การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน
Growth Suppression of *Pythium myriotylum* by Rhizobacteria Isolated from Hydroponics

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ* ถนิมนันต์ เจนอักษร และ พรหมมาศ คูหากาญจน์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
Chakrapong Rangjaroen*, Tanimnun Jaenaksorn and Prommart Koohakan
Faculty of Agriculture, King Mongkut's Institue of Technology Ladkrabang

บทคัดย่อ

ศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อ *Pythium myriotylum* สาเหตุโรครากเน่าในผักสลัดโดย *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110 และ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่แยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินด้วยวิธี agar disk diffusion ส่วนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อโรค ได้แก่ ส่วนของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell culture) และเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ (purified cells) ในขณะที่ส่วนของเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ทำให้ตายแล้ว (purified sterile cells) และส่วนของสารกรองที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรีย (cells-free culture filtrate) ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อโรค จากการศึกษาความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* ที่สัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์ พบแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ECO 008 ทำให้เส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* มีการเจริญที่บิดเบี้ยวผิดรูปไปจากเดิม ในขณะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ทำให้เส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคมีการแตกแขนงอย่างผิดปกติ รวมไปถึงพบการเคลื่อนที่ของ cytoplasm ที่ผิดปกติไปจากเดิมด้วยส่งผลให้บริเวณส่วนปลายเส้นใยแตก

คำสำคัญ : แบคทีเรียเขตรากพืช การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน เชื้อ *Pythium myriotylum*

Abstract

Mechanism in suppression of *Pythium myriotylum* which causes of root rot disease in lettuces was studied by using rhizobacteria; *Pseudomonas* spp. stains ECO 008 and SSWC 110, and *Bacillus* spp. stains EWC 065, RCO 010, RWC 021 and SSMIX 023, isolated from hydroponics planting system. It was found that only cell culture and purified cells were an active part to suppress the mycelial growth of the pathogen, whereas purified sterile cells and cells-free culture filtrate were not active. The microscopic observation revealed that the physiological abnormalities of *P. myriotylum* mycelium presented, when it was dual cultured with *Pseudomonas* sp. stains ECO 008 or *Bacillus* sp. stains EWC 065, RCO 010, RWC 021 and SSMIX 023. These observations were hyphal distortion, vacuolation, and change of cytoplasm movement.

Keywords : rhizobacteria, hydroponics, *Pythium myriotylum*

***Corresponding author.** E-mail: n_hideyo@hotmail.com

บทนำ

โรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium myriotylum* สร้างปัญหาสำคัญในการปลูกพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Gull *et al*., 2004 ; Khalil, 2005) รวมไปถึงในประเทศไทย (Koohakan, 2007) โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถตรวจพบได้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทั้งในรากที่แสดงอาการ และไม่แสดงอาการโรครากเน่า (พรหมมาศ คูหากาญจน์, 2548 ; Koohakan, 2007) ดังนั้นหากสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค ความเสียหายอาจเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ในระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว (Stanghellini & Resmussen, 1994 ; van West *et al*., 2003 ; Khalil, 2005) ปัจจุบันได้มีการนำวิธีควบคุมโรคดังกล่าวมาใช้หลายวิธี โดยเฉพาะการใช้สารเคมีซึ่งเกษตรกรนิยมอย่างมาก เนื่องจากให้ผลในการควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีอย่างผิดวิธีหรือใช้มากเกินความจำเป็นนั้นนอกจากส่งผลต่อค่าใช้จ่ายของเกษตรกรแล้ว ยังส่งผลต่อสุขภาพของผู้ใช้ และผู้บริโภค เป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งกระตุ้นให้เชื้อโรคพืชเกิดการกลายพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมี และก่อให้เกิดโรคกับต้นพืชรุนแรงกว่าเดิมด้วย (Burr *et al*., 1988) ดังนั้นคณะวิจัยจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพจากเขตรากพืชที่ปลูกในระบบปลูกโดยไม่ใช้ดินมาใช้ในการควบคุมโรครากเน่า ผลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าจากแบคทีเรีย 741 สายพันธุ์ มีบางสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium aphanidermatum* และ *P. myriotylum* ได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชระยะต้นกล้า และสามารถควบคุมโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. myriotylum* ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินได้อยู่ในระดับหนึ่งโดยทำการทดสอบในระดับ lab scale hydroponic ระบบ solution culture และระบบ nutrient film technique (จักรพงษ์ หรั่งเจริญ และพรหมมาศ คูหากาญจน์, 2552 ; Koohakan & Rangjaroen, 2009) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาถึงกลไกที่เป็นไปได้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

