินจะมีความคงทนและไม่ผุสลายจากจุลินทรีย์

8) เพอร์ไลต์ช่วยดูดซึมสะสมพวกยาฆ่าแมลงยากำจัดวัชพืช และปุ๋ยเคมีต่างๆ ที่เกษตรกรเติมลงไปในดินไว้ไม่ให้ซึมหายออกไปจากดินเร็วเกินไป และยังเป็นตัวช่วยลดความเข้มข้นของปุ๋ย และยาฆ่าแมลงที่เติมลงไปในดิน

2.5 โรคข้าว

โรคข้าว หมายถึง ความผิดปกติที่ต้นข้าวแสดงออก สาเหตุของโรคอาจจะเกิดจากสิ่งมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต อาจจะเกิดขึ้นเดี่ยวๆ หรือเกิดร่วมกันก็ได้ สิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่จุลินทรีย์กลุ่มเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไฟโตพลาสมา จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถทำให้ต้นข้าวแสดงอาการผิดปกติได้ชัดเจนที่ใบ ลำต้น กาบใบ รวงหรือเมล็ด (สำนักงานพัฒนาข้าว, 2561)

โรคกาบใบแห้ง

สาเหตุเกิดจาก เชื้อรา *Rhizoctonia solani* ลักษณะที่สำคัญของคือไม่สร้าง asexual spore คงมีแต่เส้นใย เส้นใยจะอัดรวมกันเป็นเม็ด sclerotia เพื่ออยู่ข้ามฤดู โดยเม็ด sclerotia จะอยู่ในดินและซากพืช หรือพืชอาศัยและแพร่ระบาดทำความเสียหายในฤดูปลูกต่อไป เชื้อราชนิดนี้ทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าบนเมล็ด และต้นกล้าที่ยังไม่โผล่พ้นระดับผิวดิน และเน่าระดับดินเช่น โรคโคนเน่าของกล้าปลี (พีระวรรณและคณะ, 2554) พบมาก ในนาชลประทาน ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ ลักษณะแผลสีเขียวปนเทา ขนาดประมาณ 1 - 4 x 2 – 10 มิลลิเมตร ปรากฏตามกาบใบตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำ เริ่มพบโรคในระยะแตกกอจนถึงระยะใกล้เก็บเกี่ยว ยิ่งต้นข้าวมีการแตกกอมากเท่าใด ต้นข้าวก็จะเบียดเสียดกันมากขึ้น โรคก็จะเป็นรุนแรง แผลจะลุกลามขยายใหญ่ขึ้นจนมีขนาดไม่จำกัด และลุกลาม

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ขยายขึ้นถึงใบข้าว ถ้าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ แผลสามารถลุกลามถึงใบธงและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้ง ผลผลิตจะลดลงอย่างมากมาย โดยเชื้อราสามารถสร้างเม็ดขยายพันธุ์ อยู่ได้นานในตอซังหรือวัชพืชในนาตามดินนา (สำนักงานพัฒนาข้าว, 2561)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) บริษัท Tomy Seiko Co.,Ltd.

1.2 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) บริษัท Clayson Laboratory

1.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Contherm Scientific Ltd

1.4 เครื่องเขย่า (Incubator shaker) บริษัท Forma Scientific Inc

1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Andreas Hettich GmbH & Co.KG

1.6 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) บริษัท Ika Works (Asia) Sdn. Bhd.

1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างหยาบ (Balance) บริษัท Mettler-Toledo GmbH

1.8 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Nikon Corporation

1.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) บริษัท Mettler-Toledo GmbH

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1 กลูโคส (D-glucose) บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited

2.2 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) บริษัท Ajax Finechem, Australia

2.3 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India

2.4 สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India

2.5 Potato Dextose Agar บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India

2.6 วุ้น (Agar) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India

3.3 จุลินทรีย์

เชื้อราก่อโรคกาบใบแห้ง *Rhizoctonia solani* ซื้อจาก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

1) สายพันธุ์แอคติโนมัยสีท

สายพันธุ์แอคติโนมัยสีทที่นำมาศึกษาแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างดินนาข้าวในจังหวัดลพบุรีจำนวน 116 ตัวอย่าง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Oatmeal agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนี และศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2) การเตรียมเชื้อราทดสอบ

นำเชื้อรา *Rhizoctonia solani* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และเก็บเชื้อราบนอาหารผิวเอียง PDA

3) การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ของแอคติโนมัยสีทโดยวิธี dual culture

เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหาร Glucose yeast extract malt extract (GYM) agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ตัดโคโลนีแอคติโนมัยสีทด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 2 ชิ้นและนำมาวางบนอาหาร PDA โดยวางห่างจากกึ่งกลางจานเพาะเชื้อด้านละ 3 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตัดปลายเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำไปวางตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 3 วัน วัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อรา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเชื้อราเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จากสูตร [(r1 – r2)/r1] ×100 เมื่อ r1 คือ รัศมีของโคโลนีเชื้อราในจานควบคุมและ r2 คือ รัศมีของโคโลนีเชื้อในจานทดสอบ (Himaman et al., 2016)

4) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสูตรสำเร็จสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่ตรึงบนตัวกลางเพอร์ไลต์

4.1) การศึกษาสภาวะการเขย่าในระหว่างการตรึงเชื้อกับเพอร์ไลต์

เตรียมตัวกลางเพอร์ไลต์ โดยชั่งเพอร์ไลต์ 5 กรัม นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปฆ่าเชื้ออีกครั้ง

เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ในอาหาร GYM broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ (NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์) ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง และละลายด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ จะได้เป็นเซลล์แขวนลอย ตรวจนับแอคติโนมัยสีทโดยการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี spread plate บนอาหาร GYM agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ศึกษาผลของสภาวะการเขย่าในระหว่างการตรึงเชื้อ โดยนำเซลล์แขวนลอยแอคติโนมัยสีทมาเติมในเพอร์ไลต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ ชุดการทดลองที่ 1 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 rpm และชุดการทดลองที่ 2 ตั้งทิ้งไว้โดยไม่เขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเพอร์ไลต์ที่ผ่านการตรึงแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ล้างด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 2 ครั้ง และผึ่งให้แห้งใน laminar air flow ทำการตรวจนับปริมาณแอคติโนมัยสีทโดยวิธี dilution plate และนำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธี spread plate บนอาหาร GYM agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกสภาวะที่สามารถตรึงเซลล์แอคติโนมัยสีทได้สูงสุด

4.2) ศึกษาอุณหภูมิที่ใช้เผาเพอร์ไลต์ที่เหมาะสมต่อการตรึงเชื้อแอคติโนมัยสีท

นำเพอร์ไลต์ไปเผาที่เตาเผาอุณหภูมิสูง ที่อุณหภูมิ 500, 700, 900 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปฆ่าเชื้ออีกครั้ง

นำเซลล์แขวนลอยแอคติโนมัยสีทมาเติมในเพอร์ไลต์ที่เผาที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ล้างด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 2 ครั้ง และผึ่งให้แห้งใน laminar air flow ทำการตรวจนับปริมาณแอคติโนมัยสีทโดยวิธี dilution plate และนำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธี spread plate บนอาหาร GYM agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกสภาวะที่สามารถตรึงเซลล์แอคติโนมัยสีทได้สูงสุด

5) ศึกษาอายุการเก็บรักษาสูตรสำเร็จแอคติโนมัยสีทที่ตรึงกับเพอร์ไลต์

ทำเก็บรักษาแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ที่อุณหภูมิตู้เย็น (5-8 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง โดยตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา ตรวจนับปริมาณแอคติโนมัยสีทที่มีชีวิตรอด โดยนำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธี spread plate บนอาหาร GYM agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

6) การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวในระดับกระถาง

นำเมล็ดข้าวเปลือกสายพันธุ์ กข 41 มาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยแช่ในสารละลายไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4-5 ครั้ง แช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 คืน รินน้ำออกและวางทิ้งไว้อีก 1 คืน นำไปปลูกในกระถางที่มีดินนาบรรจุ 2 กิโลกรัม แบ่งชุดการทดลอง 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ใช้ต้นข้าว 5 ต้นต่อ 1 ซ้ำ ดังนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ชุดการทดลอง ที่ 1 ชุดควบคุม

ชุดการทดลอง ที่ 2 ปลูกเชื้อรา *R. solani* อย่างเดียว

ชุดการทดลอง ที่ 3 แอคติโนมัยสีท AL13-2 ตรึงเพอร์ไลต์ร่วมกับ *R. solani*

ชุดการทดลอง ที่ 4 แอคติโนมัยสีท AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์ร่วมกับ *R. solani*

