# การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทำปุ๋ยหมัก

## Selection of Bacteria for the Production of Compost Inoculum

**อรวรรณ ชวนตระกูล**[1] มณี ตันติรุ่งกิจ[1] และวุฒิชัย ทองดอนแอ[1]

Orawan Chountragoon[1], Manee Tantirungkij[1] and Wutichai Tongdonae[1]

## บทคัดย่อ

ปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นปุ๋ยธรรมชาติที่ได้จากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ จากการศึกษาจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมักซึ่งทำการกองปุ๋ยด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน พบว่ากองปุ๋ยหมักที่กองกับพื้นและมีผ้าพลาสติกคลุมมีจำนวนประชากรสูงสุด คือ 1.2 x $10^{10}$ CFU/g และแยกเชื้อแบคทีเรียซึ่งเจริญบน PCA plate ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ทั้งสิ้น 209 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการสังเกตวงใสบนอาหารแข็ง CMC โดยใช้ congo red ในการตรวจสอบ พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 46 ไอโซเลทที่ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย CMC มากกว่า 3 เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี จำนวน 5 ไอโซเลท คือ PC15(3) PC22 (3) PC30(3) PC34(3) และ PC56(3) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทำปุ๋ยหมัก

**คำสำคัญ** : จุลินทรีย์ ปุ๋ยธรรมชาติ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

## ABSTRACT

Microorganisms play an important role in the process of compost making from agricultural wastes. The bacterial population in the composts prepared by different methods was examined. The highest bacterial population (1.2 x $10^{10}$ CFU/g) was found in the compost made by placing the agricultural waste on the floor and covering with plastic sheet. The bacteria having different colony characteristics were isolated and subjected to the primary screening of cellulase producer by the observation of clear zone on CMC agar using congo red method. Forty six of 209 isolates showed the degradation of CMC giving the index >3 and were tested for their cellulase activity (CMCase). According to the enzyme activity, 5 isolates [PC15(3) PC22(3) PC30(3) PC34(3) and PC56(3)], producing high CMCase acitivity were selected for the production of the inoculum for compost making.

**Key Words** : Microorganism, Compost, Agricultural Wastes

**E-mail** : rdiowc@ku.ac.th

[1] ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน

Central Laboratory and Greenhouse Complex, Research and Development Institute at Kamphaengsaen

## คำนำ

เนื่องจากในเขตจังหวัดนครปฐมและจังหวัดใกล้เคียงเป็นพื้นที่หลักในการปลูกพืชผักเพื่อการส่งออก ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น เปลือกข้าวโพดจากโรงงานแปรรูป หน่อไม้ฝรั่งทั้งที่เป็นต้นเก่าของหน่อไม้ฝรั่งที่ถอนออกทุกๆ 2 เดือน เพื่อเลี้ยงหน่อใหม่ให้เกิดเป็นต้นแม่ในรุ่นต่อไป และเศษหน่อไม้ฝรั่งจากการตกแต่งเพื่อส่งออกที่โรงงานเหลือทิ้งจำนวนมาก ดังนั้นการนำเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาทำปุ๋ยหมักเพื่อนำไปปรับปรุงดินและเสริมธาตุอาหารให้กับพืชในระบบเกษตรอินทรีย์แล้ว และยังเป็นการช่วยลดขยะให้กับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย อย่างไรก็ตามในการทำปุ๋ยหมักสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้กลายเป็นปุ๋ยหมัก ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่นำมาใช้ นอกจากนี้ยังพบว่าบางสายพันธุ์สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดี ดังนั้นการศึกษาถึงชนิดและบทบาทของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมักที่ทำจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิด และนำจุลินทรีย์เหล่านั้นมาผลิตเป็นหัวเชื้อปุ๋ยหมักจะเป็นหนทางหนึ่งที่ช่วยลดระยะเวลาในการผลิตปุ๋ยหมักและช่วยเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อีกด้วย

ปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นปุ๋ยธรรมชาติที่ได้จากการที่จุลินทรีย์ย่อยสลายเศษซากพืชผัก มูลสัตว์ ซึ่งสามารถนำเอาปุ๋ยหมักที่ได้ไปปรับปรุงดินทำให้ดินมีอินทรีย์วัตถุมากขึ้น และช่วยกระตุ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินช่วยให้ธาตุอาหารพืชบางอย่างในดินที่ละลายน้ำได้ยาก เช่นฟอสฟอรัส ให้ละลายน้ำได้ง่ายขึ้น (ชวลิต, 2540) จากการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการทำปุ๋ยหมักพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็น จุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์พืชได้ดี เช่น *Bacillus* spp. *Streptomyces* spp. *Trichoderma* spp. เป็นต้น (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550) แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเศษซากพืชให้เป็นอินทรียวัตถุเหล่านี้พบว่าบางสายพันธุ์สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดี เช่น *B. subtilis* N4 ซึ่งยับยั้งการเจริญของ *Rhizoctonia solani* เชื้อสาเหตุโรคbrown patch ของหญ้าในสนามกอล์ฟ สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการทำปุ๋ยหมักจากเศษหญ้าและสามารถควบคุมโรคของหญ้าในสนามกอล์ฟได้ดี (Nakasaki และคณะ, 1998) *Streptomyces* spp. จำนวน 16 สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสได้ดี สามารถยับยั้งการเจริญของ *Didymella bryoniae* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคต้นแตกยางไหล (Gummy Stem Blight ) (ภัทรกร และคณะ, 2004) *Trichoderma harzianum* T22 และ *T. hamatum* T382 สามารถลดความรุนแรงของโรครากเน่าของสตรอเบอรี่ (strawberry root rot) ที่เกิดจาก *Phytopthora cactorum, Pythium irregulare, Rhizoctonia fragariae* และ *Fusarium* spp. (Leandro และคณะ, 2004) เป็นต้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากกองปุ๋ยหมัก

เก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักจากการกองปุ๋ยหมัก ซึ่งใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัสดุตั้งต้น และมีวิธีการกองปุ๋ย 4 แบบคือ แบบที่ 1 กองกับพื้นและมีผ้าพลาสติกคลุม (T1) แบบที่ 2 บรรจุในถุงปุ๋ยเปิดปากถุง (T2) แบบที่ 3 บรรจุในเข่งพลาสติก (T3) และแบบที่ 4 บรรจุในเข่งไม้ไผ่ (T4) โดยกองปุ๋ยแบบละ 4 กอง (1 กอง ถือเป็น 1 ซ้ำ) เก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักบริเวณกลางกองปุ๋ย ที่ระดับความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยวิธี serial dilution และเพาะเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร Plate Count Agar บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อแยกแบคทีเรียทนร้อน (thermo-tolerant bacteria) จากนั้นตรวจนับจำนวนและแยกเชื้อแบคทีเรียให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่าง ลักษณะของเซลล์และการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

**การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง**

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC ($NH_4H_2PO_4$ 2 กรัม $KH_2PO_4$ 0.6 กรัม $K_2HPO_4$ 0.4 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม yeast extract 1.0 กรัม CMC (carboxy methyl cellulose) 5.0 กรัม วุ้น 15.0 กรัม น้ำ 1 ลิตร) โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อแล้วแตะลงบนอาหาร(point inoculate) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 plate ต่อเชื้อ 5 ไอโซเลท บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นตรวจสอบการย่อยสลาย CMC โดยราดสารละลาย congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวหน้าอาหารที่มีโคโลนีของเชื้อเจริญอยู่ ทิ้งไว้นาน 30 นาที เท congo red ทิ้งแล้วล้างออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้นตรวจสอบผลโดยวัดขนาดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี และคำนวณค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC

$$\text{ประสิทธิภาพในการย่อย CMC} = \frac{\text{ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)}}{\text{ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$

**การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว**

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC ในอาหารเหลว NB (Nutrient Broth) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ โดยนำเข้าเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ($OD_{660}$) ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC broth ให้มีค่า $OD_{660}$ เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 นำเข้าเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 24, 30, 24, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm. 10 นาที แยกเอาส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ไว้หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

**การวิเคราะห์ cellulase activity ต่อ carboxymethyl cellulose (CMCase activity)**

ทำโดยเติม crude enzyme ที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ ที่มีสารละลาย CMC ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลาย ใน 50 mM phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยานาน 5 นาที แล้วนำไปตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นโดยวิธีของ Somogyi (1952)

<u>หมายเหตุ</u> สำหรับ control reaction ใช้ส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่แช่ในน้ำเดือดนาน 10 นาที ในการทำปฏิกิริยาการทดสอบเอนไซม์

1 Unit (U) ของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย cellulose เป็น glucose 1 $\mu$ mole/min ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 6.0

## ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักจำนวน 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ได้ตัวอย่างปุ๋ยหมักทั้งหมด 48 ตัวอย่าง เนื่องจากอุณหภูมิในกองปุ๋ยหมักค่อนข้างสูง จึงเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในกองปุ๋ยหมักบนอาหาร Plate Count Agar ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อแยกแบคทีเรียทนร้อน (thermo-tolerant bacteria) และตรวจนับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ พบว่าตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เก็บมาในวันแรกของการกองปุ๋ยมีจำนวนประชากรจุลินทรีย์อยู่ในช่วง $10^8$-$10^9$ CFU/g ในสัปดาห์ที่ 2 มีจำนวนประชากรจุลินทรีย์อยู่ในช่วง $10^6$-$10^{10}$ CFU/g และในสัปดาห์ที่ 3 มีจำนวนประชากรจุลินทรีย์อยู่ในช่วง $10^7$-$10^9$ CFU/g และจากการสังเกตจะพบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 2 กองปุ๋ยหมักทุกกองจะมีเชื้อราขึ้นปกคลุม และอุณหภูมิภายในกองสูงมาก และค่อยๆ ลดลงเมื่อเก็บตัวอย่างในช่วงสัปดาห์ที่ 3 อุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักจะเป็นปกติ และพบว่ากองปุ๋ยหมัก T1 ซึ่งเป็นปุ๋ยหมักที่กองกับพื้นและมีผ้าพลาสติกคลุมมีจำนวนประชากรจุลินทรีย์มากที่สุดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการคลุมกองปุ๋ยด้วยผ้าพลาสติกทำให้กองปุ๋ยมีอุณหภูมิและความชื้นในกองเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 (ตารางที่ 1) จากนั้นแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 209 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสจะเกิดบริเวณวงใส พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ย่อยสลาย CMC บนอาหารแข็งได้ จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC มากกว่า 3 จำนวนทั้งสิ้น 46 ไอโซเลทไว้ทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว เมื่อนำ crude enzyme มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase) ซึ่งใช้ CMC เป็น substrate พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ตั้งแต่ 6-48 ชั่วโมง โดยมีเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีมากกว่า 30 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ PC15(3) PC19(3) PC22(3) PC23(3) PC24(3) PC30(3) PC31(3) PC34(3) PC55(3) และPC56(3) โดยเชื้อ PC15(3) และ PC34(3) มีกิจกรรมการย่อยสลายได้ดีที่สุดตั้งแต่ 6-30 ชั่วโมง PC19(3) และPC55(3) มีกิจกรรมการย่อยสลายได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง PC22(3) PC30(3) และ PC56(3) มีกิจกรรมในการย่อยสลายได้ดีที่สุดที่ 6-24 ชั่วโมง PC23(3) มีกิจกรรมในการย่อยสลายได้ดีที่สุดที่ 30 ชั่วโมง PC24(3) และ PC31(3) มีกิจกรรมในการย่อยสลายได้ดีที่สุดที่ 30 ชั่วโมง จากนั้นการย่อยสลายก็จะลดลง (ภาพที่ 1) จากผลการทดลองข้างต้นจึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในช่วง 6-24 ชั่วโมง จำนวน 5 ไอโซเลท คือ PC15(3) PC22(3) PC30(3) PC34(3) และ PC56(3) ไว้เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อปุ๋ยหมักที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้เร็วและมีกิจกรรมสูง ซึ่งแบคทีเรีย PC15(3) PC22 (3) PC30(3) PC34(3) เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากกองปุ๋ยหมักที่กองกับพื้นและมีผ้าพลาสติกคลุม (T1) ส่วน PC56(3) เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากกองปุ๋ยหมักซึ่งบรรจุในเข่งพลาสติก (T3) และพบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท มีลักษณะรูปร่างท่อนยาว ติดสีแกรมบวก และสร้างสปอร์

**Table 1** Bacterial population in the compost piles

| Compost | Total Pate Count[a] (x $10^9$ CFU/g) | | |
|---|---|---|---|
| | Week 1 | Week 2 | Week 3 |
| T1 | 0.72 ± 0.02 | 12.2 ± 3.5 | 0.02 ± 0.01 |
| T2 | 0.91 ± 0.06 | 1.80 ± 0.06 | 1.50 ± 0.64 |
| T3 | 2.60 ± 0.82 | 0.25 ± 0.06 | 0.43 ± 0.05 |
| T4 | 1.10 ± 0.35 | 0.30 ± 0.22 | 1.20 ± 0.03 |