เชื้อที่นำมาทดสอบ

Pythium myriotylum สาเหตุโรครากเน่า แยกได้จากรากของผักสลัดที่ปลูกในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน และทดสอบความรุนแรงในการเกิดโรคโดยประยุกต์กรรมวิธีจาก Brien *et al*., (1991) ; Harveson & Rush (2002) นำผลที่ได้ค่าหาค่าเฉลี่ยของดัชนีการเกิดโรคตาม Idris *et al*. (2008) โดยสายพันธุ์เชื้อ *P. myriotylum* ที่ใช้ในการทดสอบมีค่าดัชนีการเกิดโรคมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (จักรพงษ์ หรั่งเจริญ และพรหมมาศ คูหากาญจน์, 2552)

แบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช: *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110; *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ได้ทำการคัดเลือก และผ่านการทดสอบผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชในระยะต้นกล้า การควบคุมโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. myriotylum* ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในระดับ lab scale hydroponic ระบบ solution culture และระบบ nutrient film technique ซึ่งให้ผลดีในระดับหนึ่ง (จักรพงษ์ หรั่งเจริญ และพรหมมาศ คูหากาญจน์, 2552 ; Koohakan & Rangjaroen, 2009)

การศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์แบคทีเรีย และผลิตผลของเซลล์ ในการควบคุมเชื้อ *Pythium myriotylum*

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปเพิ่มจำนวนในขวดลูกชมพู่ที่มีอาหาร nutrient broth (NB; Criterion™ dehydrated culture media) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี agar diffusion method โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD: completely randomized design) ในแต่ละกลุ่มการทดลองทำ 5 ซ้ำ แบ่งออกเป็น 6 กรรมวิธีดังนี้คือ 1) อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (control) 2) purified cell หรือแบคทีเรียที่มีศักยภาพนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบนออก นำเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่มาล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3) purified sterile cell ได้แก่ ส่วนของ purified cell นำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที 4) สารเคมีกำจัดเชื้อรา *Pythium* spp. ได้แก่ metalaxyl ความเข้มข้น 500 ppm 5) cell–free culture filtrate ได้แก่ แบคทีเรียที่มีศักยภาพนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย แยกเก็บส่วนของเหลว (supernatant) มากรองเซลล์แบคทีเรียอีกครั้งด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน และ 6) cell culture ได้แก่ สารแขวนลอยแบคทีเรีย

การทดสอบทำโดยเทอาหาร nutrient agar (NA; Criterion™ dehydrated culture media) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้แห้งจากนั้นตัดชิ้นวุ้นออกจากจานเป็นวงกลมด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 6 จุด ที่มีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางเท่ากัน แต่ละจุดหยอดสารละลายจากกลุ่มการทดลองต่างๆ จาก 6 กรรมวิธี ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วนำชิ้นวุ้น (agar plug) ของเชื้อ *P. myriotylum* ขนาด 0.5 เซนติเมตรวางตรงจุดกึ่งกลางให้ห่างจากแต่ละจุดเท่าๆ กัน บันทึกค่ารัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* จากกลุ่มการทดลองต่างๆ โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 24, 48, 96 และ 192 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยตามกรรมวิธีของ Mostapha (2004) ดังสมการ

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

นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test (DMRT)

ทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งตามวิธีการข้างต้นแต่เปลี่ยนอาหารในการทดสอบดังนี้ อาหาร NB เป็นอาหาร potato dextrose broth (PDB) (Ronald, 1995) และ อาหาร NA เป็น potato dextrose agar (PDA) (Ronald, 1995) เนื่องจากให้สภาวะการเจริญเหมาะสมต่อเชื้อราสาเหตุโรคมากขึ้น

การศึกษาความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เทอาหาร PDA ลงบนแผ่น slide ให้มีความหนาประมาณ 0.2 มิลลิเมตร จากนั้น streak แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ให้ห่างจากขอบแผ่น slide ประมาณ 1.5 เซนติเมตร และวางชิ้นวุ้น (agar plug) ของเชื้อ *P. myriotylum* เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่อีกขอบด้านหนึ่งของแผ่น slide ห่างจากขอบประมาณ 1.5 เซนติเมตร ระหว่างเชื้อราและแบคทีเรียห่างกัน 4.5 เซนติเมตรบ่มเชื้อไว้ภายในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อเก็บไว้อุณหภูมิห้อง แต่ละสายพันธุ์ทำ 5 ซ้ำ บันทึกผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. myriotylum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิด compound microscope (Eclipse E200: Nikon, Japan) กำลังขยาย 400 เท่าหลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่เวลา 12 ชั่วโมง โดยการทดลองมีการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ที่เลี้ยงเชื้อ *P. myriotylum* อย่างเดียว

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์แบคทีเรีย และผลิตผลของเซลล์ ในการควบคุมเชื้อ *Pyhtium myriotylum*