เมื่อต้นข้าวอายุ 45 วัน เติมแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ 20 กรัม หลังจากนั้น 3 วันทำการปลูกเชื้อราโดยใช้วิธีดัดแปลงจาก ปิลันธนา และศราวิชญ์ (2558) ตัดปลายเส้นใย *R. solani* บนอาหาร PDA ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำไปปลูกเชื้อบนกาบใบข้าว หลังจากปลูกเชื้อราทำการเติมแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์อีกครั้งในวันที่ 7 หลังจากเติมครั้งแรก สังเกตรอยแผลสีน้ำตาลบนต้นข้าวหลังจากปลูกเชื้อราไปแล้ว 14 วัน วัดความสูงของบาดแผลและความสูงของต้นข้าว นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (% Disease incidence) และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค (%Disease suppression) (Boukaew และ Prasertsan, 2014)

เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค = ความสูงของบาดแผล/ความสูงของต้นข้าว x 100

เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค = [%ความรุนแรงของโรคของชุดควบคุม/%ความรุนแรงของโรคของชุด ทดลอง)/%ความรุนแรงของโรคของชุดควบคุม] x100

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติ ด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 สายพันธุ์แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

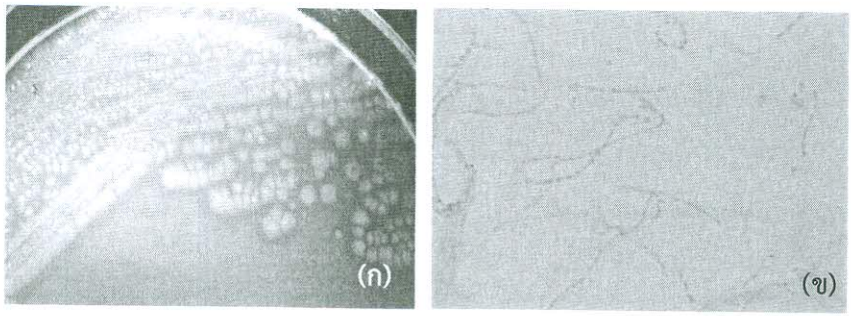
จากการนำแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากนาข้าวในจังหวัดลพบุรี ทั้งหมด 116 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว *R. solani* โดยวิธี dual culture assay พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 มีประสิทธิภาพการยับยั้ง *R. solani* ได้สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการยับยั้งเชื้อราเท่ากับ 87.61 เปอร์เซ็นต์ และ 92.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลักษณะการยับยั้งเชื้อราของแอคติโนมัยสีท คือทำให้เส้นใยเชื้อราหยุดการเจริญถึงแม้ว่าเชื้อทั้งสองไม่เจริญเข้าหากันโดยตรง (ภาพที่2) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสร้างสารเมแทบอไลต์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ภายหลังจากเลี้ยงร่วมกัน ซึ่ง Boukaew and Prasertsan (2014) ได้นำ *Streptomyces philanthi* RM-1-138 มายับยั้ง *R. solani* พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ของเชื้อราและชักนำให้เกิดการรั่วของไซโตพลาสซึม มีผลทำให้เซลล์เชื้อราไม่สามารถเจริญได้

R. solani AL13-2 AL14-2

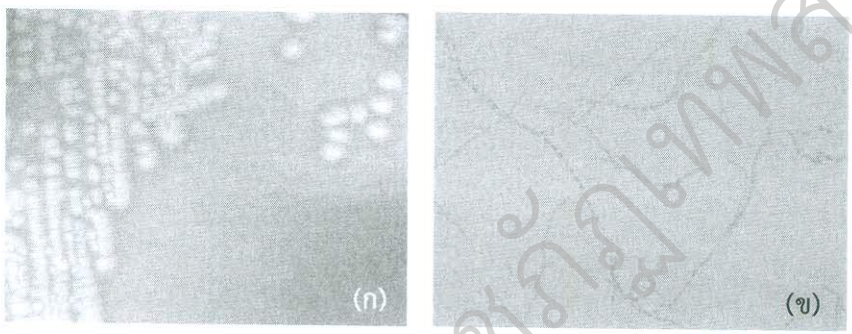
ภาพที่ 2 การยับยั้งของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL13-2 ต่อเชื้อรา *R. solani* บนอาหาร PDA เวลา 3 วัน