**Note:** [a] Average value of bacterial population was calculated from 4 replications.

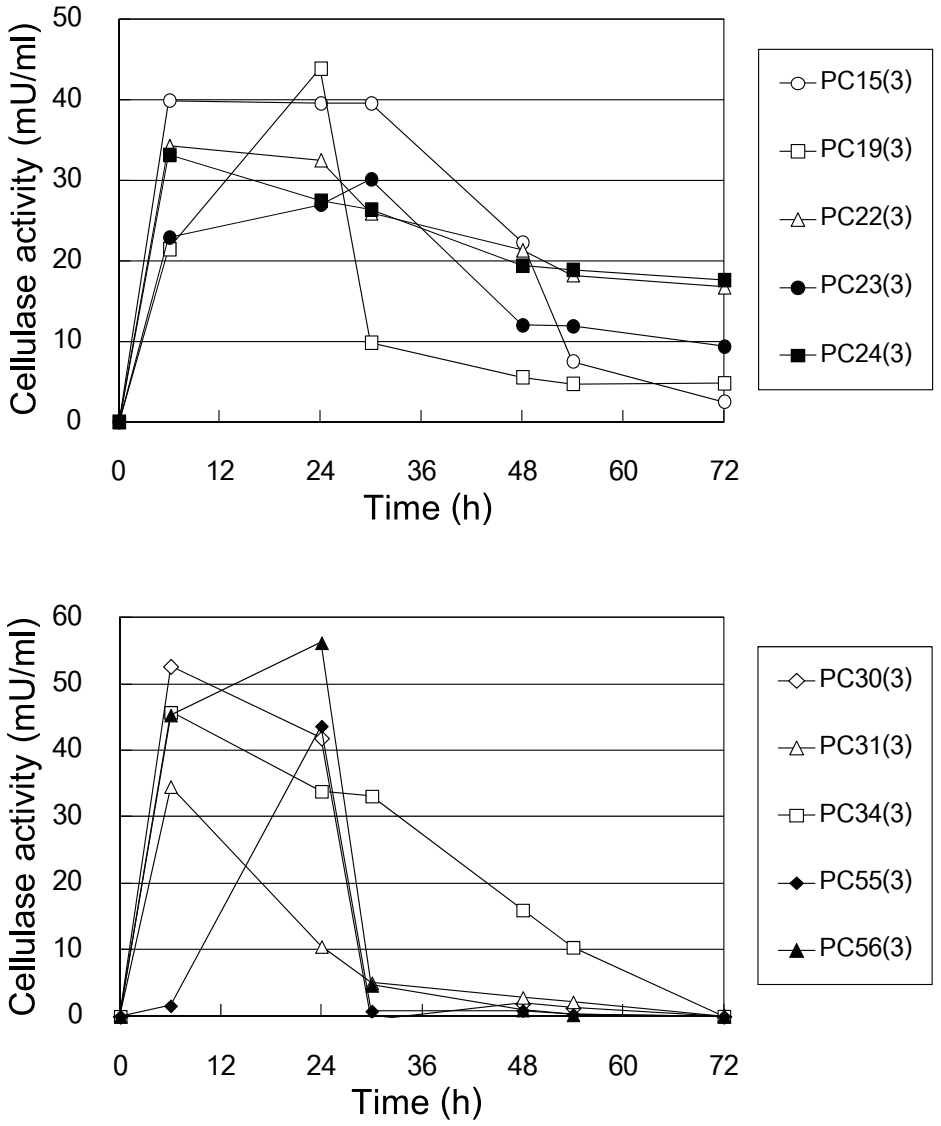


**Figure 1** Cellulase activity of selected bacteria cultivated in CMC broth at 40 °C for 72 hours

## สรุปและเสนอแนะ

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากกองปุ๋ยหมักที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ครั้ง และทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร Plate Count Agar และตรวจนับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนอาหาร พบว่าตัวอย่างปุ๋ยหมัก T1 มีค่าเฉลี่ยจำนวนประชากรจุลินทรีย์มากที่สุดซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะเจริญได้ดีที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 จากนั้นจะลดจำนวนลง และสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีจำนวน 46 ไอโซเลทจากแบคทีเรียที่แยกได้จากกองปุ๋ยหมักทั้งสิ้น 209 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 46 ไอโซเลทมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase) พบว่ามีเชื้อที่มีกิจกรรมในการย่อยสลาย CMC สูง คือ PC15(3) PC22 (3) PC30(3) PC34(3) และ PC56(3) จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทไว้ เพื่อศึกษาการทำหัวเชื้อปุ๋ยหมักต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยนี้

## เอกสารอ้างอิง

ชวลิต ฮงประยูร. 2540. **การทำปุ๋ยหมัก**. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

กรมพัฒนาที่ดิน. **สารเร่ง พด.1 สำหรับทำปุ๋ยหมัก**. แหล่งที่มา: http://www.ldd.go.th/menu_5wonder/wonder1P2.html, 15 กันยายน 2552.

ภัทรกร ภูริชินวุฒิ, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล, พิศาล ศิริธร, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ อัศนี ปาจีนบูรวรรณ์. 2547. *Streptomyces*: **ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา** Didymella bryoniae **และการสังเคราะห์** hydrolytic enzymes. แหล่งที่มา: http://agserver.kku.ac.th/monchai/Faculty/Meeting47/Copy%20of%20Conference_Plant04pdf/Poster-ok/PP36-ok.PDF, 15 กันยายน 2552

Nakasaki, K., S. Hiraoka and H. Nagata. 1998. A new operation for producing disease-suppresive compost from grass clippings. Appl. Environ. Microbiol. 64:4015-4020.

Leandro, L., L. Ferguson, G. Fernandez and F. Louws. 2004. Integration of biological control for management of strawberry root rot, pp 89-1 – 89-3. *In* Proceeding of Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. 31 October – 3 November, 2004, The Rosen Centre Hotel, Florida, USA.