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. myriotylum* ด้วยวิธี agar diffusion method โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB และ PDB โดยใช้ส่วนต่างๆ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแต่ละสายพันธุ์ คือ purified cell, purified sterile cell, cell–free culture filtrate และ cell culture โดยมีสารกำจัดเชื้อรา metalaxyl เป็นวิธีการเปรียบเทียบ แล้วนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ผลดังนี้

การทดสอบด้วยแบคทีเรียโดยการเลี้ยงในอาหาร NB และทดสอบบนอาหาร NA ในการยับยั้งเชื้อ *P. myriotylum* พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ในแต่ละช่วงเวลาสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* เมื่อใช้ส่วนของ purified cell และ cell culture เท่านั้น เมื่อบันทึกผลที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสารกำจัดเชื้อรา metalaxyl ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราได้สูงกว่าแบคทีเรียทดสอบเกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RCO 010 ที่ให้ค่ายับยั้งการเจริญสูงกว่าสารกำจัดเชื้อรา metalaxyl ทั้งในส่วนของ purified cell และ cell culture โดยให้ค่าเท่ากับ 69.9 และ 72.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากเวลา 48 ชั่วโมงสารกำจัดเชื้อรา metalaxyl ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *P. myriotylum* ลดลงจนไม่สามารถยับยั้งได้เมื่อเวลา 192 ชั่วโมง แต่ในแบคทีเรียทุกๆ สายพันธุ์พบส่วนของ purified cell และ cell culture สามารถยับยั้งการเจริญสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เพิ่มขึ้นเมื่อเวลา 192 ชั่วโมง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ purified cell ยังให้ค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 96.4 เปอร์เซ็นต์ดังตารางที่ 1

การทดสอบด้วยแบคทีเรียโดยการเลี้ยงในอาหาร PDB และ ทดสอบบนอาหาร PDA ในการยับยั้งเชื้อ *P. myriotylum* พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ในแต่ละช่วงเวลาสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* เมื่อใช้ส่วนของ purified cell และ cell culture เท่านั้น เมื่อบันทึกผลที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสารกำจัดเชื้อรา metalaxyl ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราได้สูงกว่าแบคทีเรียทดสอบเกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RCO 010 ที่ให้ค่ายับยั้งการเจริญสูงกว่าสารกำจัดเชื้อรา metalaxyl ทั้งในส่วนของ purified cell และ cell culture โดยให้ค่าเท่ากับ 83.2 และ 82.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากเวลา 48 ชั่วโมงสารกำจัดเชื้อรา metalaxyl ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *P. myriotylum* ลดลงจนไม่สามารถ

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเซลล์ และผลิตผลจากเซลล์แบคทีเรีย ที่เลี้ยงในอาหาร NB ในการยับยั้งเชื้อ *Pythium myriotylum* บนอาหาร NA

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เวลาที่บันทึกผล (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ Pythium myriotylum จากส่วนต่างๆ ของแบคทีเรีย									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
Bacillus sp. EWC 065	24	46.4	B[1/]	0.0	C	62.4	A	0.0	C	48.8	B
	48	64.0	A	0.0	B	64.9	A	0.0	B	65.8	A
	96	71.1	A	0.0	C	32.4	B	0.0	C	71.6	A
	192	73.8	A	0.0	C	0.0	C	0.0	C	65.8	B
Bacillus sp. RCO 010	24	69.6	A	0.0	C	61.6	B	0.0	C	72.0	A
	48	82.7	B	0.0	D	65.3	C	0.0	D	89.8	A
	96	96.4	A	0.0	D	33.3	C	0.0	D	94.2	B
	192	96.4	A	0.0	C	0.0	C	0.0	C	94.2	B
Bacillus sp. RWC 021	24	31.2	C	0.0	D	62.4	A	0.0	D	40.0	B
	48	61.3	B	0.0	C	65.8	A	0.0	C	66.7	A
	96	61.3	B	0.0	D	32.9	C	0.0	D	67.6	A
	192	61.3	B	0.0	C	0.0	C	0.0	C	67.6	A
Bacillus sp. SSMIX 023	24	44.8	C	0.0	D	61.6	A	0.0	D	54.4	B
	48	68.9	B	0.0	C	66.2	B	0.0	C	78.2	A
	96	68.9	B	0.0	D	32.9	C	0.0	D	78.2	A
	192	68.9	B	0.0	C	0.0	C	0.0	C	78.2	A
Pseudomonas sp. ECO 008	24	29.6	B	0.0	C	61.6	A	0.0	C	36.8	B
	48	57.3	B	0.0	C	65.3	A	0.0	C	64.4	A
	96	57.3	B	0.0	D	32.0	C	0.0	D	64.4	A
	192	57.3	B	0.0	C	0.0	C	0.0	C	64.4	A
Pseudomonas sp. SSWC 110	24	32.8	B	0.0	C	62.4	A	0.0	C	38.4	B
	48	58.2	B	0.0	C	65.8	A	0.0	C	65.3	A
	96	58.2	B	0.0	D	32.0	C	0.0	D	65.3	A
	192	58.2	A	0.0	C	0.0	C	0.0	C	65.3	A