เมื่อศึกษาลักษณะรูปร่างเส้นใย และสายสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว แอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 มีลักษณะสปอร์เป็นแบบ Rectiflexbiles สายสปอร์มีลักษณะตรงหรือโค้งงอ (แสดงดังภาพที่ 3 และ 4) แอคติโนมัยสีทที่มีลักษณะสายสปอร์มีลักษณะตรงหรือโค้งงอคล้ายขอเป็นวงปิดหรือเกลียวซ้อนนั้น มีความคล้ายคลึงกับจีนัส *Streptomyces*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนี บนอาหาร Oatmeal agar (ก) และ เส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของไอโซเลต AL13-2



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนี บนอาหาร Oatmeal agar (ก) และ เส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของไอโซเลต AL14-2

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสูตรสำเร็จสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่ตรึงบนตัวกลางเพอร์ไลต์

การเตรียมตัวกลางเพอร์ไลต์สำหรับเป็นตัวกลางในการตรึงเชื้อแอคติโนมัยสีท ใช้เพอร์ไลต์ที่ซื้อมาจากร้านวัสดุทางการเกษตร เป็นเพอร์ไลต์ที่ยังไม่ทำการเผา มีลักษณะเป็นก้อนเล็กขนาดเฉลี่ย 2-3 มิลลิเมตร มีสีขาว น้ำหนักเบาและมีรูพรุน สามารถดูดซึมน้ำได้

จากการนำแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 มาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับการตรึงกับเพอร์ไลต์ พบว่ามีกล้าเชื้อมีปริมาณเชื้อ AL13-2 และ AL14-2 เท่ากับ 2.1×10^9 และ 1.5×10^9 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อนำกล้าเชื้อทั้งสองไอโซเลตไปทำการตรึงกับเพอร์ไลต์โดยการแช่ด้วยเซลล์แขวนลอย พบว่าเพอร์ไลต์มีการดูดซับน้ำทำให้เซลล์แขวนลอยมีปริมาตรลดลงทันที เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยแบ่งเป็นสภาวะแบบมีการเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 rpm และไม่ทำการเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเพอร์ไลต์ที่ได้มาตรวจสอบปริมาณ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

เชื้อที่ตรึงไว้ พบว่าสามารถเพาะเชื้อทั้งสองจากเพอร์ไลต์หลังการตรึงได้ แสดงให้เห็นว่าเพอร์ไลต์สามารถที่จะเป็นตัวกลางในการยึดเกาะของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ได้ โดยปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดสามารถยึดเกาะตัวกลางเพอร์ไลต์ได้ไม่แตกต่างกัน คืออยู่ในช่วง ($1.3\text{-}2.6\times10^9$ CFU/g) แสดงดังตารางที่ 1 และเมื่อเปรียบเทียบสภาวะการตรึงที่มีการเขย่าเพื่อเพิ่มความสามารถในการกระจายของเชื้อให้ตรึงกับตัวกลางได้ดีขึ้นพบว่า การเขย่าช่วยให้เชื้อเกาะติดกับเพอร์ไลต์ได้มากกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

ตารางที่ 1 ปริมาณแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 ที่ตรวจพบในเพอร์ไลต์หลังการตรึงเชื้อแบบมีการเขย่าและไม่มีการเขย่า

แอคติโนมัยสีท	ปริมาณเชื้อตรึงกับเพอร์ไลต์ (CFU/g)	
	การเขย่า	ไม่มีการเขย่า
AL13-2	2.0×10^9	1.3×10^9
AL14-2	2.6×10^9	1.6×10^9

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเผาเพอร์ไลต์ ได้แก่ 500, 700, และ 900 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเพอร์ไลต์ถูกเผาที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ในเวลาที่รวดเร็วจะขยายตัวออกไปได้ ตั้งแต่ 4-20 เท่าของปริมาตรเดิม ทำให้มีความพรุนสูง (กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่, 2561) ซึ่งจะทำให้การตรึงเชื้อได้ปริมาณมากขึ้น ผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ตรึงกับเพอร์ไลต์ที่อุณหภูมิต่างๆ ไม่แตกต่างจากการไม่เผา แสดงดังตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าการเผาเพอร์ไลต์ที่อุณหภูมิสูงอาจไม่ช่วยเพิ่มรูพรุนหรือพื้นที่ผิวของเพอร์ไลต์ได้แตกต่างกับเพอร์ไลต์ที่ไม่เผา ทั้งนี้อาจเป็นเพราะขนาดของเพอร์ไลต์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีขนาดใหญ่ (2-3 มิลลิเมตร) อาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทางกายภาพของเพอร์ไลต์ได้ ดังนี้การเผาเพอร์ไลต์ไม่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกาะติดของแอคติโนมัยสีทกับพื้นผิวหรือรูพรุนได้ ดังนั้นจึงเลือกการไม่เผาเพอร์ไลต์ก่อนการตรึงเชื้อแอคติโนมัยสีทในการเตรียมหัวเชื้อแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

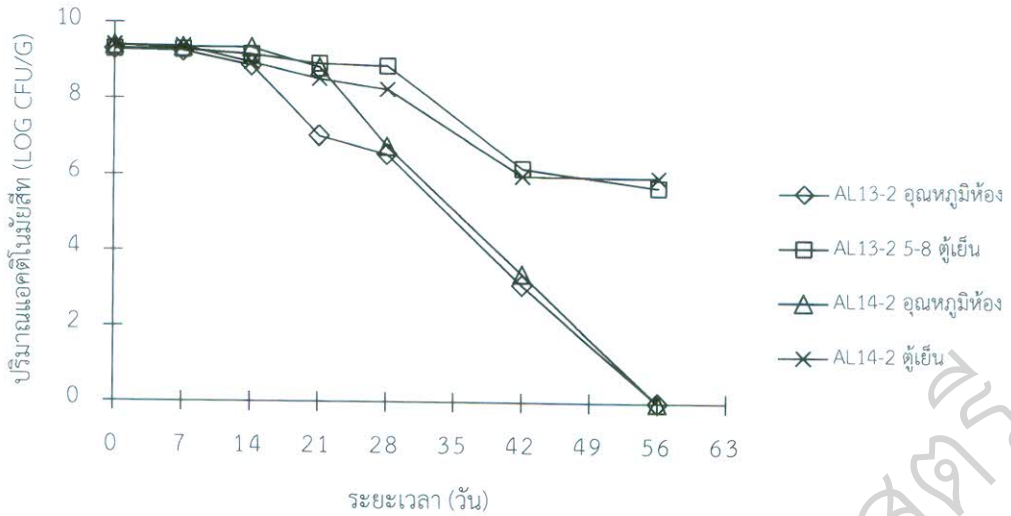
ตารางที่ 2 ปริมาณแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 ที่ตรวจพบในเพอร์ไลต์หลังการตรึงเชื้อกับเพอร์ไลต์เผาที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิในการเผาเพอร์ไลต์ (°C)	ปริมาณเชื้อตรึงกับเพอร์ไลต์ (CFU/g)	
	AL13-2	AL14-2
ไม่มีการเผา	2.0×10^9	2.6×10^9
500	1.9×10^9	2.4×10^9
700	2.1×10^9	2.6×10^9
900	2.1×10^9	2.7×10^9

4.3 การศึกษาอายุการเก็บรักษาแอคติโนมัยสีทตรึงกับเพอร์ไลต์

จากการศึกษาอายุการเก็บรักษาของแอคติโนมัยสีท AL13-2 และ AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์ โดยเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องและในตู้เย็น เป็นเวลา 56 วัน (ภาพที่ 5) พบว่าแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องมีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 2.0×10^9 (9.30 Log CFU/g) และ 2.6×10^9 CFU/g (9.41 Log CFU/g) ปริมาณเชื้อคงที่ในช่วง 14 วัน หลังจากนั้นปริมาณเชื้อลดลงอย่างมากและลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นหลังวันที่ 35 ของการเก็บรักษา ในขณะที่แอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 ที่เก็บรักษาในตู้เย็น (5-8 องศาเซลเซียส) มีปริมาณรอดชีวิตค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 28 ของการเก็บรักษา และปริมาณลดลงอย่างมากหลังวันที่ 28 ของการเก็บรักษา และลดลงต่ำสุดในวันที่ 56 ของการเก็บรักษา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแอคติโนมัยสีท AL13-2 และ AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์คือในตู้เย็นเป็นเวลา 28 วัน