หมายเหตุ: [1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ตาม Duncan's Multiple Range Test ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

ยับยั้งได้เมื่อเวลา 192 ชั่วโมง แต่ในแบคทีเรียทุกๆ สายพันธุ์พบส่วนของ purified cell และ cell culture สามารถยับยั้งการเจริญสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เพิ่มขึ้นเมื่อเวลา 192 ชั่วโมง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RCO 010 ในส่วนของ cell culture ยังให้ค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 96.4 เปอร์เซ็นต์ดังตารางที่ 2

การเลี้ยงแบคทีเรียทุกๆสายพันธุ์ในอาหาร NA และ PDA ที่เวลา 192 ชั่วโมงส่วนของ purified cell และ cell culture สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* สาเหตุโรครากเน่าได้ดังภาพที่ 1b. และ 1 c.

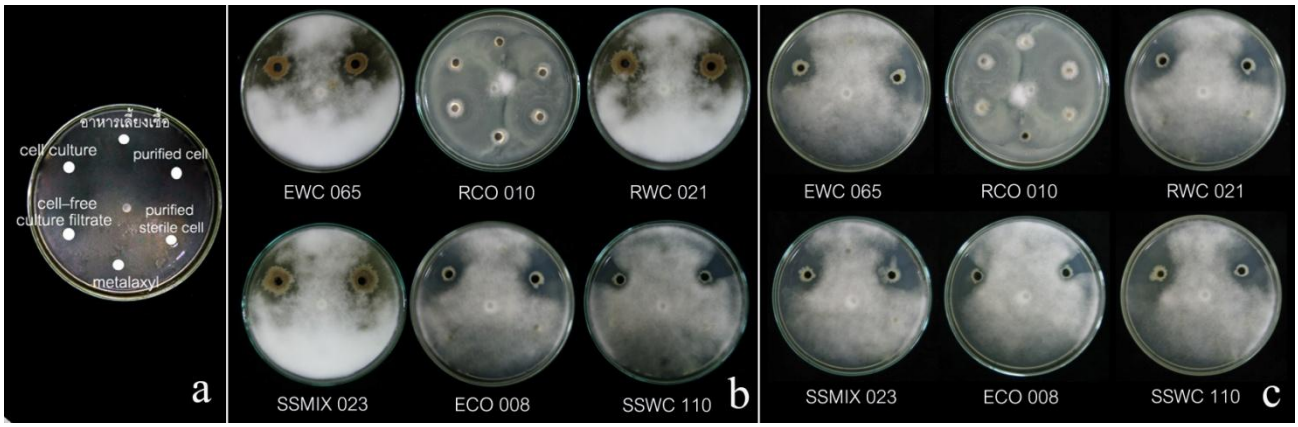
จากการทดลองแบคทีเรียทุกสายพันธุ์พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* เมื่อใช้ส่วนของ purified cell และ cell culture เท่านั้น แต่ในส่วนของ purified sterile cell และ cell–free culture filtrate ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อได้ ทั้งนี้ส่วน purified sterile cell เป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจึงไม่สามารถเจริญ หรือ

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของเซลล์ และผลิตผลของเซลล์แบคทีเรีย ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ในการควบคุมเชื้อ *Pythium myriotylum* บนอาหาร PDA

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เวลาที่บันทึกผล (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ Pythium myriotylum จากส่วนต่างๆ ของแบคทีเรีย									
		purified cell		purified sterile cell		metalaxyl		cell–free culture filtrate		cell culture	
Bacillus sp. EWC 065	24	51.2	B[1/]	0.0	C	60.8	A	0.0	C	53.6	B
	48	72.9	A	0.0	C	64.4	B	0.0	C	72.4	A
	96	69.3	A	0.0	C	29.3	B	0.0	C	67.6	A
	192	74.7	A	0.0	C	0.0	C	0.0	C	74.7	A
Bacillus sp. RCO 010	24	83.2	A	0.0	C	60.8	B	0.0	C	82.4	A
	48	91.6	A	0.0	C	63.6	B	0.0	C	91.1	A
	96	91.6	A	0.0	C	30.7	B	0.0	C	93.8	A
	192	91.6	B	0.0	C	0.0	C	0.0	C	96.4	A
Bacillus sp. RWC 021	24	56.0	B	0.0	C	61.6	A	0.0	C	52.8	B
	48	75.6	A	0.0	C	65.3	B	0.0	C	74.7	A
	96	72.0	A	0.0	C	29.8	B	0.0	C	72.4	A
	192	75.1	A	0.0	C	0.0	C	0.0	C	74.7	A
Bacillus sp. SSMIX 023	24	52.8	B	0.0	C	59.2	A	0.0	C	50.4	B
	48	73.8	A	0.0	C	62.2	B	0.0	C	74.2	A
	96	73.8	A	0.0	C	29.3	B	0.0	C	74.7	A
	192	74.2	A	0.0	C	0.0	C	0.0	C	75.1	A
Pseudomonas sp. ECO 008	24	40.8	B	0.0	C	60.8	A	0.0	C	41.6	B
	48	65.8	A	0.0	C	62.2	B	0.0	C	66.7	A
	96	65.8	A	0.0	C	29.8	B	0.0	C	66.7	A
	192	65.8	B	0.0	C	0.0	C	0.0	C	68.0	A
Pseudomonas sp. SSWC 110	24	41.6	B	0.0	C	60.0	A	0.0	C	42.4	B
	48	66.2	AB	0.0	C	63.1	B	0.0	C	66.7	A
	96	66.2	A	0.0	C	28.9	B	0.0	C	67.6	A
	192	66.7	A	0.0	C	0.0	C	0.0	C	67.6	A

หมายเหตุ: [1/] ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ตาม Duncan's Multiple Range Test ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันที่ P = 0.05

เกิดกระบวนการต่างๆ ภายในแบคทีเรียได้ ส่วนของ cell–free culture filtrate ซึ่งมีเพียงสารที่ได้จากกระบวนการเมตาโบไลท์ที่แบคทีเรียปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อได้เช่นกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่สารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไม่ถูกผลิตออกมาหากไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งเหตุผลนี้ได้รับการสนับสนุนจาก Cha *et al*. (1998) รายงานว่าสาร xanthobaccin ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lysobacter* sp. SB-K88 ผลิต xanthobaccin ได้เมื่อเชื้อสายพันธุ์ SB-K88 ได้รับการกระตุ้นโดย เชื้อสาเหตุโรค damping-off และแบคทีเรียมีการสร้าง biofilms ที่ผิวของรากพืช แต่จากรายงานของ Folman *et al*. (2004) พบว่าเชื้อ *Lysobacter enzymogenes* สายพันธุ์ 3.1T8 สามารถยับยั้ง *Pythium* sp. ได้โดยการผลิตสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการงอกของ zoospore ของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว อีกทั้งการรายงานของ Pagliaccia *et al*. (2007) พบว่าการใช้ fluorescent pseudomonad สามารถลดความรุนแรงของโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium*



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของเซลล์แบคทีเรีย และผลิตผลของเซลล์แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในการควบคุมเชื้อ *Pythium myriotylum* ที่เวลา 192 ชั่วโมง โดยที่ a. = แผนภาพการทดสอบ, b. = ส่วนของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร nutrient broth และทดสอบบนอาหาร nutrient agar และ c. = ส่วนของแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose broth และทดสอบบนอาหาร potato dextrose agar; แบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* spp. ได้แก่สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023; แบคทีเรียทดสอบ *Pseudomonas* spp. ได้แก่สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110

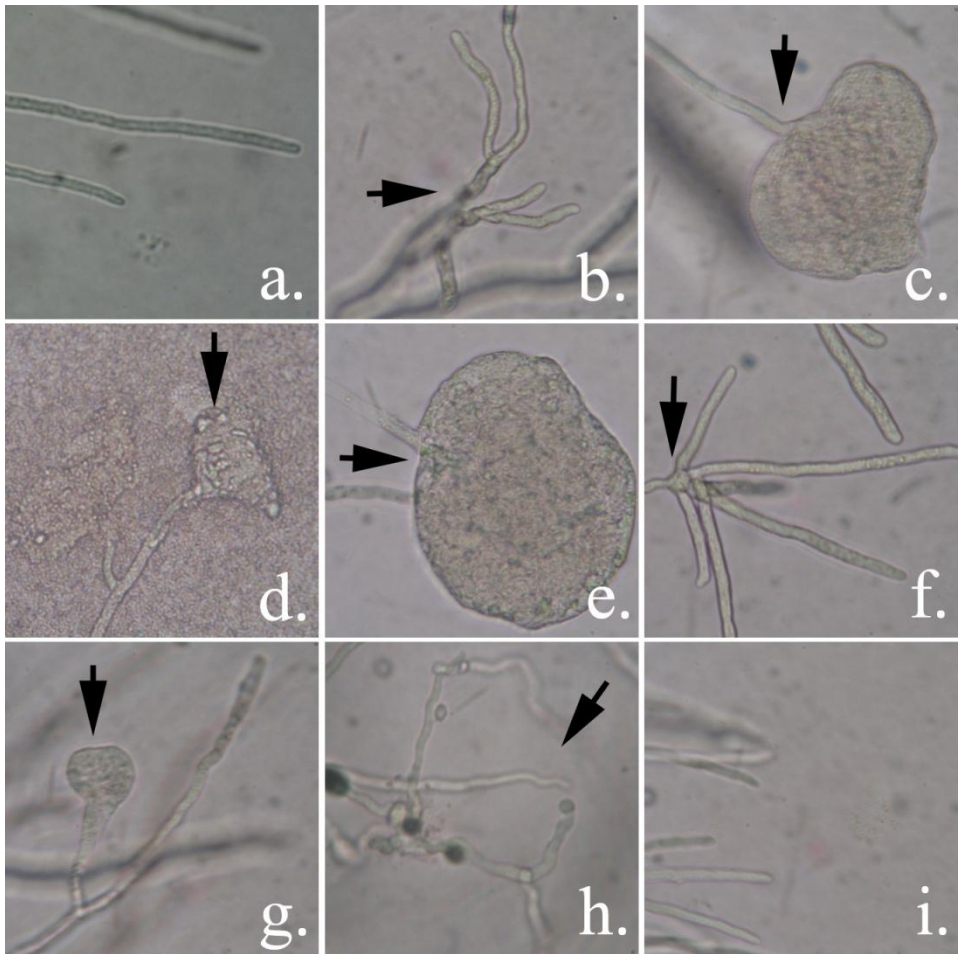
ได้ อาจเนื่องมาจากสารพวก siderophores ในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว

จากการทดลองพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RCO 010 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่า *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Baker & Cook (1983) ถึงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่พบในบริเวณ rhizosphere นั้นมีแนวโน้มในยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคที่เกิดโรคในระบบรากพืชได้ดีกว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Pseudomonad

การศึกษาความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษากลไกการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *P. myriotylum* ด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* ในระหว่างที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด compound microscope โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า (ภาพที่ 2) สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อได้ดังนี้ การเจริญของเส้นใยเชื้อบนแผ่นกระจกสไลด์ที่เลี้ยงเชื้อ *P. myriotylum* เพียงอย่างเดียว พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมงการเจริญของเส้นใยมีส่วนเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณที่ขีดเชื้อแบคทีเรียไว้เป็นทางยาว ซึ่งเส้นใยเชื้อเจริญค่อนข้างตรง เมื่อเส้นใยมีการแตกแขนงแยกออกเป็น 2 ทางและค่อยๆ เจริญ ในส่วนของ cytoplasm ภายในเส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการเคลื่อนที่ไหลไปทางส่วนปลายอย่างช้าๆ จนบางช่วงเวลาไม่สามารถสังเกตการไหลของ cytoplasm ภายในเส้นใยเชื้อได้ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลอีกครั้งพบว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* ให้ลักษณะที่ไม่แตกต่างกับผลที่ได้บันทึกไว้เมื่อเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง (ภาพที่ 2a.)

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ EWC 065 และ RWC 021 ต่อเชื้อ *P. myriotylum* พบว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกันคือ เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง เส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเกิดขึ้นคือ cytoplasm ภายในเส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการเคลื่อนที่ผิดปกติได้แก่มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และหยุด สลับกันไปมา โดยทิศทางการเคลื่อนที่ไปรวมกันในส่วนปลายของเส้นใย และไหลย้อนกลับอย่างรวดเร็ว ซ้ำไปซ้ำมากว่า 4 ครั้ง จากนั้นเกิดการแตกของเส้นใยบริเวณต่างๆ โดยเฉพาะส่วนปลายของเส้นใยที่น่าเป็นบริเวณที่มีความอ่อนแอที่สุดของเส้นใย เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลอีกครั้งพบว่าเส้นใยที่ไม่มีการแตกบริเวณปลายของเส้นใยเกิดการหงิก งอ ผิดปกติไป และไม่มีการเจริญต่อของเส้นใยเชื้อรา จึงส่งผลให้เกิดบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *P. myriotylum* เมื่อเทียบเทียบกับแผ่นกระจกสไลด์ที่เลี้ยงเชื้อ *P. myriotylum* (ภาพที่ 2b., 2c. และ 2e.)



ภาพที่ 2 ความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *Pythium myriotylum* (รูปศรชี้) ที่ถูกทดสอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์; a = เส้นใยปกติของเชื้อรา *Pythium myriotylum* แบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* spp. ได้แก่ b. และ c. = สายพันธุ์ EWC 065, d. = สายพันธุ์ RCO 010, e. = สายพันธุ์ RWC 021, และ f. และ g. = สายพันธุ์ SSMIX 023; *Pseudomonas* spp. ได้แก่ h. = สายพันธุ์ ECO 008 และ i. = สายพันธุ์ SSWC 110

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RCO 010 ต่อเชื้อ *P. myriotylum* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมงเส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบเนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และยังสังเกตเห็นอีกว่าเชื้อ *P. myriotylum* สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแบคทีเรีย แต่มีการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเกิดขึ้นคือ เกิดการแตกในส่วนปลายของเส้นใย แต่ก่อนการแตกของเส้นใยไม่สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนเนื่องมาจากบริเวณที่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา มีแบคทีเรียเจริญอยู่เป็นจำนวนมาก และการทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RCO 010 นี้ไม่พบบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อ *P. myriotylum* (ภาพที่ 2d.)

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SSMIX 023 ต่อเชื้อ *P. myriotylum* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง เส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการแตกแขนงมากกว่า 2 แขนงอยู่เป็นจำนวนมาก และมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ภายในของเส้นใยเกิดขึ้นคือ cytoplasm ภายในเส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการเคลื่อนที่ผิดปกติได้แก่มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และบริเวณส่วนปลาย หรือถัดจากส่วนปลายของเส้นใยเข้ามามีลักษณะบวมขึ้นมากกว่า ซึ่งอาจเกิดจากของเหลวภายในเซลล์ไหลไปรวมกัน จากนั้นส่วนปลายของเส้นใยเกิดการแตกในบริเวณที่บวม เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลง อีกครั้งพบว่าเส้นใยมีการเจริญไปในแนวตั้งฉากกับการเจริญปกติ และไม่มีการเจริญต่อของเส้นใย

เชื้อรา จึงส่งผลให้เกิดบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *P. myriotylum* ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 2f. และ 2g.)

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ECO 008 ในการควบคุมเชื้อ *P. myriotylum* เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง พบว่าเส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเกิดขึ้นคือ บริเวณส่วนปลายของเส้นใยเริ่มมีการแตกแขนงตรงส่วนปลายของเส้นใยมากขึ้น และในบางครั้งเริ่มมีการเจริญงอในทางด้านข้างและ/หรือ สวนทางกับการเคลื่อนที่เดิมของเส้นใยปกติ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลงอีกครั้งพบว่าส่วนของเส้นใยทั้งส่วนปลายเส้นใย และถัดจากส่วนปลายของเส้นใยเชื้อเข้ามามีลักษณะหงิก งอ ผิดปกติไปเมื่อเทียบกับแผ่นกระจกสไลด์ที่เลี้ยงเชื้อ *P. myriotylum* เพียงอย่างเดียว อีกทั้งยังพบบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *P. myriotylum* อย่างไรก็ตามที่เวลา 36 ชั่วโมงไม่พบบริเวณโซนใส และส่วนปลายของเส้นใยสามารถเจริญเข้าไปชิดกับบริเวณที่แบคทีเรียเจริญอยู่ได้ (ภาพที่ 2h.)

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ SSWC 110 ต่อเชื้อ *P. myriotylum* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมงไม่พบความผิดปกติของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* เกิดขึ้น แต่บริเวณส่วนปลายของเส้นใยมีการเจริญที่ค่อนข้างอยู่ในระนาบเดียวกัน เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลงอีกครั้งก็ยังไม่พบความผิดปกติของเส้นใยเกิดขึ้นแต่ประการใด แต่เส้นใยเชื้อไม่มีการเจริญเติบโตต่อไปอีก ส่งผลให้เกิดบริเวณโซนใสระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับเชื้อ *P. myriotylum* แต่เมื่อวางแผ่นสไลด์ไว้เป็นเวลาประมาณ 36 ชั่วโมงไม่พบบริเวณโซนใส และส่วนปลายของเส้นใยสามารถเจริญเข้าไปชิดกับบริเวณที่แบคทีเรียเจริญอยู่ได้ (ภาพที่ 2i.)

จากการการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อ *P. myriotylum* เมื่อถูกทดสอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ Nelson *et al*. (1986) พบว่าเซลล์ของแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สามารถส่งผลให้เส้นใยเชื้อ *P. ultimum* เกิดการสลายตัว (lysis) และการแตกสลาย (degradation) ซึ่งเหตุการณ์เช่นนี้ยังพบในเชื้อ *P. debaryanum* โดยผลจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* อีกด้วย (Mitchell & Hurwitz, 1965 อ้างโดย Jayamani, 2006) ซึ่งการสลายตัวของเซลล์ของเชื้อราอาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารจำพวก cell wall-degrading enzymes โดยแบคทีเรียต้องมีความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับเชื้อราสาเหตุโรคและถูกกระตุ้นให้ผลิตสารดังกล่าวมากในบริเวณเขตรากพืช เช่น การที่ *Micromonospora carbonacea* ได้รับการกระตุ้นจาก *Phytophthora cinnamomi* ให้มีการผลิต cellulase ทำให้เกิดการยับยั้งโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. cinnamomi* (El-Tarabily *et al*., 1996 อ้างโดย Jayamani, 2006) และการรายงานผลของ Budi *et al*. (1999) และ Budi *et al*. (2000) พบว่า *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ B2 ซึ่งแยกจาก mycorrhizosphere ของต้นข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โปรตีเอส ไคติเนส และเพคติเนสที่สามารถยับยั้งราโรคพืช *P. parasitica* และ *Fusarium oxysporum* ได้บนอาหารแข็ง โดยยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา การเกิด sporangium การงอกของ zoospore และการยืดตัวของ germ tube องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ เกิด vesicle สะสมที่บริเวณระหว่างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ของเชื้อราบิดเบี้ยวเสียรูปอย่างรุนแรง ผนังเซลล์ของราโรคพืชนี้ถูกทำลายโดยกิจกรรมของเอนไซม์-เซลลูเลสและไคติเนส ทำให้เกิดรูรั่วบนผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังรายงานถึง *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ B2 ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *F. culmorum, Aphanomyces euteiches, Chalara elegans, Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* ได้อีกด้วย

สรุปผลการวิจัย

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

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เอกสารอ้างอิง

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. (2552). การยับยั้งโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. โดยแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืช ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินขนาดเล็ก. ใน *การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8 ณ โรงแรม ดิเอ็มเพรส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 5 - 8 พฤษภาคม 2552*.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. (2548). ศักยภาพของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Pythium myriotylum* ในระบบ NFT. ใน *การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 2 - 4 พฤศจิกายน 2548*.

Brien, R.G.O., Hare, P.J.O. & Glass, R.J. (1991). Cultural practices in the control of bean root. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *30*, 551-555.

Budi, S.W., Van Tuinen, D., Martinotti, G. & Gianinazzi, S. (1999). Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium conpatible with arbuscular mycorrhiza develoment and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Applied and Environmental of Microbiology*, *65*, 5148-5150.

Budi, S.W., Arnould, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. (2000). Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus sp*. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology, 15*, 191-199.

Burr, T.J., Norelli, J.L. Katz, B. Wilcox, W.F. & Hoysing, S.A. (1988). Streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple orchard and its association with conjugative plasmid. *Phytopathology, 78*, 410-413.

Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaaw, P.D. & Farrand, S.K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular of Plant Microbe Interaction, 11*, 1119-1129.

Folman, L.B., De Klein, M.J.E.M., Postma, J. & van Veen, J.A. (2004). Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber. *Biological Control*, *31*, 145-154.

Gull, C., Labuschagne, N. & Botha, W.J. (2004). *Pythium* species associated with wilt and root rot of hydroponically grown crops in South Africa. *African Plant Protection*, *10*, 109-116

Harveson, R.M. & Rush, C.M. (2002). The influence of irrigation frequency and cultivar blends on the severity of multiple root diseases in sugar beets. *Plant Disease*, *86*, 901-908.

Idris, H.A., Labuschagne, N. & Korsten, L. (2008). Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa. *Biological Control*, *45*, 72-84.

Jayamani, A. (2006). *Studies on the antagonistic effect of rhizobacteria against soilborne Phytophthora species on strawberry*, Ph.D. Thesis, Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät, der Universität Hannover, Germamy.

Khalil, S. (2005). Microflora in the root environment of hydroponically grown tomato: Methods for assessment and effects of introduced bacteria and *Pythium ultimum*. [online] Available:http://proquest.umi.com/pq dweb?did=920862651&sid=1&Fmt=2&clientId=61842&RQT=309&VName=PQD

Koohakan, P. (2007). Occurrence and distribution of *Pythium* spp. in NFT facilities. In. *Proceedings of the International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development. April, 26-27 2007*. pp. 418-422. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Koohakan, P. & Rangjaroen, C. (2009). Evaluations of indigenous bacteria for biological control agent of root rot disease in leafy vegetables grown in hydroponics. *In Proceedings of the Agricultural Biotechnology International Conference: Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environment. Sep. 22-25, 2009.* p. 190. Queen sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Mostapha, N.K. (2004). Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistics bacteria in greenhouse and field conditions. *Plant Pathology Journal, 3*, 88-96.

Nelson, E.B., Chao, W.L., Norton, J.M., Nash, G.T. & Harman, G.E. (1986). Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimun*: possible role in biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off. *Phytopathology, 76*, 327-335.

Pagliaccia, D., Ferrin, D. & Stanghellini, M.E. (2007). Chemo-biological suppression of root-infecting zoosporic pathogens in recirculating hydroponic systems. *Plant Soil,* 299, 163-179.

Ronald, M.A. 1995. Handbook of media for environmental microbiology. Boca Raton : CRC Press.

Stanghellini, M.E & Rasmussen, S.L. (1994) Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease, 78*, 1129-38.

van West, P., Appiah, A.A. & Gow, N.A.R. (2003). Advances in research on oomycete root pathogens. *Plant Pathology, 62*, 99-113.