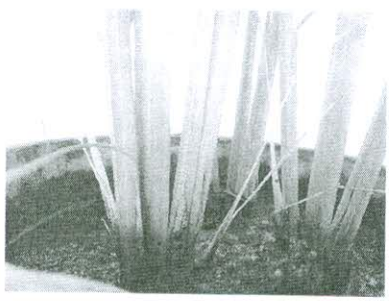
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



ภาพที่ 5 ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของแอคติโนมัยสีท AL13-2 และ AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็น (5-8 องศาเซลเซียส)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวในระดับกระถาง

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีท AL13-2 และ AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์ต่อการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวสายพันธุ์ กข41 ในระดับกระถาง พบว่าชุดทดลองที่มีการใช้แอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ปลูกเชื้อรา *R. solani* เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 3) แอคติโนมัยสีท AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์สามารถลดความรุนแรงของโรคได้สูงที่สุดเท่ากับ 8.72 เปอร์เซ็นต์ และช่วยเพิ่มการป้องกันการเกิดโรค 61.48 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองครั้งนี้จึงสามารถนำแอคติโนมัยสีท AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์ไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อการควบคุมเชื้อรา *R. solani* ไปประยุกต์ใช้ในระดับเรือนทดลองและแปลงปลูกจริงต่อไป



ภาพที่ 6 ลักษณะแผลบนต้นข้าวที่มีการปลูกเชื้อ *R. solani*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทตรึงเพอร์ไลต์ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวในระดับกระถาง

ชุดทดลอง	ความสูงต้นข้าว (cm)	ความสูงบาดแผล (cm)	ความรุนแรงของโรค (%)	การลดการเกิดโรค (%)
ชุดควบคุม	45.59±1.43[a]	0.00[c]	0.00[c]	0.00
R. solani	48.76±6.51[a]	10.93±0.22[a]	22.64[a]	0.00
R. solani + AL13-2 ตรึงเพอร์ไลต์	47.79±1.79[a]	5.00±1.51[b]	10.39[b]	54.10
R. solani + AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์	47.53±3.31[a]	4.13±0.35[b]	8.72[b]	61.48

Data are means ± standard deviations (SD) of three replicates. Means designated with same letters do not differ significantly ($p< 0.05$) according to the Duncan's multiple range test

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 ที่แยกจากดินในนาข้าว สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. solani* ที่ก่อโรคกาบใบแห้ง โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงเมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture assay ทำการตรึงแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลตกับตัวกลางเพอร์ไลต์ พบว่าแอคติโนมัยสีททั้งสองไอโซเลตในเพอร์ไลต์มีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อม และแอคติโนมัยสีท AL13-2 และ AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวสายพันธุ์ กข41 ในระดับกระถาง ดังนั้นแอคติโนมัยสีทไอโซเลตปฏิปักษ์ตรึงเพอร์ไลต์จากงานวิจัยนี้จึงมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้การควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ต้องมีการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสยีน 16s rRNA ของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AL13-2 และ AL14-2 เพื่อใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ต่อไป

2. จากข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า AL13-2 และ AL14-2 ตรึงเพอร์ไลต์สามารถพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรคกาบใบแห้งในข้าวต่อไปได้ จำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้ประโยชน์สูงสุด ได้แก่ คุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญ เช่น การสร้างฮอร์โมนพืช ความสามารถในการละลายแร่ธาตุในดิน และการตรึงไนโตรเจน เป็นต้น รวมทั้งการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อในการปลูกข้าวในระดับกระถางหรือในแปลงปลูกจริง

มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี

บรรณานุกรม

กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่. (2561, 3 กันยายน). เพอร์ไลต์ (Perlite). (ออนไลน์) เข้าถึงได้จาก:http://www.dpim.go.th/articles/article?catid=124&articleid=204

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. 2555. ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

ดรุณี สายสุทธิชัย. 2549. สมบัติของหินเพอร์ไลต์และการใช้ประโยชน์. รายงานวิชาการ. สำนักทรัพยากรแร่ กรมทรัพยากรธรณี: กรุงเทพ.

นราวรรณ ปั้นงาม อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และ กรรณิการ์ ดวงมาลย์. 2554. แอคติโนมัยสีทจากดินนาและความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 49: สาขาวิทยาศาสตร์. หน้า 234-241.

ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล และ ศราวิชญ์ สายมงคล 2558. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No.16 ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 วารสารเกษตร 31(3): 301 – 310.

ทิศนา นิธิสกุลกาญจน์. 2550. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตโดยแอคติโนมัยซีตที่แยกจากมูลสัตว์กินพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส ทัศนาพร ทัศัคร ธารทิพย ภาสบุตร ศิวิไล ลาภบรรจบ และอ้อยทิน จันทร์เมือง. 2554. การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันและกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคพืช. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 788-795.

มัลลิกา หมูแก้ว. 2550. การประเมินความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. 2546. การแยกแอคติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรังปลวก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาคจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีรวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร. 2544. สัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่ติดเชื้อแอคติโนฟาจ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศรีสกุล ชนะพันธุ์. 2553. การคัดแยกและคัดกรองเชื้อเอ็นโดไฟติคแอคติโนมันซีสที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2561, 3 กันยายน). การวิเคราะห์อุปสงค์อุปทานและวิถีตลาดสินค้าเกษตรที่สำคัญจังหวัดลพบุรี. (ออนไลน์) เข้าถึงได้จาก: https://drive.google.com

สำนักงานพัฒนาข้าว. (2561, 1 กันยายน). ศัตรูข้าวและการป้องกันกำจัด. (ออนไลน์) เข้าถึงได้จาก: http://www.ricethailand.go.th/Rkb/disease%20and%20insect/index.php-file=content.php&id=32.htm

สำนักเหมืองแร่และสัมปทาน (2561, 1 กันยายน). เพอร์ไลต์. (ออนไลน์) เข้าถึงได้จาก: http://www1.dpim.go.th/ppr/title.php?tid=000001074149948

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2549. **จุลชีววิทยาทางดิน**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

อนันต์ วงเจริญ. 2557. การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว. แก่นเกษตร. 42 (3) : 385-396.

อนุเทพ ภาสุระ. (2561, 1 กันยายน). รูปแบบสูตรชีวภัณฑ์จุลินทรีย์เพื่อดูแลสุขภาพพืช. (ออนไลน์) เข้าถึงได้จาก: http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/topic.asp?TOPIC_ID=6200

Acinomycetes. 2018. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. [Online]. Retrieved June 1, 2018, from http://mmbr.asm.org/content/80/1/1/F4.expansion.html

Bejarano, A., Sauer, U., Mitter, B., Preininger, C. 2017. Parameters influencing adsorption of *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN onto bentonite, silica and talc for microbial inoculants. Applied Clay Science 141: 138–145.

Boukaew, S., and Prasertsan, P. 2014. Suppression of rice sheath blight disease using a heat stable culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RM-1-138. Crop Protection. 61: 1-10.

Daza, A., SantamarõÂa, C., RodrõÂguez-Navarro, D.N., Camacho, M., Orive, R., Temprano, F. 2000. Perlite as a carrier for bacterial inoculants. Soil Biology & Biochemistry. 32: 567-572.

Ebrahimi Zarandi, M., Shahidi Bonjar, G.H., Padasht Dehkaei, F., Ayatollahi Moosavi, S.A., Rashid Farokhi, P., and Aghighi, S. 2009. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in Greenhouse. American Journal of Applied Sciences. 6 (1): 194-199.

Faheem, M., Raza, W., Zhong, W., Nan, Z., Shen, Q., and Xu, Y. 2015. Evaluation of the biocontrol potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Biological Control. 81: 101–110.

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B. K., Sandeep, D., Vidya, M. S., Deepthi, K.,and Rupela, Om. 2011. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. Crop Protection. 30: 1070-1078.

Himaman, W., Thamchaipenet, A., Pathom-aree, W., and Duangmal K., 2016, Actinomycetes from *Eucalyptus* and their biological activities for controlling *Eucalyptus* leaf and shoot blight, Microbiological Research, 188-189: 42–52.

Jung, B., Park, SY., Lee, YW., and Lee, J. 2013. Biological efficacy of *Streptomyces* sp. strain BN1 against the cereal head blight pathogen *Fusarium graminearum*. Plant Pathol. J. 29(1) : 52-58.

Prabavathy, V. R., Mathivanan, N., amd Murugesan, Kandasamy. 2006. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. Biological Control. 39: 313–319.

Prapagdee, B., Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. International Journal of Biological Sciences. 4(5):330-337.

Xue, L., Xue, Q., Chen, Q., Lin, C., Shen, G., and Zhao, J. 2013. Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton. Crop Protection. 43: 231-240.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม