การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ

In vitro Study of Biological Control of Rice Diseases by Antagonistic Strain of *Bacillus subtilis*

สุชล แก้วพรหม

Suchol Keawprom

เลขหมู่ SB976.M55 ส๗2 2539 ฉ.2
Order Key 28943
Bib Key 120202
19 ก.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2539

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ

ผู้เขียน นายสุชล แก้วพรหม

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา วุติคำรงค์พันธ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....ลาศึกษาต่อ.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดวงพร คันธโชติ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา วุติคำรงค์พันธ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....ลาศึกษาต่อ.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสมอใจ ชื่นจิตต์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ มานะ กาญจนมณีเสถียร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนทร โสตถิพันธุ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

Thesis Title	In vitro Study of Biological Control of Rice Diseases by Antagonistic Strain of *Bacillus subtilis*
Author	Mr. Suchol Keawprom
Major Program	Biological Sciences
Academic Year	1996

พระนคร กุลพฤกษ์ ธรรมาธิราช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
พระนครเหนือ
ใช้ยืมจาก
19 ก.ค. 2543

Abstract

The ability of *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 to inhibit of the rice disease forming fungal species *Pyricularia grisea* and *Rhynchosporium oryzae* was tested *in vitro* . After culture for 48 hours, there was a clear zone between *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 and both fungi. The activity against fungal growth suggests that *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 may produce antibiotic substances which are water-soluble and release into the culture medium . Maximum inhibition occurred after growth in PDB for 5 days with shaking. Antibiotic substance extracted with 80% ethanol from cell-free medium and precipitating with 12 N HCl (pH 2) , also inhibited growth of fungus when applied to the cut edge of growing mycelium. Microscopic examination revealed swollen and vacuolated mycelia. Similar to the effect of *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 supporting the suggestion that the anti-fungal activity is indicated by antibiotic substances. The antibiotic substance was shown to be heat resistant. Also *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 produced volatile anti-fungal growth. Maximum activity occurred in PDA medium. The activity appeared to be fungistatic as no change in the mycelium of those fungi was observed under microscopic examination. The volatile substance inhibited both spores of *Rhynchosporium oryzae* and sclerotia of *Rhizoctonia solani.*

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ
ผู้เขียน	นายสุชล แก้วพรหม
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา	2539

บทคัดย่อ

ผลจากการทดลองทางห้องปฏิบัติการพบว่า *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Pyricularia grisea* และ *Rhynchosporium oryzae* ได้โดยเกิดบริเวณยับยั้งขึ้นระหว่างเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และเชื้อราทั้งสอง ผลของฤทธิ์ต้านราแนะให้ทราบว่า *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 สร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำปล่อยเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะที่ดีสุดในการสร้างสารปฏิชีวนะคือการเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 5 วัน ทำการแยกสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการตกตะกอนด้วยกรดเกลือที่ pH เป็น 2.0 และสกัดด้วย 80 % แอทธานอล สารปฏิชีวนะที่สกัดได้ สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อทั้งสองได้ดี เส้นใยส่วนปลายของเชื้อราด้านที่ถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบมีลักษณะบวมและโป่งพอง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยตัวเชื้อ สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 มีคุณสมบัติเสถียรและทนความร้อนได้สูง

นอกจากนี้ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus subtilis* ทั่วไป ยังสามารถผลิตสารชนิดระเหยออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อีกด้วย สารชนิดระเหยจะมีการผลิตได้มากที่สุดในอาหาร PDA และออกฤทธิ์ต้านราแบบยับยั้งชั่วคราว สารระเหยสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Rhynchosporium oryzae* และเม็ด sclerotia ของ *Rhizoctoni solani* เฉพาะสปอร์ของเชื้อราจะเห็นผลการยับยั้งเกิดขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง และก่อให้เกิดการบวมที่ผิดปกติไปอย่างชัดเจน

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาของการทำงานโครงการวิจัยรวมทั้งการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และ รองศาสตราจารย์ ดวงพร คันธโชติ กรรมการที่ปรึกษาและกรรมการสอบที่กรุณาให้คำแนะนำด้านการปฏิบัติการทดลอง และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ อาจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร และผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์ กรรมการสอบที่ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณนลินี จาริกภากร ในด้านคำแนะนำทางด้านโรคข้าว และเอื้อเฟื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และเชื้อราที่ใช้ทดลอง และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือการแยกเชื้อบริสุทธิ์สำหรับการทดลอง

ขอบคุณสำหรับความช่วยเหลือในด้านต่างๆของงานวิจัยที่ทำซึ่งได้รับจากคุณประสาท ศรประสิทธิ์ คุณลัดดา นิลรัตน์ คุณสุพร พิทักษ์บุตร คุณตุ๊ สุวลักษณ์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน

ขอขอบคุณ คุณเกษกร ฉายากุล ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

สุชล แก้วพรหม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	23
2. วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการ	
วัสดุ	24
อุปกรณ์	25
วิธีการ	25
3. ผลการทดลอง	33
4. วิจารณ์	57
5. สรุป	65
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	79
ประวัติผู้เขียน	81

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*	15
2	วงจรการเกิดโรคใบไหม้จากเชื้อ *Pyricularia grisea*	19
3	วงจรการเกิดโรคกาบใบแห้งจากเชื้อ *Rhizoctonia solani*	21
4	แผนผังการสกัดสารปฏิชีวนะอย่างหยาบดัดแปลงจากวิธีการของ MacKeen และคณะ (1986)	29
5	ปฏิกริยาระหว่าง *B. subtilis* NSRS 89-24 กับ *P. grisea*	34
6	ปฏิกริยาระหว่าง *B. subtilis* NSRS 89-24 กับ *R. oryzae*	35
7	การเจริญของเชื้อ *P. grisea* ในอาหาร PDAที่มีสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตจาก *B.subtilis* NSRS 89-24	37
8	การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* ในอาหาร PDAที่มีสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตจาก *B.subtilis* NSRS 89-24	38
9	การเจริญของเชื้อ *P. grisea* ในอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะซึ่งได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB 1-7 วัน	39
10	การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* ในอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะซึ่งได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB 1-7 วัน	39
11	ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24 ในอาหาร PDB เพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae*	40
12	การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารสกัดจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Agar disc diffusion ต่อเชื้อ *P. grisea*	42
13	การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารสกัดจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Agar disc diffusion ต่อเชื้อ *R. oryzae*	43
14	การเจริญของเชื้อ *P. grisea* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24ในอาหาร PDA CDA และ NA	45
15	การเจริญของเชื้อ *R. oryzae*ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24ในอาหาร PDA CDA และ NA	46

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* และ *P. grisea* ที่มีอายุ 2 วันก่อนที่จะนำมาประกบกับจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้รับจากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหารPDA เป็นเวลา 5 วัน	48
17	การเจริญของเชื้อ *P. grisea* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้รับจากการเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไป ในอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน	50
18	การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้รับจากการเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไป ในอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน	50
19	การเจริญของเชื้อ *R. solani* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24ในอาหาร PDA โดยประกบพร้อมกัน	51
20	การเจริญของเชื้อ *R. solani* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วันในอาหาร PDA ก่อนประกบจาน	51
21	การงอกของสปอร์ของเชื้อ *R.oryzae* ในอาหาร PDA ภายใต้การสัมผัสสารผลิตชนิดระเหยจากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วัน ในอาหาร PDA	54
22	การงอกของ sclerotium ของ *R. solani* บนในอาหาร PDA ในเวลาต่างๆกันเมื่อสัมผัสกับสารผลิตชนิดระเหยโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วันในอาหาร PDA	56

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่างๆ เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช	4
2	ลักษณะที่สำคัญและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้ในการจำแนกจุลินทรีย์ *B. subtilis*	14
3	ความสามารถของสารปฏิชีวนะซึ่งสกัดได้จาก *B. subtilis* ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชชนิดต่างๆ	18
4	วิธีการใช้และกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมี ในการควบคุมเชื้อ *P. grisea*	20
5	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริยเติบโตของ *P. grisea*	37
6	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริยเติบโตของ *R. oryzae*	38
7	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *P. grisea*	45
8	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *R. oryzae*	46
9	การเจริญของเส้นใยราหลังจากที่สัมผัสกับสารผลิตชนิดระเหยแล้ว	47
10	ผลของสารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่มีอายุ 2 วัน	47
11	ผลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไปต่อการผลิตสารผลิตชนิดระเหย	52
12	ผลของสารผลิตชนิดระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการเจริญของเชื้อ *R. solani*	52
13	ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกของสปอร์ *R. oryzae*	54

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ซม.	=	เซนติเมตร
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
CV	=	Coefficient variant
g	=	gravity
N	=	Normality
pH	=	hydrogen ion concentration
µl	=	microlitre
β	=	beta
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การใช้สารเคมีในการปราบปรามศัตรูโรคพืชทางการเกษตรกรรมได้ทำกันอย่าง แพร่หลายและใช้ในปริมาณมากจึงส่งผลกระทบและก่อให้เกิดความเสียหายในหลายด้าน เช่น อันตรายต่อผู้บริโภคซึ่งได้รับจากสารเคมีตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งในสิ่งแวดล้อมใกล้เคียงด้วย ผลของสารเคมีต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ นอกจากนี้ปัญหาจากการดื้อยาของเชื้อโรคที่รุนแรงขึ้น ทำให้หลายฝ่ายตระหนักถึงการแสวงหาวิธีการอื่นๆ ที่จะเข้ามาควบคุมโรคพืช โดยส่วนใหญ่แล้วมักมุ่งไปสู่การควบคุมโรคพืชโดยวิธีแบบผสมผสานกล่าวคือ พยายามที่จะหาวิธีการหลายวิธีการที่เหมาะสมเข้ามาควบคุมโรคพืชร่วมกัน (Tauber และคณะ, 1985) วิธีการดังกล่าวได้แก่การปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อโรคสูงขึ้น รวมทั้งการควบคุมโดยชีววิธีโดยมีวัตถุประสงค์หลักคือ เพื่อเพิ่มผลผลิตในขณะที่ต้องการลดค่าใช้จ่ายและอันตรายที่ได้รับจากการใช้สารเคมี

การควบคุมแบบชีววิธีโดยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืช เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะการนำจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคเข้ามาควบคุม จะเห็นได้จากการผลิตจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่างๆในเชิงการค้า (Cook, 1993) ผลดีของการควบคุมแบบชีววิธีนี้ก็คือ ลดอันตรายจากการใช้สารเคมีและให้ผลการควบคุมในระยะยาว

Bacillus subtilis จัดเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่ง พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ไม่ก่ออันตรายหรือทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อคน สัตว์ หรือพืช (Boer และ Diderichsen, 1991) สร้างสปอร์เมื่อมีอายุมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้ *B. subtilis* ดำรงชีวิตอยู่ได้ยาวนานในหลายสภาวะ(Blakeman และ Fokkema, 1982) อีกทั้งยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Botrytis cinerea, Monilinia fructicola, Phytophthora cactorum, Sclerotium rolfsii, Pythium irregulare* เป็นต้น (McKeen และคณะ, 1986 และ Phae และคณะ, 1990) ทำให้ได้รับความสนใจในการนำมาควบคุมโรคพืชหลายชนิดในต่างประเทศ

สำหรับในประเทศไทยนั้น Nalinee และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาความสามารถของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และสายพันธุ์ NSRS 89-26 ในการนำมาควบคุมเชื้อราโรคข้าว พบว่า *Bacillus subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโรคข้าวได้หลายชนิด ความสนใจในการศึกษาความสามารถของ *Bacillus subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อราโรค

ข้าวเนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลัก และเป็นสินค้าส่งออกเป็นอันดับ 4 ของประเทศ โดยประเทศไทยส่งข้าวออกเป็นอันดับ 1 ของโลกคิดเป็นมูลค่าประมาณปีละ 2-3 หมื่นล้านบาท มีเนื้อที่ของการเพาะปลูกประมาณ 60 ล้านไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2535) ในแต่ละปีความเสียหายซึ่งเกิดจากแมลงศัตรูและโรคพืชคิดเป็นมูลค่าประมาณ 4,000-5,000 พันล้านบาท แม้จะมีการควบคุมโรคพืชโดยสารเคมีได้ก็ตาม แต่ก็มีข้อเสียต่างๆคือ ผลเสียต่อสภาพแวดล้อมทำให้ระบบนิเวศน์วิทยาเปลี่ยนแปลง ศัตรูพืชต้านทานสารเคมี อันตรายต่อสุขภาพ และเพิ่มค่าใช้จ่ายแก่เกษตรกรผู้ปลูก ดังนั้นการศึกษานำ *B. subtilis* มาพัฒนาเพื่อใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชข้าว จะช่วยลดความเสียหายจากการกระจายของเชื้อโรคและลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคข้าว

การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในเรื่องความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคข้าวบางชนิด เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินศักยภาพ ที่จะนำ *B. subtilis* NSRS 89-24 มาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคข้าวที่เป็นสาเหตุ อันจะช่วยลดผลของความเสียหาย ที่เกิดขึ้นจากการระบาดของโรค ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นก็จะช่วยส่งผลให้รายได้เกษตรกรที่ปลูกข้าวในประเทศไทยมีโอกาสสูงขึ้นตามมา

การตรวจเอกสาร

1.1 การควบคุมโดยชีววิธี

1.1.1 ประวัติและความหมาย

การควบคุมโดยชีววิธีคือการลดจำนวนเชื้อก่อโรค หรือกิจกรรมของเชื้อโรคโดยสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่ายกเว้นมนุษย์ (Cook & Baker, 1983) ซึ่งรวมถึงการจัดการทางพันธุวิศวกรรมของพืชชั้นสูงโดยการถ่ายโอนยีนที่มีความต้านทานโรคพืชเข้าไป และวิธีการทางเขตกรรม เช่น การปลูกพืชปกคลุมพื้นที่เพื่อกีดกันการเจริญของวัชชพืช

จุลินทรีย์ที่สามารถลดจำนวนเชื้อก่อโรค หรือกิจกรรมของเชื้อก่อโรคเรียกว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms)

การศึกษาการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมโรคพืชเกิดขึ้นครั้งแรกที่ประเทศแคนาดาในปีค.ศ. 1926 โดย G.B. Sanford ซึ่งได้ศึกษาพบปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการก่อโรคของเชื้อ *Actinomyces scabies* ในมันฝรั่ง (Sanford, 1926 quoted in Cook, 1985:25) หลังจากนั้นอีก 5 ปี Sanford และ Broadfoot เป็นคณะแรกที่ตีพิมพ์ผลงานทางวารสารโดยใช้คำว่า "การควบคุมโดยชีววิธี" ในวงการศึกษาทางด้านโรคพืช (Sanford และ Broadfoot, 1931 quoted in Cook, 1985:25)

อย่างไรก็ตาม การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืชในระยะนั้นยังไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควร จนกระทั่งในราวปี ค.ศ.1965 เป็นต้นมางานวิจัยในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืชเริ่มได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องจนทำให้บริษัทเอกชนหลายบริษัทได้ส่งเสริมจัดตั้งโครงการในการพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาเป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงการค้าเพื่อใช้ควบคุมโรคพืช (Weller, 1988) ในปัจจุบันพบว่ามีหลายบริษัทที่ประสบความสำเร็จในการผลิตจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปเชิงการค้าและนำมาควบคุมโรคพืชต่างๆกันบ้างแล้ว (ตารางที่ 1) (เปรมปรีย์, 2537)

1.1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ควรคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในบริเวณที่ไม่เกิดโรค หรือบริเวณที่มีโรคลดลง หรือบริเวณที่ไม่มีการแพร่กระจายของเชื้อโรค และในบริเวณที่มี host ซึ่งมีความว่องไวต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคมากกว่าบริเวณมีโรคระบาด (Baker และ Cook, 1974) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรแยกจากสิ่งแวดล้อมบริเวณเดียวกันกับจุลินทรีย์ก่อโรคที่จะนำกลับมาใช้ควบคุมโรคนั้น ๆ เช่นการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากบริเวณรอบ ๆ รากถั่ว ถ้ามีเป้าหมายที่จะนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคบริเวณรากของถั่วนั้น (Weller, 1988)

1.1.3 กลไกการควบคุมโรคโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

1.1.3.1 กระบวนการ antibiosis หมายถึง กระบวนการเมตาบอลิสมจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ให้ผลผลิตเข้าไปยับยั้งหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง

ตารางที่ 1 การพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่างๆเพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

ประเภทจุลินทรีย์ (ชื่อผลิตภัณฑ์)	โรคที่ควบคุม	ประเทศ/บริษัทที่ผลิต
กลุ่มเชื้อรา		
Chaetomium globosum	โรคเน่าระดับดินในผักกาดหวาน	สวิสเซอร์แลนด์
Gliocladium viren	โรคเน่าระดับดินในไม้ประดับ	อเมริกา จำหน่ายและผ่านการจดทะเบียนโดยองค์กรเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม (EPA) แล้ว
Trichoderma tri-4	โรคเน่าระดับดินในไม้ประดับ	อเมริกา
G. roseum	โรคเหี่ยวในมันฝรั่ง	อเมริกา
T. harzianum	โรคเน่าในผักกาดหวาน	อิตาลี
T. harzianum	โรคเน่าในหอม	อิยิปต์
C. minitans	ควบคุมเชื้อ *Botrytis* และ *Sclerotinia*	เนเธอร์แลนด์
T. hazianum และ *T. polysporum*	ควบคุมโรคพืชหลังเก็บเกี่ยวในผักและผลไม้	อเมริกา
T. polysporum ATCC 2045 และ *T. hazianum ATCC 20476*	ควบคุมเชื้อ *Basidiomycetes* และเชื้ออื่นๆที่เกิดในดิน	Eastman Kodak
T. hazianum F-stop	โรคที่เกิดจากเชื้อราในดิน	Bionab Bioinnovation -AB

ที่มา : เปรมปรีย์, 2537

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ประเภทจุลินทรีย์ (ชื่อผลิตภัณฑ์)	โรคที่ควบคุม	ประเทศ/บริษัทที่ผลิต
กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย		
Agrobacterium radiobacter (Strain 84) (Galltrol-A)	ควบคุมโรคปุ่มปมของโคนต้นไม้และผลไม้	Ag Biochem
Bacillus subtilis (Kodiak)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Bacillus subtilis (Quantum 4000 HB)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Bacillus subtilis (Quantum 4000 P)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Pseudomonas fluorescens (Dagger G)	ควบคุมโรคในกล้าจากเชื้อ *Pythium* และ *Rhizoctonia*	Ecogen
Streptomyces griseoviridis (Mycostop)	ควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราหลายชนิด	Kemira OY.

ก. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics)

สารปฏิชีวนะโดยทั่วไปหมายถึงสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ผลิตโดยจุลินทรีย์ มีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในขนาดปริมาณที่ต่ำ (Fravel, 1988) บทบาทของสารปฏิชีวนะต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง ประการแรกศึกษาเพื่อนำมาผลิตในทางอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี ประการที่สองศึกษาถึงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะดังกล่าว ทั้งนี้ก็เพื่อนำเอาความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการย้ายกลุ่มยีนดังกล่าวเข้าไปยังยีนของพืช เพื่อให้พืชสามารถสร้างสารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อโรคได้เอง จุลินทรีย์ที่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคพืชได้อย่างกว้างขวางล้วนแล้วแต่ผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลกระทบต่อเชื้อก่อโรคทั้งนั้น ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้แก่

chaetomin จาก *Chaetomium globosum* (Di Pietro และคณะ, 1992)

gliotoxin จาก *Gliocladium virens* (Ridout และคณะ, 1992)

agrocin 84 จาก *Agrobacterium radiobacter* (Vicedo และคณะ, 1992)

herbicolin A, B จาก *Erwinia herbicola* (Kempf และคณะ, 1993)

ข. การสร้างสารระเหย (Volatile substance)

มีรายงานการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี พบว่าสารระเหยบางชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา Howell และคณะ (1988) รายงานการควบคุมเชื้อ *Pythium ultimum* , *Rhizoctonia solani* และ *Verticillium dahliae* โดยสารระเหยแอมโมเนียซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* นอกจากนั้น alkyl pyrones ก็เป็นสารระเหยอีกชนิดหนึ่งซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum* มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราหลายชนิดโดยเฉพาะ *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคโคนเน่า (damping-off) ของผักกาดหอม (Claydon และคณะ, 1987) ไฮโดรเจนไซด์ยาไนด์จาก *Pseudomonas fluorescens* ควบคุมเชื้อ *Thielaviopsis basicola* ซึ่งเป็นสาเหตุก่อโรครากเน่าของต้นยาสูบ (Schippers และคณะ, 1990)

1.1.3.2. กระบวนการแก่งแย่งอาหาร (nutrient competition)

ก. การสร้าง siderophore

siderophore เป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำมีความสามารถในการจับกับ ferric ion (Fe^{3+}) ได้เป็นอย่างดี ประโยชน์ของ siderophore คือการนำ Fe^{3+} เข้าไปใช้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียโดยกระบวนการ active transport เนื่องจากธาตุเหล็กมีมากในดินแต่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำจุลินทรีย์จึงไม่สามารถนำไปใช้ได้จำเป็นต้องอาศัย siderophore (Kloepper และคณะ, 1980)

Leong (1986) พบว่าจุลินทรีย์ที่ผลิต siderophores จะได้เปรียบจุลินทรีย์อื่นในการแข่งขันการนำธาตุเหล็ก (Fe^{3+}) มาใช้ โดยเฉพาะในสภาพที่มีธาตุเหล็กอยู่ปริมาณน้อย เมื่อพิจารณาภายในบริเวณรอบๆ รากพืช (rhizosphere) พบว่า siderophores ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะไปจับกับธาตุเหล็กเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ siderophores และธาตุเหล็ก (siderophore-iron complex) ซึ่งเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวมากเท่าไรก็จะเป็นการลดปริมาณธาตุเหล็กรอบๆ รากพืชมากยิ่งขึ้นเท่านั้น ส่งผลให้ปริมาณธาตุเหล็กน้อยลง และจะเป็นข้อจำกัดต่อการนำธาตุเหล็กไปใช้โดยเชื้อโรคส่งผลให้เชื้อโรคหยุดหรือชะลอการเติบโต (Schroth และ Hancock, 1982)

siderophores ส่วนใหญ่มักจะผลิตจากแบคทีเรียมีหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ pseudobactins, pyoverdins, pyochelin, desferrioxamine E และ cepabactin ทั้งหมดนี้ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* นอกจากนี้ยังพบ siderophores ที่ผลิตโดยแบคทีเรียพวก *Enterobacteriaceae* คือ enterobactin และ aerobactin (Buyer และคณะ, 1991)

การที่เชื้อโรคถูกยับยั้งการเติบโตโดย siderophores อาจเกิดจากเหตุผลดังต่อไปนี้ (Weller, 1988)

1). เชื้อโรคไม่สามารถสร้าง siderophores ของตนเองได้

2). เชื้อโรคไม่สามารถใช้ siderophores ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ หรือ จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในสภาพแวดล้อมที่เชื้อโรคอยู่

3). เชื้อโรคผลิต siderophores ในปริมาณน้อยเกินไป หรือผลิต siderophores ที่มีความสามารถในการจับ Fe^{3+}ได้น้อยกว่า siderophores จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

4). เชื้อโรคสามารถผลิต siderophores ที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถนำไปใช้ได้ขณะที่เชื้อโรคเองไม่สามารถนำ siderophores ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ได้

ข. การแก่งแย่งสารอาหาร

แหล่งคาร์บอนซึ่งได้รับจากคาร์โบไฮเดรทและกลูโคสเป็นสารอาหารหลักที่มีจำกัดเป็นเหตุให้จุลินทรีย์เกิดการแข่งขันซึ่งกันและกันในการนำสารอาหารนี้มาใช้ จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้เร็วและมีกระบวนการที่มีประสิทธิภาพของการนำเอาสารอาหารซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดมาใช้ได้ย่อมมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์อื่น (Gilbert และคณะ, 1990) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีกลไกหลักในควบคุมโรคพืชแบบแข่งขันที่สำคัญคือ *Fusarium oxysporum* (Lemanceau และคณะ, 1993) ตัวอย่างเช่น *F. oxysporum* FO47bio ใช้ควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* WES 816 ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าของมะเขือเทศ

1.1.3.3. กระบวนการปรสิต (parasitization)

กระบวนการปรสิตเป็นวิธีการที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งได้รับประโยชน์จาก

จุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งในรูปของสารอาหารและทำให้จุลินทรีย์ที่ถูกปรสิตถูกทำลายไปในที่สุด กระบวนการปรสิตมักจะพบได้ในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรค ส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อรา เอนไซม์ตัวหลักที่สำคัญที่ทำหน้าที่นี้คือ เอนไซม์ chitinase และ β-1,3-glucanase ซึ่งจะย่อยสลาย chitin และ β-1,3-glucan ตามลำดับ อันเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโครงสร้างผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราชั้นสูง (Tweddell และคณะ, 1992) และผนังเซลล์ของ sclerotium (Benyagoub และ Jabaji-Hare, 1992) ผลของการย่อยขั้นสุดท้ายก็จะได้น้ำตาล glucose ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์นำไปใช้ได้ แต่กระบวนการปรสิตก็ไม่ได้เกิดขึ้นง่ายๆและเกิดขึ้นได้ทั่วไป ในบางครั้งอาจจะมีสภาพแวดล้อมเป็นตัวกำหนด เช่น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มักจะสร้าง chitinase และ β-1,3-glucanase ในอาหารที่มีสภาพค่อนข้างเป็นกรด (Elad และคณะ, 1982) แหล่งไนโตรเจนที่ได้รับจากโซเดียมไนเตรท (Tweddell และคณะ, 1992) และภาวะที่มีการเจริญเติบโตช้าเนื่องจากขาดธาตุคาร์บอน (Ordentlich และคณะ, 1988) ทำให้บทบาทของกระบวนการปรสิตถูกจำกัดภายใต้ภาวะแวดล้อมดังกล่าวตัวอย่างจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เป็นปรสิตได้แก่ *Trichoderma harzianum* (Adams, 1990)

1.1.4 ลักษณะของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สมบูรณ์แบบ (the ideal antagonist)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่พึงประสงค์ตามความคิดของ Baker และ Cook (1974) ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1). มีความสามารถในการเพิ่มจำนวน มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เจริญเติบโตได้รวดเร็ว บุกรุกและเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดี

2). สามารถดำรงชีวิตและเจริญได้ในบริเวณ rhizosphere หรือ spermosphere (เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค) หรือ hyposphere ซึ่งอยู่ใกล้โครงสร้างระยะฟักตัวของเชื้อโรคหรือในมวลของดิน (เพื่อลดการมีชีวิตของเชื้อโรค)

3). ผลิตสารปฏิชีวนะที่มีการออกฤทธิ์ทำลายเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด (broad spectrum) อย่างมีประสิทธิภาพในระดับความเข้มข้นต่ำและสารปฏิชีวนะไม่ถูกดูดซับหรือ ถูกทำลายเมื่ออยู่ภายในดินแต่ก็ไม่ควรมีความคงตัว (stable) นานจนเกินไป แม้จะอยู่ในสภาพที่มีอาหารธรรมดาอันเป็นผลให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีการเจริญเติบโตช้า

4). สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไม่ควรยับยั้งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่นๆที่ใช้ร่วมกัน

5). สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไม่ควรส่งผลกระทบต่อความเสียหายต่อพืชควรทดสอบความเป็นพิษต่อพืชก่อนดำเนินการโดยเฉพาะกับเนื้อเยื่ออ่อนๆ

บริเวณปลายรากพืชหรือต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดเป็นต้นหากต้องการที่จะนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาใช้ควบคุมโรคพืชบริเวณใกล้กับส่วนต่างๆของพืชดังกล่าว

6). เมื่อนำมาดำเนินการผลิตในระดับอุตสาหกรรม สปอร์ หรือ หน่วยขยายพันธุ์สามารถทนทานต่อความร้อน และการถูกทำลาย รวมถึงการถูกต่อต้านจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

7). สปอร์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรจะงอกได้ง่าย ได้เร็วกว่าหรือเท่ากับเชื้อก่อโรค

8). จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรปรับตัวได้ดีกว่าเชื้อก่อโรคในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมวิกฤต คือ สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใต้ช่วงของอุณหภูมิและ pH ที่กว้าง รวมถึงปัจจัยอื่นๆ ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพ ในขณะที่ปัจจัยดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลง

นอกจากนี้ Wilson และ Wisniewski (1989) ได้ให้แนวคิดเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีในการนำมาควบคุมโรคพืชของผลไม้หลังเก็บเกี่ยวควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ

1). มีความคงทนทางด้านพันธุกรรม

2). มีประสิทธิภาพเมื่อใช้ในปริมาณที่น้อย

3). ใช้อาหารในการดำรงชีวิตอย่างช้าๆ

4). ดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้

5). สามารถยับยั้งเชื้อโรคได้หลายชนิดทั้งในพืชผักและผลไม้

6). เติบโตได้ในอาหารปกติที่ไม่ต้องลงทุนมาก

7). สามารถเตรียมในรูปที่เก็บรักษาได้ดีและนำไปใช้ได้ง่าย

8). ไม่ผลิตสารที่เป็นอันตราย

1.1.5 หลักทั่วไปในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคพืชแบบชีววิธี (Cook และ Baker, 1983)

1.1.5.1 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชได้นั้นควรทำให้

ก. ลดจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และ/หรือ ควบคุมให้มีระดับต่ำกว่าที่จะก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ (economic threshold)

ข. พืชสามารถป้องกันตนเองจากการติดเชื้อก่อโรค

ค. สามารถควบคุมหรือจำกัดขอบเขตของการเกิดโรคหลังจากที่พืชติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแล้วไม่ให้แพร่กระจายมากขึ้น

1.1.5.2 การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะมาควบคุมโรคพืชจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับเหตุผลดังต่อไปนี้

(Baker และคณะ, 1983)

ก. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องมีความสามารถในการดำรงชีวิตและผลิตสารปฏิชีวนะภายใต้สภาพแวดล้อมที่ใช้ควบคุม

ข. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณที่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อก่อโรคซึ่งรวมถึงอัตราการผลิตสารปฏิชีวนะจะต้องมากกว่าปริมาณที่ถูกทำลายโดยสิ่งแวดล้อม รวมถึงจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และสารปฏิชีวนะจากพืชเองด้วย

ค. สารปฏิชีวนะสามารถทำลายเชื้อก่อโรค ภายใต้สภาวะแวดล้อมนั้นโดยที่เชื้อโรคยังไม่เกิดการดื้อ

1.1.6 ข้อคำนึงบางประการของการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมโรคพืช (Cook, 1993)

การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืชโดยเฉพาะเมื่อนำลงสู่ดินที่จะปลูกพืชนั้น ควรคำนึงถึงผลเสียที่อาจจะเกิดกับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เช่น *Mycorrhiza* หรือ แบคทีเรียที่ตรึงไนโตเจนให้แก่พืช ข้อควรคำนึงอีกประการหนึ่งก็คือสารที่ได้จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องไม่ส่งผลอันตรายหรือเป็นพิษแก่พืชเป้าหมาย แม้ว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะไม่เป็นตัวก่อโรคแก่พืชเป้าหมายก็ตาม สำหรับการควบคุมเชื้อโรคซึ่งส่วนใหญ่มักจะเกิดตามบริเวณบาดแผลของพืช, ผัก, ผลไม้ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องมีความสามารถที่จะรวมตัวอยู่ (colonize) แถวบริเวณบาดแผลของพืช กล่าวคือ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะต้องมีความสามารถที่จะบุกรุกและ/หรือปล่อยสารยับยั้งเข้าไปในเซลล์ของพืช (Wilson และ Wisniewski, 1989)

1.1.7 บทบาทของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับการควบคุมแบบผสมผสาน

มักนิยมทำโดยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลาย ๆ ชนิดมาใช้ควบคุมโรค ซึ่งถือเป็นวิธีทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพของการควบคุมโรคพืชแต่ต้องอยู่ภายใต้ข้อจำกัดที่ว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านั้นจะต้องสามารถที่จะอยู่รวมกันได้ (Yuen และคณะ, 1994) นอกจากนี้ยังได้นำเอาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถทนต่อสารเคมีมาใช้ร่วมกันด้วย

1.1.8 ชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ควบคุมโรค

1.1.8.1 <u>ยีสต์</u> เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาควบคุมโรคของผลไม้หลังเก็บเกี่ยว (Wilson และ Wisniewski, 1989) ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์มีข้อดีคือ

ก. สามารถครอบครองพื้นผิวผลไม้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ยาวนาน

ข. ผลิต extracellular polysaccharides ที่เพิ่มการดำรงชีวิตและป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อรา

ค. สามารถเจริญและใช้อาหารที่หาได้ง่ายได้อย่างรวดเร็ว

ง. ยีสต์ได้รับผลกระทบจากสารเคมีน้อย

อย่างไรก็ตามยีสต์ไม่ค่อยได้รับความสนใจในการนำมาควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคบริเวณรอบๆรากพืชดังเช่นเชื้อราและแบคทีเรีย เนื่องจากที่บริเวณดังกล่าวยีสต์เจริญได้ไม่ค่อยดี มักไม่ค่อยพบการผลิตสารปฏิชีวนะหรือผลิตแต่อาจไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเนื่องจากมีสารประกอบอินทรีย์ภายในดินต้านไว้ (McCormack และคณะ, 1994) สารปฏิชีวนะที่ได้รับจากยีสต์ส่วนใหญ่มักจะมีฤทธิ์ต้านรา เช่น aureobasidins ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* มีฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* ได้ดี (Andrews และคณะ, 1983 ; Takesako และคณะ, 1991)

1.1.8.2 <u>เชื้อรา</u> เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาควบคุมเชื้อราก่อโรคบริเวณรอบๆรากพืชดังแสดงในตารางที่ 1 สามารถดำรงชีวิตได้ยาวนานเนื่องจากสร้างสปอร์ เชื้อราปฏิปักษ์ที่สำคัญในการนำมาควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่องได้แก่

Gliocladium virens ควบคุมเชื้อ *P. ultimum* (Howell, 1991) *R. solani* (Lumsden และ Locke, 1989) และ *Phytophthora cactorum* (Smith และคณะ, 1990)

Chaetomium globosum ควบคุมเชื้อ *R. solani* (Walther และ Gindrat, 1988) และ *Alternaria brassicicola* (Vannacci และ Harman, 1987)

1.1.8.3 <u>เชื้อแบคทีเรีย</u> มีแบคทีเรียหลายกลุ่มด้วยกันที่ได้มีการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช (ตารางที่ 1) ส่วนใหญ่แล้วมักประสบความสำเร็จในระดับภาคสนาม (Weller, 1988) ประสบความสำเร็จและนำมาผลิตเพื่อการค้าโดยจดลิขสิทธิ์ที่สหรัฐอเมริกาโดยตามรายงานของ Cook (1993) มี 3 ชนิด คือ

Agrobacterium radiobacter K-84	ใช้สำหรับควบคุมโรคปุ่มปมของพืชหลายชนิด
Pseudomonas fluorescens	มีชื่อการค้าว่า Dagger G ใช้ควบคุมโรคของฝ้ายที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* และ *Pythium spp.*
Bacillus subtilis	มีชื่อการค้าว่า Kodiak ใช้เป็นสารคลุกเมล็ดพันธุ์พืชป้องกันเชื้อราก่อโรคจากดิน

1.2 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*

1.2.1 *B. subtilis*

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง มีการสร้างสปอร์ พบได้ทั่วไปตามพื้นดิน ต้นไม้ส่วนใบ ลำต้นและบริเวณรากพืช มีการดำรงชีวิตแบบทั้งต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน เติบโตได้ดีในอุณหภูมิ เป็นกลาง และ pH เป็นกลาง จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคแก่คนและสัตว์ สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ amylase และ protease เป็นต้น (Boer และ Diderichsen, 1991)

การจัดจำแนกหมวดหมู่ทางวิทยาศาสตร์ (classification และ nomenclature) ของ *B. subtilis* ใน Bergey's manaul of determinative bacteriology พิมพ์ครั้งที่ 8 โดย Cowan และคณะ (1974) มีดังนี้

Kingdom	Procaryotae
Division	the Bacteria
Order	Cytophagaceae
Family	Bacillaceae
Genus	*Bacillus*

การจำแนกและบ่งชี้อาศัยลักษณะและการทดสอบทางชีวเคมีตามตารางที่ 2

1.2.2 สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดย *B. subtilis*

1.2.2.1 สารปฏิชีวนะประเภท lipopeptide

B. subtilis ผลิตสารปฏิชีวนะประเภท lipopeptide ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันมากประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophilic ซึ่งเป็นวงแหวนพันธะเปปไตด์ที่เชื่อมติดกันโดย OH^- หรือ ester peptide ระหว่างกรดอะมิโน 7 ตัว (seven-amino acid cyclic peptide) กับส่วน hydrophobic ซึ่งเป็น fatty acid ดังรูปที่ 1 lipopeptide มีคุณสมบัติเป็น biosurfactant ที่มีประสิทธิภาพมาก มีความเป็นพิษน้อยกว่า surfactant ที่สังเคราะห์ได้ ประโยชน์ของ biosurfactant เช่น ใช้กำจัดคราบน้ำมัน ใส่เป็นส่วนผสมของอาหาร เป็นตัว emulsifiers ในทางการเกษตร และเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง (Jenny และคณะ, 1991) lipopeptide ที่สำคัญได้แก่

ก. surfactin เป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Bernheimer และ Avigad, 1970 ; Takahara และคณะ, 1976) และมีคุณสมบัติอื่นๆเช่น ยับยั้งการจับกลุ่มของ fibrin (Arima และคณะ, 1968 ; Bernheimer และ Avigad, 1970) และ cyclic AMP phosphodiesterase (Hodono และ Suzuki, 1983)

ข. กลุ่ม iturin สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ตัวที่เชื่อมต่อกับส่วน β amino acid โครงสร้างหลักของสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่เหมือนกัน จะแตกต่างกันเพียงตำแหน่งหมู่กรดอะมิโนบางตำแหน่งเท่านั้น ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้คือ

Bacillomycin F (Mhammedi และคณะ, 1982)

Bacillomycin D (Peypoux และคณะ, 1984)

Bacillomycin L (Chevanet และคณะ, 1985)

Iturin A (Peypoux และคณะ, 1978)

Mycosubtilin (Peypoux และคณะ, 1986)

สารปฏิชีวนะในกลุ่ม iturin จะออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราและยีสต์เป็นส่วนใหญ่ แต่ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันคือ iturin A เนื่องจากพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด (Gueldner และคณะ, 1988 ; Phae และคณะ, 1990 ; Sandrin และคณะ, 1990)

1.2.2.2 กลุ่ม difficidin และอนุพันธ์ได้แก่ difficidin และ oxydifficidin สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อโรคที่สำคัญในคนเช่น *Morganella morgnii,, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus , Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris , P. mirabilis* และ *E. aerogenes* (Zimmerman และคณะ, 1987 ; Wilson และคณะ, 1987)

1.2.2.3 สารระเหย

สารระเหยที่เกี่ยวข้องในการควบคุมโรคพืชซึ่งผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านมายังไม่มีรายงานให้ทราบถึงโครงสร้างและส่วนประกอบทางเคมี มีเพียงรายงานของการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของสารระเหยจาก *B. subtilis* ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชที่เพิ่งได้รับความสนใจเมื่อไม่นานมานี้ โดย Fiddaman และ Rossall (1993)

1.2.3 การนำ *B. subtilis* มาใช้ควบคุมโรคพืช

B. subtilis ได้รับความสนใจในการนำมาควบคุมโรคพืชหลายชนิดตัวอย่างเช่น ควบคุมเชื้อ *Uromyces phaseoli* (Baker และคณะ, 1985) *Puccinia pelargonii-zonalis* (Rytter และคณะ, 1989) *Verticillium dahliae* (Hall และคณะ, 1986) *R. solani* (Tschen, 1987) *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici* และ *Pseudomonas solanacearum* (Phae และคณะ, 1992) *Monilinia fructicola* (Pusey และ Wilson, 1984 ; Pusey และคณะ, 1988) *Sclerotium cepivorum* (Utkhede และ Rahe, 1983) และ *Eutypa lata* (Ferreira และคณะ, 1991)

McKeen และคณะ (1986) ได้ทำการศึกษาสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จาก *B. subtilis* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้อีกหลายชนิด (ตารางที่ 3)

สำหรับในประเทศไทย Nalinee และคณะ (1991) ได้ทำการแยกเชื้อ *B. subtilis* หลายสายพันธุ์จากแปลงทดลองปลูกข้าวและทำการศึกษาสมบัติการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าวได้เป็นอย่างดี

1.3 โรคข้าวที่สำคัญ

1.3.1. <u>โรคใบไหม้ (Rice blast)</u> เกิดจากเชื้อ *Pyricularia grisea*

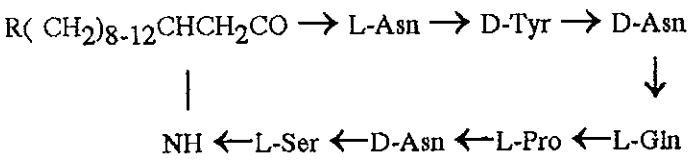
ลักษณะอาการของโรค จะมีลักษณะเป็นแผลที่ใบคล้ายสลักของแกนที่ใช้ปั่นฝ้าย ตรงกลางแผลกว้างและมีปลายทั้งสองข้างแคบลงและแหลม คล้ายรูปตา แผลขนาดใหญ่มีความยาว

ตารางที่ 2 ลักษณะที่สำคัญและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้ในการจำแนกจุลินทรีย์ *B. subtilis*

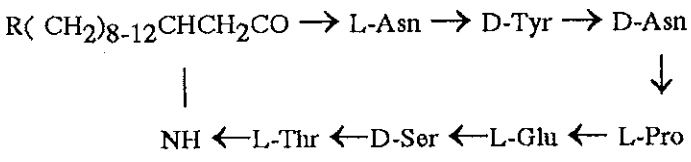
คุณสมบัติที่ทดสอบ	สายพันธุ์ *B. subtilis*			
	NB22	UB24	YB8	SB4
Gram stain	+	+	+	+
Spore	+	+	+	+
Spore shape	Elliptical or cylindrical			
Spore position	central	central	central	central
Maximum growth temperature (C)	50	50	55	55
Sporangium distended distinctly	–	–	–	–
Catalase และ Oxidase	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	–	–	–	–
Anaerobic growth on glucose agar	+	+	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+	+	+
Acid from				
D-glucose, L-arabinose	+	+	+	+
D-xylose, D-mannitol	+	+	+	+
D-fructose, inositol	+	+	+	+
Casein และ Gelatin decomposition	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+
NO_3^- to $NO_2^=$	+	+	+	+
Utilization of Citrate	+	+	+	+
Propionate	–	–	–	–
Egg yolk agar opacity	–	–	–	–
pH in VP broth	8	7.7	6.3	7.7

ที่มา : Phae, 1990

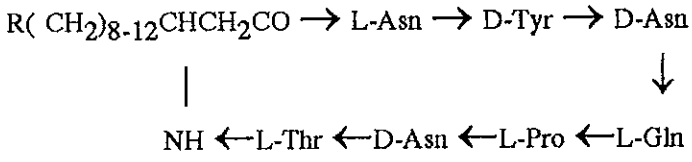
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*



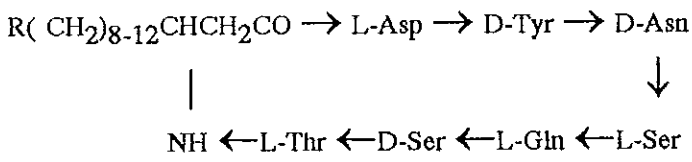
Iturin A



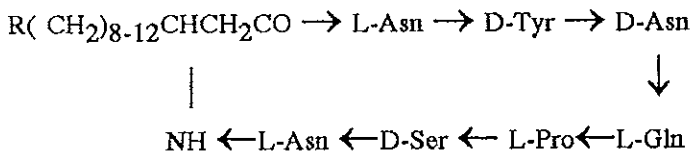
Bacillomycin D



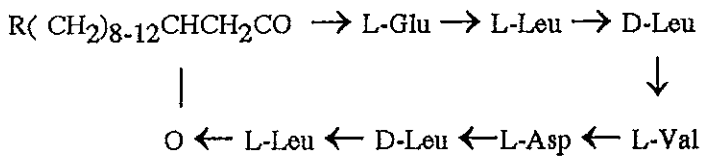
Bacillomycin F



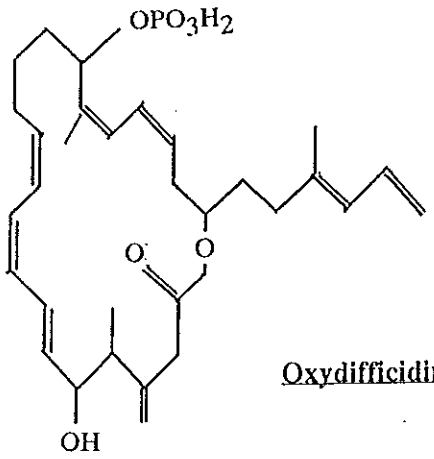
Bacillomycin L



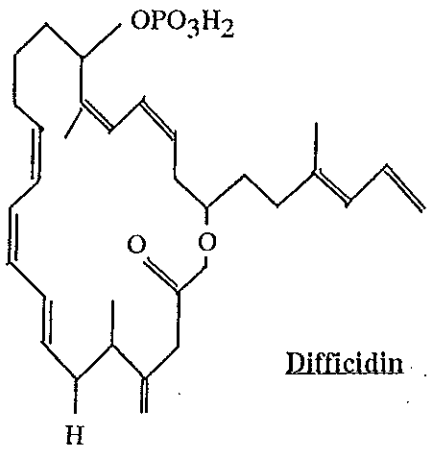
Mycosubtilin



Surfactin



Oxydifficidin



Difficidin

ประมาณ 1.0 ถึง 0.5 ซม. และกว้างประมาณ 0.3 ถึง 0.5 ซม. ตามปกติตรงกลางแผลเป็นสีเทา แผลโรคขนาดเล็กสีน้ำตาลเป็นเครื่องชี้ให้ทราบว่าพันธุ์ข้าวนั้นต้านทานโรค ซึ่งบางครั้งก็คล้ายกับแผลในโรคใบจุดสีน้ำตาล

วงจรของโรค การก่อโรคเริ่มจากสปอร์ที่เรียกว่า conidia ถูกปลดปล่อยจากพืชที่เป็นโรคซึ่งส่วนมากมักเกิดในเวลากลางคืน ในขณะที่มีน้ำค้างหรือน้ำฝน และถูกลมพาไปตกบนต้นข้าว เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม conidia จะเริ่มงอกโดยสร้าง germ tube ออกมา ส่วนใหญ่มักใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง ที่ปลายของ germ tube จะมีการสร้าง appressorium ซึ่งเป็นส่วนที่มีบทบาทในการช่วยยึดเกาะกับส่วนของพืช หลังจากนั้นเชื้อราจะสร้างส่วนที่เป็นเส้นใยบาง ๆ เป็นปมเล็ก ๆ (peg penetration) แทงเข้าไปยังผนังชั้นนอกของ epidermal cell และเข้าไปเจริญภาย

ในเซลล์ของ host เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ก็จะมีการสร้าง conidia พร้อมที่จะเข้าสู่วงจรของโรคอีกต่อไป (รูปที่ 2) (Ou, 1973 ; Reissig และคณะ, 1986)

นอกจาก conidia จะเป็นสาเหตุเริ่มต้นของการเกิดโรคไหม้แล้ว Yaegashi และคณะ (1987) พบว่าเส้นใยของ *P. grisea* ก็ก่อโรคได้ โดยสร้าง appressorium ที่ปลายของเส้นใย และบุกรุกเข้าไปใน host cell ดังนั้น *P. grisea* ที่ไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการสร้างสปอร์ (sporulation) หรือการสร้าง conidia ก็ก่อโรคได้

การป้องกันและควบคุมโรคใบไหม้โดยสารเคมี

สารเคมีที่นิยมใช้เช่น Blasticin S, Kitazin P, Hinosan, Rabcide, Oryzaemate, Fujione และ Kasugamycin กลไกและวิธีการใช้ดังตารางที่ 4

1.3.2 <u>โรคกาบใบแห้ง (Sheath blight)</u> เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani*

ลักษณะอาการของโรค เป็นแผลสีเทาแถบเขียวบนกาบใบใกล้ๆระดับน้ำในนา แผลมีลักษณะเป็นรูปไข่ยาวประมาณ 1-3 ซม. แผลอาจขยายตัวมาต่อกันได้ในภายหลังขอบของแผลจะมีสีต่างกันตามพื้นที่ที่เกิดเป็นโรคอาการของโรคจะเห็นได้ชัดในระยะที่ข้าวตั้งท้องออกรวง

วงจรของโรค เริ่มจาก sclerotium ของ *R. solani* ซึ่งอยู่ตามพื้นดิน ติดเข้าสู่ส่วนของลำต้นของต้นข้าว เมื่อสภาวะเหมาะสม sclerotium เจริญเป็นเส้นใยแล้วเจริญยึดติดกับชั้น epidermis ซึ่งมักจะเป็นส่วนด้านในของก้านใบ หลังจากเจริญขึ้นสู่ลำต้นเป็นระยะทางหนึ่งแล้วเส้นใยจะมีการสร้างแขนงแตกออกไปเรื่อย ๆ ซ้ำหลายครั้งจนเป็นผลให้ความยาวของเส้นใยที่ได้มีลักษณะสั้นๆ การเจริญของเส้นใยช่วงนี้เรียก infection cushions จากนั้นจะสร้าง peglike appressorium จากเส้นใยของ infection cushions เจาะผ่านชั้น epidermis เข้าไปเจริญภายใน cell ของก้านใบจนกระทั่งผลิต sclerotium พร้อมจะเข้าวงจรของโรคต่อไป (รูปที่ 3) (Matsuura, 1986)

การป้องกันและควบคุมโรคกาบใบแห้งโดยใช้สารเคมี

สารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ benomyl, Validamycin, Polyoxin, Chingfengmeisu, และ Jinggangmycin วิธีการควบคุมที่เหมาะสมกำลังอยู่ในขั้นทดลองรวมทั้งผสมสารเคมีลงในระบบชลประทานอีกด้วย

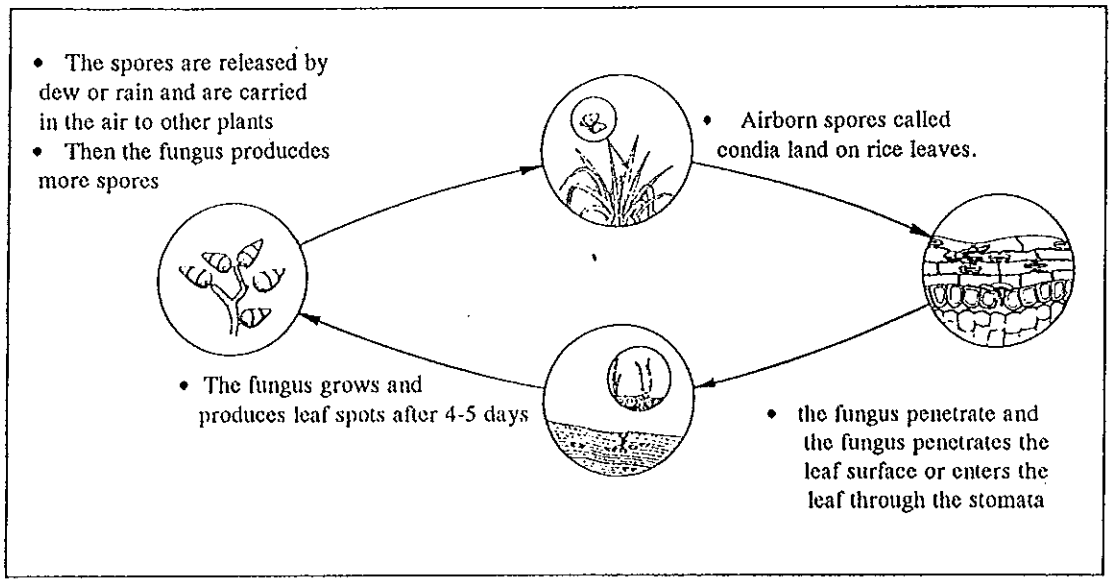
1.3.3 <u>โรคใบวงสีน้ำตาล (Leaf scald)</u> เกิดจากเชื้อ *Rhynchosporium oryzae*

ลักษณะอาการของโรค ตามปกติเชื้อราจะทำให้ต้นข้าวมีแผลที่ปลายใบและบางครั้งทำให้เกิดแผลที่ขอบใบหรือส่วนอื่นๆของแผ่นใบ แผลเป็นวงรีหรือค่อนข้างกลมเป็นรอยช้ำ ยาวประมาณ 1-5 ซม. และกว้างประมาณ 0.5 ซม. การขยายตัวของแผลเป็นวงซ้อนกันคล้ายหน้าตัดของเนื้อไม้ยืนต้น ขอบของแต่ละวงเป็นสีน้ำตาลแก่ ส่วนพื้นที่ระหว่างวงเป็นสีน้ำตาล ใบถูกทำลายอย่างรุนแรงจะแห้งเป็นสีฟางข้าว และมีวงสีน้ำตาลล้อมอยู่

วงจรของโรค เริ่มจาก conidia ปลิวตกลงบนใบข้าว ต่อจากนั้น conidia จะมีการงอก germ tube และเจริญไปเป็นเส้นใยที่มีความแข็งแรง (vigorous hyphae) ยึดติดกับปากใบข้าว และ

ตารางที่ 3 ความสามารถของสารปฏิชีวนะซึ่งสกัดได้จาก *B. subtilis* ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชชนิดต่างๆ (McKeen และคณะ, 1986)

เชื้อราที่ทดสอบ	ขนาดของบริเวณยับยั้ง (มม.)	
	สารสกัดจากเชื้อ *B. subtilis*	ตัวควบคุม
Armillaria mellea	0	0
Botryophaeria dothidea	34	0
B. obtusa	35	0
Botrytis cinerea	26	0
Ceratocystis ulmi	26	0
Coniothyrium olivaceum	22	0
Cytospora sp.	21	0
Endothia parasitica	37	0
Epicoccum purpurscens	27	0
Fusarium sp.	18	0
Geotrichum candidum	13	11
Glomerella cingulata	27	0
Monilinia fructicola	31	0
Penicillium expansum	23	12
Phytophthora cactorum	0	0
Pythium aphanidermatum	12	0
Pythium irregulare	0	0
Rhizopus sp.	16	0
Sclerotium rolfsii	0	0



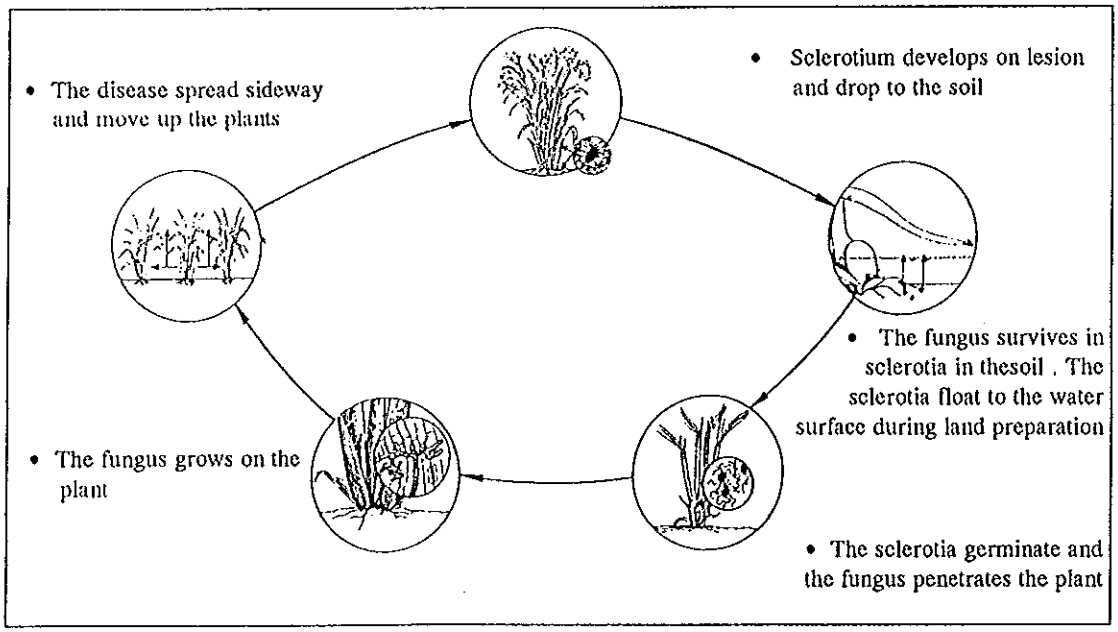
รูปที่ 2 วงจรการเกิดโรคใบไหม้จากเชื้อ *Pyricularia grisea* (ที่มา : Ou, 1973)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF [illegible] UNIVERSITY

ตารางที่ 4 วิธีการใช้และกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีในการควบคุมเชื้อ *P. grisea*

Fungicide	Application	Mode of action
Blasticidin S	Dust or spray	Inhibition of spore germination and mycelial growth
Kasugamycin	Dust or spray	Inhibition of mycelial growth
Kitazin P	Dust or spray Submerged application	Inhibition of spore germination and mycelial growth
Hinosan	Dust or spray	Inhibition of spore germination and mycelial growth
Rabcide	Dust or spray	Inhibition of penetration
Oryzemate	Submerged application	Inhibition of penetration and mycelial growth
Fuji-one	Submerged application Nursery box application	Inhibition of penetration and mycelial growth

ที่มา : C.A.B, 1985



รูปที่ 3 วงจรการเกิดโรคกาบใบแห้งจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* (ที่มา : Ou, 1973)

สร้างโครงสร้างเหมือน appressorium ในขนาดต่าง ๆ แล้วจึงเข้าสู่ช่องทางปากใบ การเจริญของเส้นใยในช่วงหลังจากนี้จะมีขนาดหนาขึ้น และเจริญมากมายในช่อง substromatal ผ่านเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์และชั้น mesophyll ตามลำดับก่อนจะสร้างแขนง conidiophores ผ่านชั้นปากใบออกมาเพื่อผลิตสปอร์และพร้อมที่จะเข้าสู่วงโคจรต่อไป (C.A.B., 1985)

การป้องกันและควบคุมโรคใบวงสีน้ำตาลโดยใช้สารเคมี

ไม่นิยมควบคุมโดยสารเคมีเพราะสารฆ่าเชื้อราบางชนิดกระตุ้นการงอกของสปอร์ของเชื้อ ส่วนใหญ่จะหลีกเลี่ยงการใช้ปุ๋ยที่มีส่วนผสมของปริมาณไนโตรเจนสูง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคข้าวของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24

2. ศึกษาผลของอาหารและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

3. ทำการแยกหรือสกัดสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24

4. ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

5. ศึกษาผลของอาหารในการผลิตสารชนิดระเหยโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

6. ศึกษาผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

7. ศึกษาความสามารถของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกของสปอร์และ sclerotium ของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

8. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งและการฆ่าของสารผลิตชนิดระเหย

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

จุลินทรีย์

1. เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (โดยความเอื้อเฟื้อของคุณเนลินี จาริกภากร ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง)ซึ่งแยกเชื้อได้จากเมล็ดข้าวที่สมบูรณ์เพาะเลี้ยงใน NA slant เก็บในตู้เย็นทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆเดือน
2. เชื้อราสาเหตุโรคข้าว *Pyricularia grisea* , *Rhychosporium oryzae* , และ *Rhizoctonia solani* ได้รับจากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงซึ่งแยกได้จากต้นข้าวที่เกิดโรคจากเชื้อนั้นๆ แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ถ่ายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกครั้งก่อนที่เส้นใยของเชื้อราที่ทดสอบจะเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ

อาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA, Difco)
2. Nutrient Broth (NB, Difco)
3. Nutrient Agar (NA, Difco)
4. Potato Dextrose Broth (PDB, เตรียมจากสูตรภาคผนวก)
5. Czapex Dox Broth (CDB, เตรียมจากสูตรภาคผนวก)
6. Czapex Dox Agar (CDA, เตรียมจากสูตรภาคผนวก)

สารเคมีที่ใช้

Bacto dextrose (Difco)

Yeast extract (Difco)

Agar (Difco)

Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)

Potassium chloride (KCl)

Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)

Iron (II) sulfate ($FeSO_4.7H_2O$)

Sodium hydroxide (NaOH)

อุปกรณ์

1. pH meter ของบริษัท Radiometer A/S PHM61
2. เครื่องเขย่าแบบวงกลมของบริษัท Thermolyne รุ่น Big bill
3. กล้องจุลทรรศน์ของบริษัท Olympus
4. กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Pentax
5. เครื่องเซนตริฟิวจ์ของบริษัท Beckman J รุ่น 2-21
6. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่งของบริษัท Mettler รุ่น P1210
7. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งของบริษัท Mettler รุ่น P1210
8. ตู้เขี่ยเชื้อ ยี่ห้อ Gelaire
9. ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ Memmert
10. Haemocytometer (ที่นับจำนวนเม็ดเลือด)
11. เครื่อง rotary evaporator ยี่ห้อ Buchi
12. อุปกรณ์ที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้แก่ ปีกเกอร์ กระบอกตวง จานเพาะเชื้อ (petri-dish) แผ่นพาราฟิล์ม แผ่นกระจกสไลด์

วิธีการ

2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Dual culture test

ใช้ที่เจาะรู (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. เจาะโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิดตรงตำแหน่งปลายของเส้นใยที่กำลังเจริญ นำมาวางยังตำแหน่งตรงกลางวุ้นอาหาร PDA จานใหม่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C จนโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2 ซม. นำ *B. subtilis* NSRS 89-24 ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ปริมาณ 5 µl มาหยดห่างจากโคโลนีของเชื้อรา 2 ซม. นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน ตรวจดูผลทุกวัน โดยตรวจดูขอบเขตของการยับยั้ง (clear zone) และความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเชื้อรา *Pyricularia grisea* และ *Rhynchosporium oryzae* หลังจากปลายด้านหนึ่งด้านใดของเชื้อราเจริญถึง

ขอบจานเพาะเชื้อ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยราบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยทำการตัดเส้นใยมาย้อมดูด้วยน้ำยา lactophenol cotton blue ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะเส้นใยบริเวณเชื้อราที่ใช้เป็นชุดควบคุมซึ่งเป็นบริเวณที่เส้นใยของเชื้อราไม่ถูกยับยั้งโดย *B. subtilis* NSRS 89-24

2.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. Subtilis* NSRS 89-24

2.2.1 การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24

2.1.1.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (stock culture)

เขี่ยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 24 ชั่วโมง จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 1 loopfull ใส่ในอาหาร NB ปริมาตร 40 มล. ที่บรรจุอยู่ในฟลาสค์ขนาด 100 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.1.2 การเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ

เติมหัวเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เริ่มต้นที่เตรียมไว้จากข้อ 2.2.1.1 (4 % ของอาหารเลี้ยงเชื้อ)ในอาหารเหลว NB PDB และ CDB ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสค์ขนาด 500 มล. แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดนำไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 g นาน 20 นาที เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียออก นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่ได้ทำการทดลองตามข้อ 2.2.1.3 ต่อไป

2.2.1.3 การเตรียมวุ้นอาหารผสมสารปฏิชีวนะ

นำสารปฏิชีวนะซึ่งละลายอยู่ในส่วนเหลวที่ได้จาก ข้อ 2.2.1.2 มาผสมกับวุ้นอาหาร PDA ในอัตราส่วน 1000 มล.ต่อวุ้นอาหาร PDA 39 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. จานละ 6 มล. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปทดสอบในขั้นต่อไป สำหรับจานควบคุมเตรียมโดยใช้อาหารเหลวแต่ละชนิด (ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24) นำไปผสมกับวุ้นอาหาร PDA เช่นเดียวกัน

2.2.1.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

นำก้อนเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. มาวางลงตำแหน่งตรงกลางบนอาหาร PDA ซึ่งเตรียมได้จาก ข้อ 2.2.1.3 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จานเลี้ยงเชื้อ นำมา

บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทุกวันในแนวตั้งฉากกันแล้วหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติในเรื่องความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT VERSION 9.2 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยวิธี F-test และคำนวนหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร (Gamliel และคณะ, 1989)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - \frac{(r^2 \times 100)}{R^2}$$

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

2.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด

2.2.2.1 เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ตามข้อ 2.1.1.1

2.2.2.2 เลือกอาหารชนิดที่ดีที่สุดที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งทราบจากผลการทดลองในข้อ 2.2.1 คืออาหาร PDB มาเตรียมการทดลองโดยใส่ในฟลาสค์ขนาด 500 มล.ปริมาตร 100 มล.จำนวน 8 ฟลาสค์

2.2.2.3 เติมเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เริ่มต้นลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2.2.2 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อมีอายุครบในแต่ละวัน วันละหนึ่งฟลาสค์ จนครบ 7 วัน พร้อมด้วยฟลาสค์อาหารชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 นำมาปั่นที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที ขจัดตะกอนเซลล์ *B. subtilis* NSRS 89-24 ทิ้ง นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (supernatant)ที่เก็บได้แต่ละวันมาทดสอบตามวิธีการในข้อ 2.2.1.3 และ 2.2.1.4 ตามลำดับ

2.2.3 วิธีการสกัดสารปฏิชีวนะ

ทำการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหารและระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้ข้อมูลจากผลการทดลองข้อที่ 2.2.1 และ 2.2.2 ตามลำดับ คือในอาหาร PDB เป็นเวลา 5 วัน เพื่อแยกและสกัดสารปฏิชีวนะตามวิธีการของ McKeen และคณะ (1986) ดังนี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบตามเวลาแล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มาปั่นที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที ขจัดเซลล์ *B. subtilis* NSR 89-24 ที่ตกตะกอนทิ้ง นำส่วนใส (supernatant) มาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 2 ด้วยสารละลาย 12 N HCl จากนั้นจึงนำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 g

เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนที่เป็นตะกอนมาสกัดสารปฏิชีวนะด้วยการเขย่าอย่างแรงกับ 80 % แอทธานอลปริมาตร 50 มล. ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำสารสกัดใน 80 % แอทธานอล ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ชั่งปริมาณของสารที่ได้ก่อนนำสารไปทดสอบในขั้นต่อไป ซึ่งนำมาละลายใน 80% แอทธานอล อีกครั้งหนึ่ง

2.2.4 การทดสอบความสามารถของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

นำสารปฏิชีวนะที่สกัดได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* โดยวิธี agar disc diffusion (Lorian, 1980) โดยเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* ที่อุณหภูมิ 25 °C จนมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 ซม. นำสารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้น 20 มก./มล ใน 80% แอทธานอล ปริมาตร 200 µl หยดลงบนแผ่นกระดาษกรอง Whatman No.2 ขนาด 1 X 2 ซม. ที่วางห่างจากขอบของโคโลนีเชื้อราทั้งสอง 2 ซม. นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน สังเกตบริเวณที่มีการยับยั้ง (clear zone) ทุกวัน

2.2.5 การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

หลังจากทดสอบตามข้อ 2.2.4 และมี clear zone เกิดขึ้นแล้ว ทำการตัดเส้นใยบริเวณส่วนปลายที่อยู่ใกล้กับสารปฏิชีวนะนำมาย้อมด้วย lactophenol cotton blue ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Phae, 1992) สังเกตลักษณะของเส้นใยของเชื้อราหลังจากสัมผัสสารปฏิชีวนะเปรียบเทียบกับเส้นใยในชุดควบคุม

2.3 การศึกษาการผลิตและฤทธิ์ของสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24

2.3.1 การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการผลิตสารระเหย

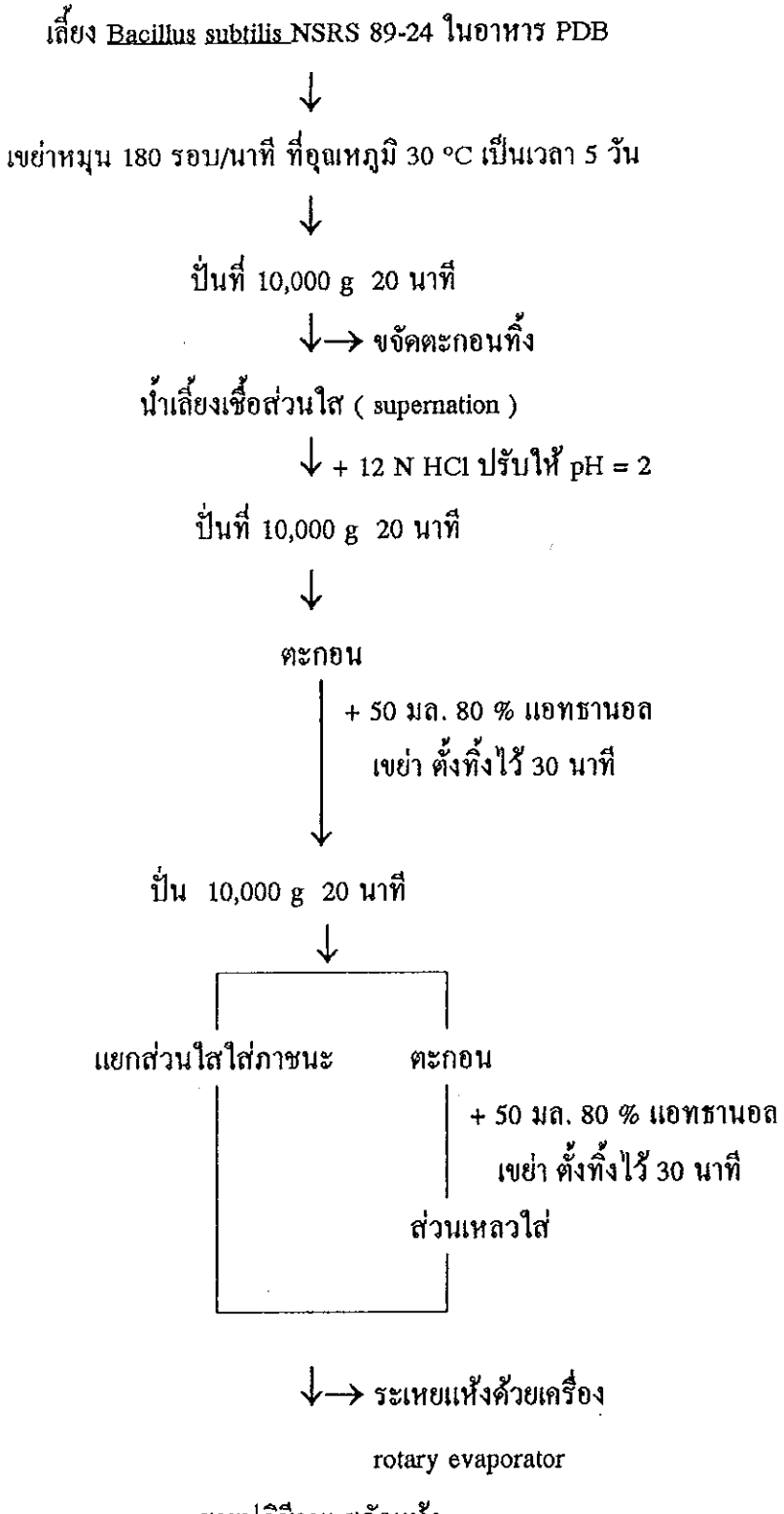
2.3.1.1 การเตรียม stock *B. subtilis* NSRS 89-24 (ตามข้อ 2.2.1.1) จากนั้นดูดหัวเชื้อปริมาตร 200 µl หยดลงบนจานอาหาร PDA NA และ CDA (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มม.) เกลี่ยเชื้อบนอาหารให้กระจายทั่ว

2.3.1.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

นำก้อนเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ที่มีเส้นใยอ่อนผ่านมาวางตรงกลางจานเพาะเชื้ออาหาร PDA ที่เตรียมไว้

2.3.1.3 การทดสอบ

นำจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (จากข้อ 2.3.1.1) มา



รูปที่ 4 แผนผังการสกัดสารปฏิชีวนะอย่างหยาบดัดแปลงจากวิธีการ ของ McKeen และคณะ (1986)

ประกบกับจานอาหารที่เพาะเชื้อราสาเหตุโรคข้าว (จากข้อ 3.3.1.2) แล้วปิดรอบจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองเข้าด้วยกันโดยแผ่นพาราฟิล์มพันรอบเพื่อป้องกันไม่ให้สารระเหยที่ *B. subtilis* NSRS 89-24 ผลิตรั่วออกจากจานเลี้ยงเชื้อทั้งสอง โดยวางให้จานอาหารที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 อยู่ด้านบนนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราทุกวันเป็นเวลา 5 วัน(Fiddaman และ Rossall, 1993) นำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1.4 สำหรับชุด ควบคุมใช้จานอาหารแต่ละชนิดที่ไม่มี *B. subtilis* NSRS 89-24 มาประกบกับเชื้อราในแต่ละชุดทดสอบทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารผลิตชนิดระเหย

2.3.2.1 การทดสอบผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเจริญของเส้นใยราการทดลองนี้แบ่งทำเป็น 2 กรณี ดังนี้

ก. ทำการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 บนอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารระเหยที่ดีที่สุด จากผลการทดลองข้อ 2.3.1 คือบนอาหาร PDA ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.3.1.3 โดยนำจานอาหารที่วางก้อนเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. มาประกบกับจานที่มีเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราที่นำมาทดสอบได้แก่ *P. grisea* *R. oryzae* และ *R. solani* ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราทุกวันจนครบ 3 วัน หรือจนกระทั่งขนาดโคโลนีของราในจานทดสอบไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับเชื้อ *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญรวดเร็วมาก วัดผลการทดลองเมื่อเชื้อในจานควบคุมโตเต็มจาน จากนั้นทำการตัดเส้นใยบริเวณริมนอกสุดของโคโลนีราในจานทดสอบมาย้อมด้วย lactophenol cotton blue ตรวจดูลักษณะของเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับ เชื้อราในชุดควบคุม

ในการทดลองนี้ได้ใช้เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไป ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการทดสอบเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการเจริญของเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae*

ในส่วนของเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* นั้น ทำการทดลองต่อโดยนำจานทดสอบอีกส่วนหนึ่งมาแยกเอาจานที่มีเชื้อ *B. subtilis* ออกไปแล้วนำฝาจานไร้เชื้อมาปิดจานเชื้อราแทนนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ต่ออีก 2 วัน ทำการบันทึกขนาดของโคโลนี ดูผลของการยับยั้งว่าเป็นแบบชั่วคราวหรือถาวร

สำหรับการทดสอบกับเชื้อ *R. solani* เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้เจริญเติบโตได้เร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* NSRS 89-24 ถ้าทำการเพาะเลี้ยงพร้อมกัน จึงได้ทำการทดลองเพิ่มโดยนำจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมงมาประกบกับจานเลี้ยงเชื้อรา (ขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลาง 5 มม.)

ข. ทำการทดสอบ *P. grisea* และ *R. oryzae* ที่มีอายุ 2 วัน โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ซม. นำมาประกบกับจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และเพาะเลี้ยงต่ออีก 5 วัน ทำการบันทึกขนาดของโคโลนีรา

2.3.2.2 การทดสอบผลของสารผลิตชนิดระเหย ต่อการงอกของสปอร์รา *R. oryzae*

สปอร์ที่ใช้ทดลองคือสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae* ทำการเตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธี Phae และคณะ (1992) โดยเลี้ยงเชื้อรา *R. oryzae* บนอาหาร PDAให้เจริญเต็มจานเพาะเชื้อนาน 10 วัน ดูดน้ำกลั่นไร้เชื้อใส่บนจานเพาะเชื้อ *R. oryzae* ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้กระจายทั่ว นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านผ้าก๊อซไร้เชื้อที่ซ้อนกัน 4 ชั้น เพื่อกำจัดเส้นใยราที่ปนอยู่ นำมานับสปอร์ด้วย haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เจือจางให้ได้จำนวนสปอร์ 10^5-10^6 สปอร์/มล. จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 200 µl มาใส่ในจาน PDA เกลี่ยสปอร์ให้กระจายทั่วจานอาหาร แล้วนำจานที่เลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วัน บนอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารระเหยได้ดีที่สุด ซึ่งใช้ข้อมูลจากการทดลอง ข้อ 2.3.1 คืออาหาร PDA นำมาประกบกับจานที่มีสปอร์เข้าด้วยกัน ปิดจานทั้งสองด้วยแผ่นพาราฟิล์มนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ตรวจดูความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับสปอร์ โดยเปิดจานอาหารเพาะเชื้อที่เลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 แต่ละชุดการทดลองออกจากจานอาหารเพาะเชื้อที่เลี้ยงสปอร์เชื้อราเมื่อเวลา 8, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และนำไปตรวจดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือมีเฉพาะสปอร์ราที่งอกตามภาวะปกติ แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำโดยใช้หลักการว่าสปอร์ที่งอกหมายถึงสปอร์ที่มี germ tube มีความยาวเป็นครึ่งหนึ่งของขนาดสปอร์เดิม

2.3.2.3 การทดสอบผลของสารการผลิตชนิดระเหยต่อการยับยั้งการงอกของ sclerotium ของ *R. solani*

ก. การเตรียมเม็ด sclerotium

เลี้ยงเชื้อ *R. solani* บนจานเพาะเชื้ออาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน *R. solani* จะสร้างเม็ด sclerotium ขึ้นกระจายทั่วจานอาหารเพาะเชื้อ ทำการคัดเลือกเม็ด sclerotium ที่มีขนาดเท่าๆกันโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม. นำมาวางบนจานอาหารเพาะเชื้อ PDA จานละ 3 เม็ด

ข. นำจานอาหาร PDA ที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มาแล้วเป็นเวลา 1 วัน (ดังข้อ 2.3.1.1) นำมาประกบกับจานที่วางเม็ด sclerotium ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูความสามารถในการงอกของเม็ด sclerotium ทุกวัน บันทึกผล

3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24

จากการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* ในอาหาร PDAที่อุณหภูมิ 25°C จนโคโลนีเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ซม. จึงหยดเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อราทั้งสองอยู่ โดยให้ห่างจากปลายเส้นใยของเชื้อราประมาณ 2 ซม. จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงภายในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทั้งสองชนิดได้ หลังจากนำ *B. subtilis* NSRS 89-24 มาเลี้ยงร่วมกับเชื้อราทั้งสองเป็นเวลา 2 วัน โดยจะสังเกตเห็นบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ระหว่างเชื้อรากับเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และบริเวณปลายของเส้นใยของเชื้อราจะไม่มีเส้นใยอ่อนเจริญงอกออกมาเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยด้านที่ไม่อยู่ใกล้ *B. subtilis* NSRS 89-24 (รูปที่ 5A และ 6A) ซึ่งใช้เป็นบริเวณควบคุม การเจริญของเส้นใยราถูกยับยั้งอาจเป็นผลจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสารปฏิชีวนะปล่อยลงไปในวุ้นอาหาร ดังนั้นเมื่อนำเส้นใยบริเวณที่มีการยับยั้งมาย้อมด้วยน้ำยา lactophenol cotton blue และตรวจดูลักษณะของเส้นใยราด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยราส่วนใหญ่มีลักษณะโป่งพอง (รูปที่ 5B และ 6B) และมีการรั่วของไซโตพลาสม (cytoplasm) ของเซลล์ออกมาในบางส่วนในขณะที่เส้นใยราบริเวณอื่นๆจะมีรูปร่างลักษณะและขนาดที่ปกติทั่วไป (รูปที่ 5C และ 6C)

3.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24

ทำการศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงในฟลาสค์ขนาด 500 มล. ซึ่งบรรจุ อาหารเหลว ปริมาตร 100 มล. อาหารที่ใช้คือ PDB CDB และ NB เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วที่ 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วันนำอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 แต่ละชนิด มาปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อขจัดเซลล์แบคทีเรียทิ้ง และนำส่วนเหลวใสของน้ำเลี้ยงเชื้ออาหารเหลวแต่ละชนิดมาผสมกับอาหาร PDA ในอัตราส่วน 100 มล.: 3.9 กรัม เพื่อเตรียมวุ้นอาหาร PDA นำเชื้อรา *P. grisea* และ

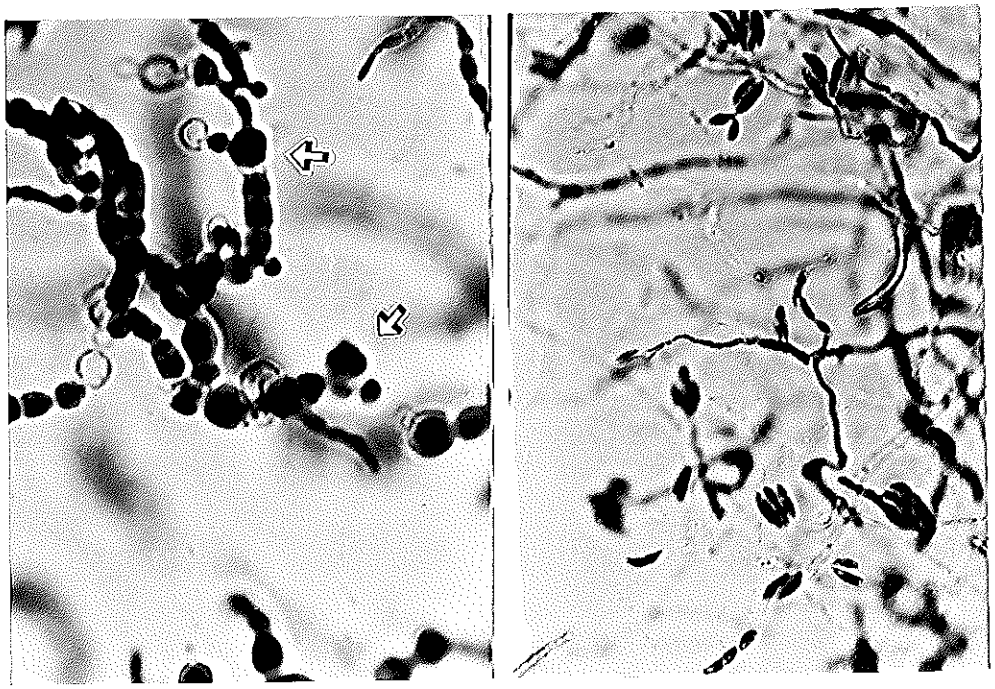
(A)

(B)

(C)

รูปที่ 5 ปฏิกริยาระหว่าง *B. subtilis* NSRS 89-24 กับ *P. grisea* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยรา บริเวณยับยั้งมีลักษณะโป่งพองตามศรชี้(B) และเส้นใยราปกติ (C)ที่กำลังขยาย 400 เท่า

(A)



(B) (C)

รูปที่ 6 ปฏิกริยาระหว่าง *B. subtilis* NSRS 89-24 กับ *R. oryzae* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยรา บริเวณยับยั้งมีลักษณะโป่งพองตามศรชี้(B) และเส้นใยราปกติ (C)ที่กำลังขยาย 400 เท่า

R. oryzae ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. มาเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราและคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ผลการทดลองพบว่าอาหาร PDB ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคืออาหาร CDB และ NB ตามลำดับ โดยพบว่าอาหาร PDB และ CDB นั้นมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของ *P. grisea* ทำให้ขนาดโคโลนีของ *P. grisea* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เตรียมจากน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารทั้งสองชนิดแตกต่างจากจานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 87.29 และ 32.11 ตามลำดับ สำหรับน้ำเพาะเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ใน NB นั้นไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. grisea* (ตารางที่ 5 และ รูปที่ 7) สำหรับของ *R. oryzae* นั้นถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะที่ *B. subtilis* NSRS 89-24 ผลิตขึ้นในอาหารทั้งสามชนิดคือ PDB CDB และ NB อย่างมีนัยสำคัญด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 98.42 , 77.03 และ 53.85 ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และ รูปที่ 8) สรุปได้ว่าสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยราของทั้ง *P. grisea* และ *R. oryzae* ได้

3.3 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด

เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *B.subtilis* NSRS 89-24 ให้ได้สารปฏิชีวนะปริมาณสูงสุด สามารถทำการทดลองได้โดยเติมหัวเชื้อ *B.subtilis* NSRS 89-24 ปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ลงในฟลาสค์อาหารเหลว PDB ซึ่งเป็นอาหารที่ให้ผลการผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุดจากผลการทดลองในข้อที่ 2 ปริมาตร 100 มล.จำนวน 7 ขวด แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C จากนั้นจึงทำการเก็บอาหาร PDB ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 จนครบ 7 วัน นำมาปั่นที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกไป นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสของแต่ละวันซึ่งมีสารปฏิชีวนะผสมอยู่มาทำการทดลอง โดยผสมกับอาหาร PDA ในอัตราส่วน 100 มล.ต่ออาหารเลี้ยง 3.9 กรัม เพื่อเตรียมทดสอบ แล้วจึงวางเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ที่มีขนาด 5 มม. ลงไปบนจานอาหารดังกล่าวบ่มเลี้ยงต่อที่ อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 วันทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีรา เทียบกับชุดควบคุมและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ผลการทดลองพบว่ามีการสร้างสารปฏิชีวนะตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้จากขนาดโคโลนีทั้งของ *P. grisea* และ *R. oryzae* เล็กกว่าในจานควบคุม (รูปที่ 9 และ10) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 81.29 และ 98.42 ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อมากขึ้นเชื้อราทั้ง 2 จะถูกยับยั้งมากขึ้นด้วย (รูปที่ 11)

ตารางที่ 5 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. grisea*

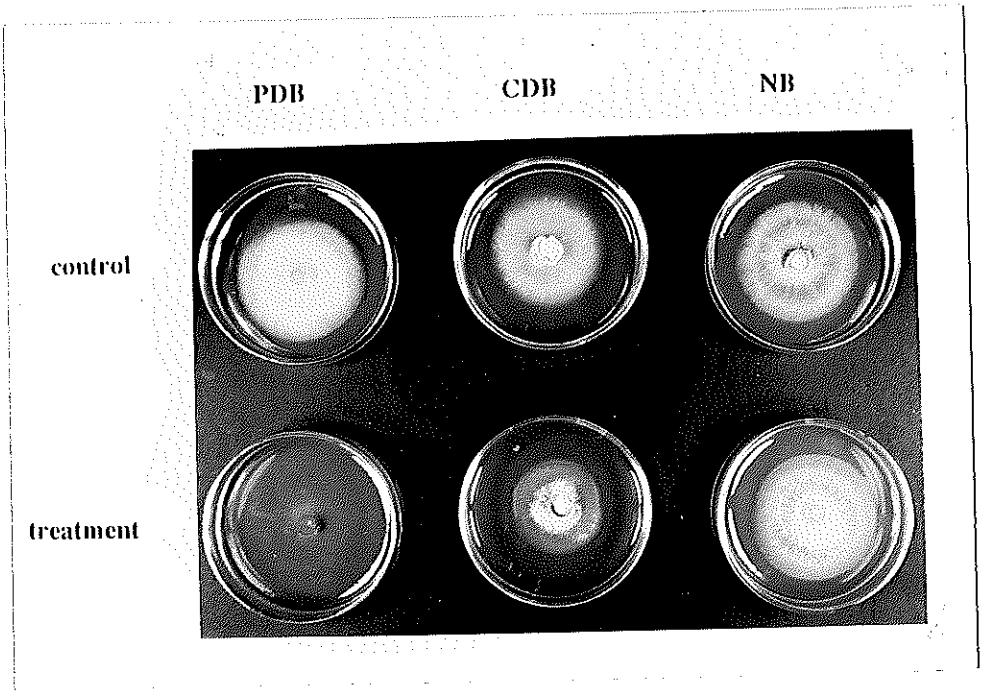
ชนิดของอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อรา (มม.) ± SD		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
NB	35.18 ± 0.12 a	34.75 ± 0.08 a	2.43
CDB	32.95 ± 0.14b	27.15 ± 0.14 b	32.11
PDB	36.15 ± 0.29 a	12.53 ± 0.14 c	87.29

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.01

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.05

CV = 0.7 %



รูปที่ 7 การเจริญของเชื้อ *P. grisea* ในอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตจาก *B.subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB (ซ้าย) CDB (กลาง) และ NB (ขวา) ตามลำดับ แถวบนเป็นชุดควบคุม แถวล่างเป็นชุดทดสอบ

PDB คือ Potato dextrose broth , CDB คือ Czapex dox broth , NB คือ Nutrient broth

ตารางที่ 6 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *R. oryzae*

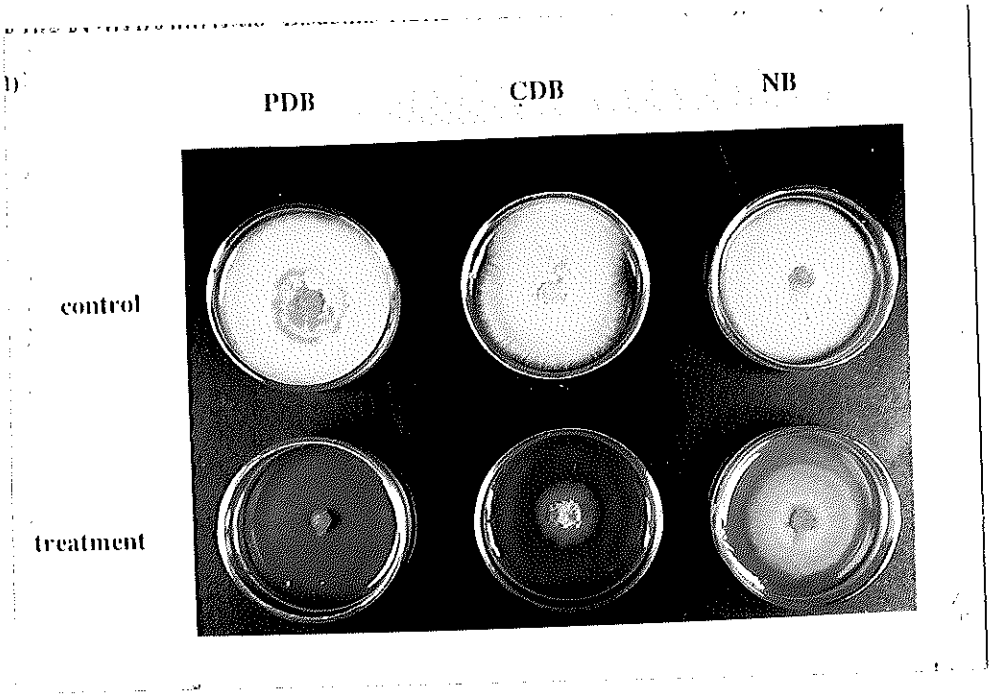
ชนิดของอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อรา (มม.) ± SD		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
NB	46.33 ± 0.12 a	32.83 ± 0.85 b	53.85
CDB	46.17 ± 0.85 a	22.13 ± 0.51 c	77.03
PDB	48.70 ± 0.22 a	6.12 ± 0.20 d	98.42

หมายเหตุ

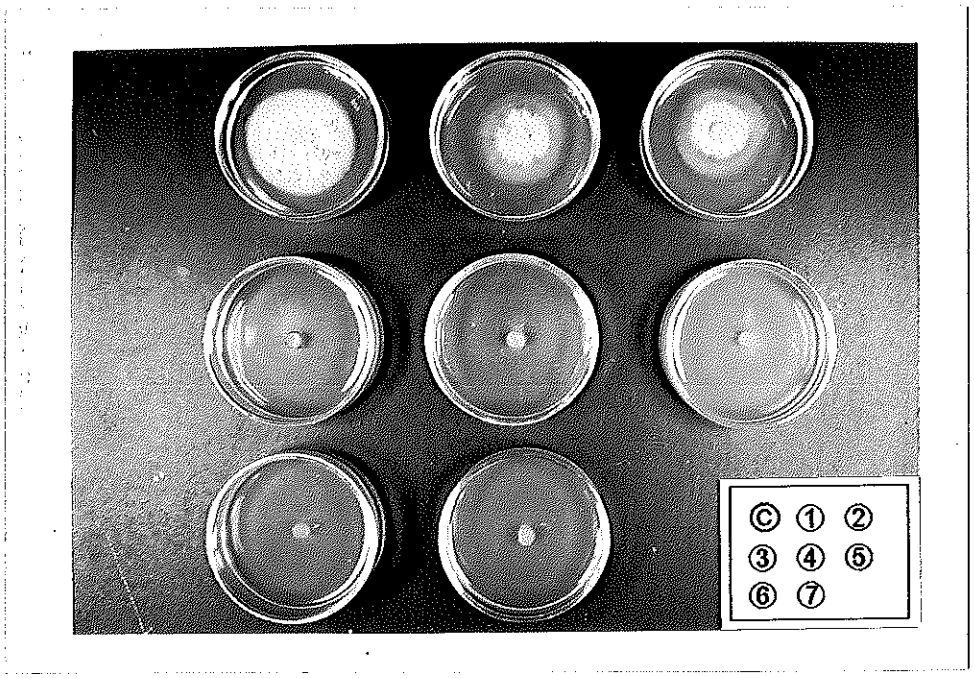
ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.01

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.05

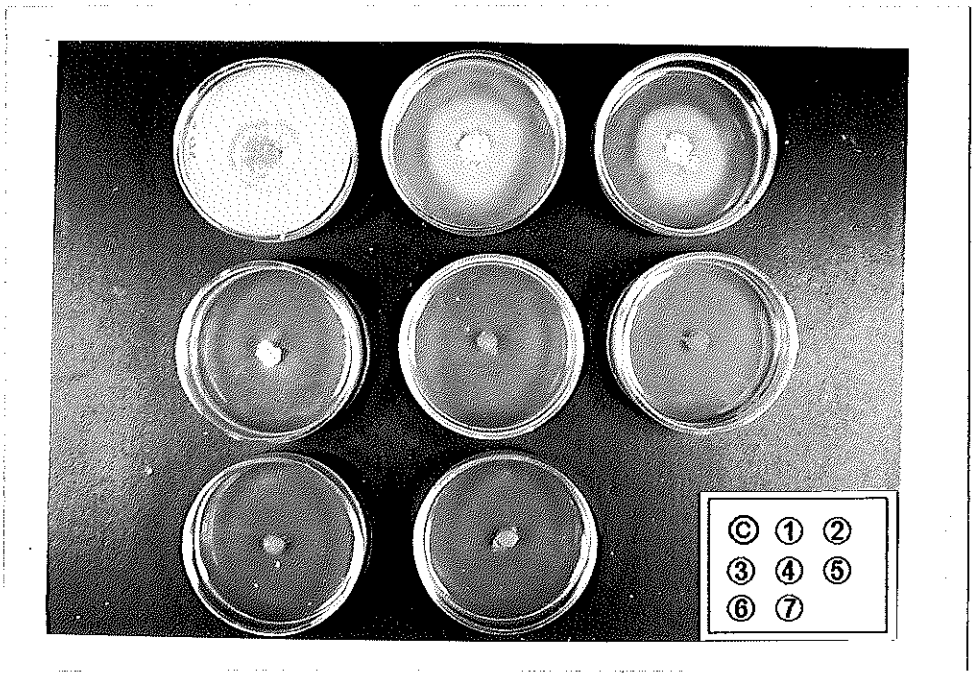
CV = 2.0 %



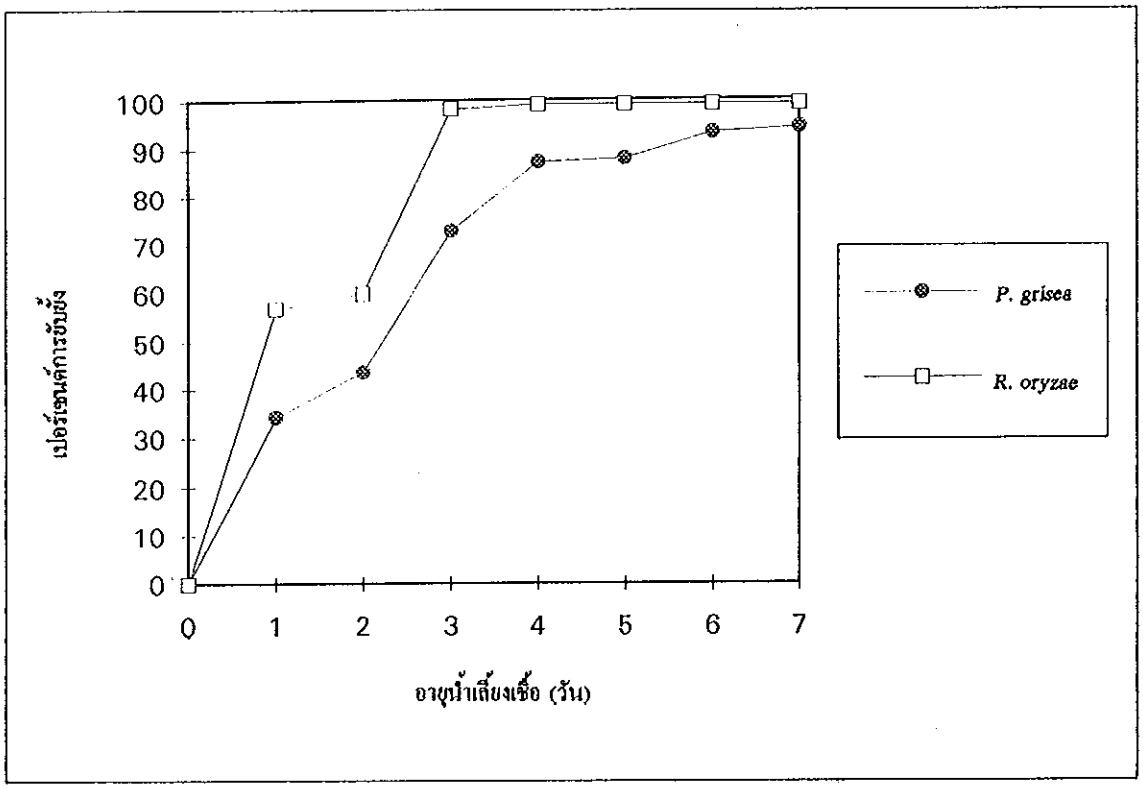
รูปที่ 8 การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* ในอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตจาก *B.subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB (ซ้าย) CDB (กลาง) และ NB (ขวา) ตามลำดับ แถวบนเป็นชุดควบคุม แถวล่างเป็นชุดทดสอบ



รูปที่ 9 การเจริญของเชื้อ *P. grisea* ในอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะซึ่งได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB 1-7 วัน , (1) - (7) และจานควบคุม (c) เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 10 การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* ในอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะซึ่งได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB 1-7 วัน , (1) - (7) และจานควบคุม (c) เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB เพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae*

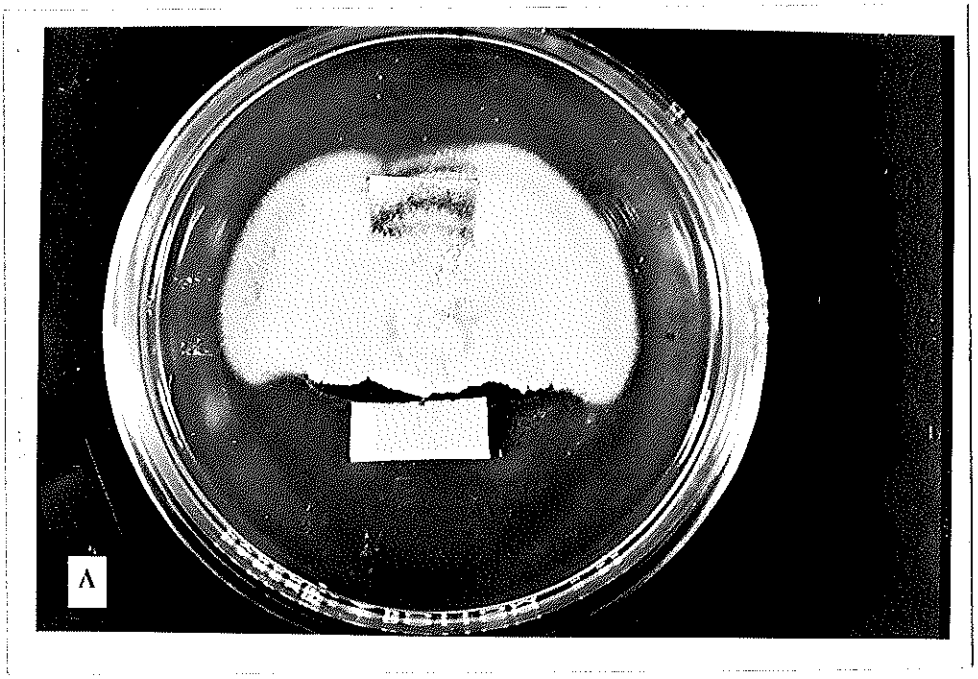
ระดับการยับยั้งสูงเพิ่มขึ้นมากในวันที่ 3 ของอายุ *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยที่ *P. grisea* และ *R. oryzae* ถูกยับยั้งคิดเป็น 86 และ 98.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และยับยั้งได้สมบูรณ์เมื่ออายุของ *B. subtilis* NSRS 89-24 คือ 4 วัน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด

3.4 ผลการสกัดสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 และการทดสอบฤทธิ์ต้านรา

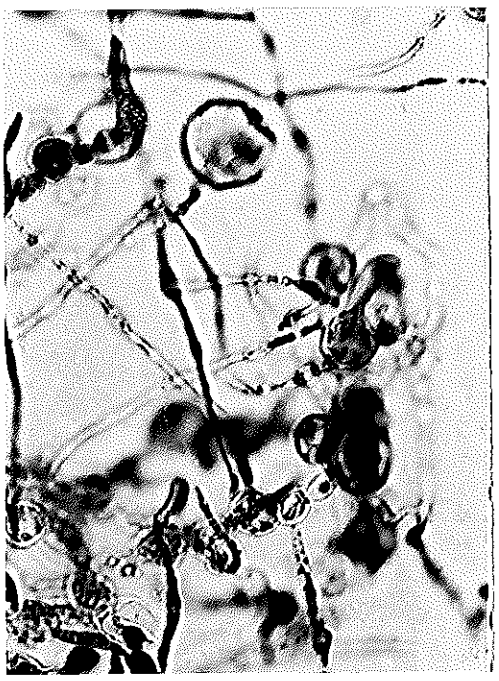
จากผลการทดลองในข้อ 3.2 และ 3.3 พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 เพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุดคือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 5 วัน จึงได้ทำการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงในอาหาร PDB บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงนำมาปั่นเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกไป นำส่วนเหลวใสมาสกัดสารปฏิชีวนะตามวิธีการ McKeen และคณะ (1986) นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้ง พบว่าจากน้ำเลี้ยงเชื้อ PDB จำนวน 1 ลิตร สามารถสกัดสารปฏิชีวนะได้ในปริมาณ 210 มก. (น้ำหนักแห้ง) คิดเป็นผลผลิต 0.021 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักสาร /ปริมาตรเชื้อ) ลักษณะของสารปฏิชีวนะมีสีน้ำตาล และเสถียรทนต่อความร้อนได้สูง โดยสามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปผสมกับอาหารสำหรับทดสอบและยังคงแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ และละลายได้ดีใน 80 % เอทธานอล เมื่อนำสารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้น 20 มก./มล. ปริมาตร 200 µl มาหยดบนแผ่นกระดาษกรองเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านรากับเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสองได้ดีเหมือนการทดสอบด้วยตัวเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (รูปที่ 12) เปรียบเทียบกับ (รูปที่ 5) โดยที่บริเวณของการยับยั้งยังคงมีอยู่แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงจานทดสอบไว้นานถึง 3 สัปดาห์

3.5 ผลของสารปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเส้นใยของเชื้อรา

เมื่อทำการตัดเส้นใยของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* บริเวณปลายสุดของโคโลนีของเชื้อราที่ได้รับสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 มาย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue และนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าส่วนปลายสุดของเส้นใยเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* มีลักษณะโป่งพอง อีกทั้งเส้นใยยังเกิดการบวมที่ผิดปกติ ผนังเซลล์บางลง บางส่วนย้อมไม่ติดสี lactophenol cotton blue (รูปที่ 12B และรูปที่ 13B) แตกต่างจากเส้นใยในด้านที่ไม่มี *B. subtilis* NSRS 89-24 ซึ่งมีรูปร่างลักษณะปกติอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 12C และรูปที่ 13C) ลักษณะที่



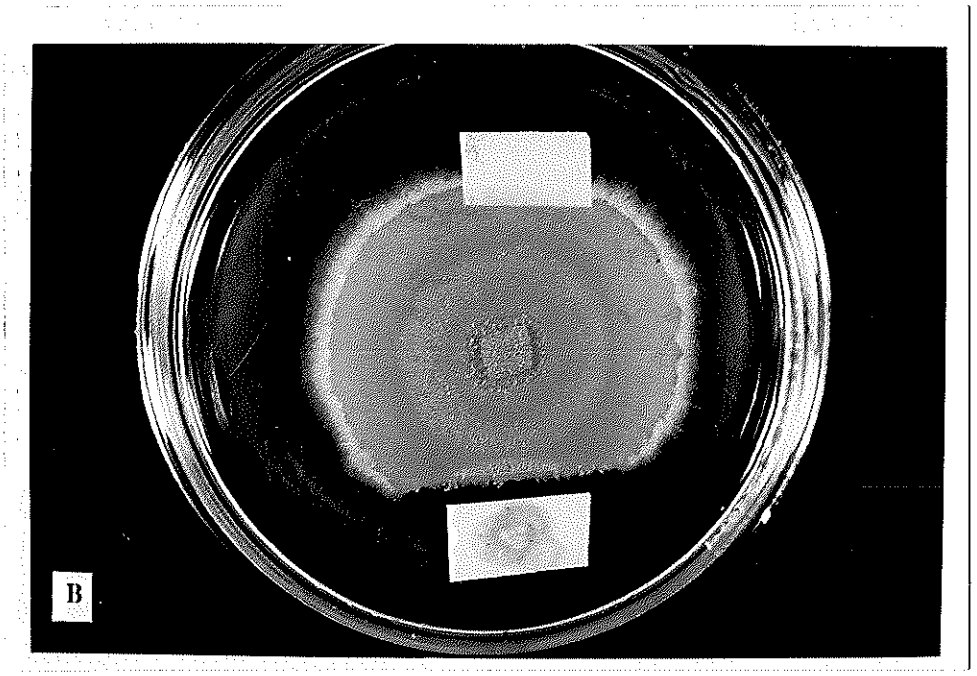
(A)



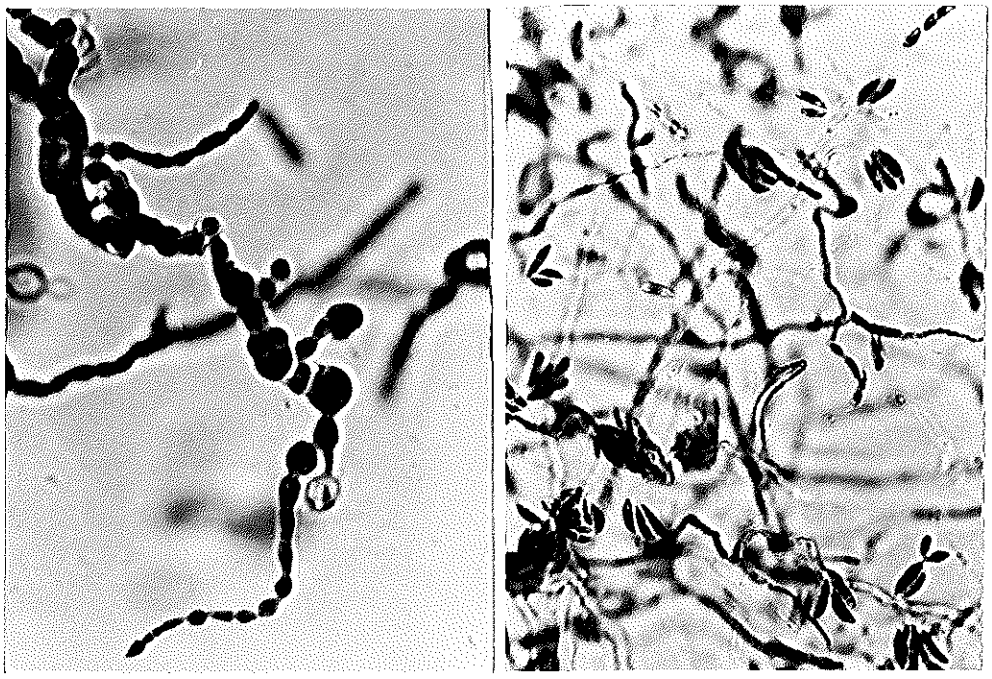
(B)

(C)

รูปที่ 12 การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารสกัดจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Agar disc diffusion ต่อเชื้อ *P. grisea* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยราบริเวณยับยั้ง (B) และเส้นใยราปกติ (C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



(A)



(B) (C)

รูปที่ 13 การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารสกัดจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Agar disc diffusion ต่อเชื้อ *R. oryzae* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยราบริเวณยับยั้ง (B) และเส้นใยราปกติ (C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ผิดปกตินี้เป็นไปในลักษณะเดียวกับเส้นใยจากบริเวณยับยั้งที่ทดสอบด้วยตัวเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (รูปที่ 5B, 5C และ รูปที่ 6B, 6C) แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะที่สกัดได้นั้นเป็นสารหลักในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* ของ *B. subtilis* NSRS 89-24

3.6 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24

จากการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงในอาหาร 3 ชนิดคือ PDA CDA และ NA แล้วนำมาประกบกับจานอาหาร PDA ซึ่งเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* โดยให้จานเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดอยู่ด้านล่างของจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ปิดจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองด้วยแผ่นพาราฟิล์มนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองเมื่อทดสอบกับเชื้อ *P. grisea* พบว่า *P. grisea* ถูกยับยั้งการเติบโตโดยสารระเหยที่ *B. subtilis* NSRS 89-24 ผลิตขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด ขนาดโคโลนีของ *P. grisea* ในชุดทดสอบทั้ง 3 ชุดมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญโดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดคือ PDA และ CDA ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งใกล้เคียงกันคือ 89.11 และ 85.86 ตามลำดับ สำหรับ NA ให้ผลการยับยั้งที่ต่ำสุดเพียง 57.72 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7 และรูปที่ 14) และเมื่อทดสอบกับเชื้อ *R. oryzae* ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน อาหารที่ดีที่สุดคือ PDA และ CDA รองลงมาได้แก่ NA โดยมีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเท่ากับ 95.80, 95.60 และ 39.73 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 8 และ รูปที่ 15)

3.7 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเจริญของเส้นใยรา

3.7.1 ผลต่อการเจริญของเส้นใยรา *P. grisea* และ *R. oryzae*

เมื่อนำจานเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* (ก้อนเชื้อราที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม.) มาประกบกับจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เป็นเวลา 5 วัน พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 จะผลิตสารชนิดระเหยออกมายับยั้งการเจริญของเส้นใยราทั้งสองได้เป็นอย่างดี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราไม่เปลี่ยนแปลงไปจากทดลองในวันที่ 1 และ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.18 ± 0.37 และ 8.45 ± 0.36 มม. ตามลำดับ แต่เมื่อแยกจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ออกไป และทำการเพาะเลี้ยงเฉพาะเชื้อราต่ออีกเป็นเวลา 2 วัน พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ที่เคยสัมผัสสารระเหยมีขนาดเพิ่มขึ้นจากเดิมอย่างมีนัยสัมคัญ (P=0.01) คือ 19.78 ± 0.45 และ 14.12 ± 0.42 มม. ตามลำดับ (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะชนิดระเหยนี้มีฤทธิ์เพียงการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราแบบชั่วคราวเท่านั้น

ตารางที่ 7 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *P. grisea*

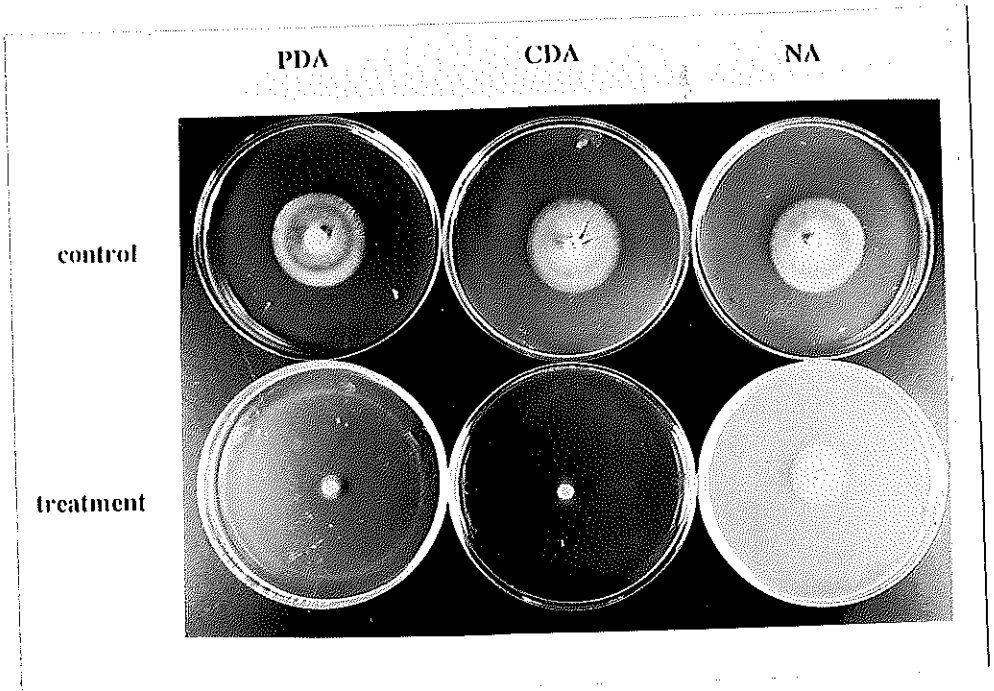
ชนิดของอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อรา (มม.) ± SD		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
NB	36.48 ± 0.05 a	23.72 ± 0.83 b	57.72
CDB	36.38 ± 0.12 a	13.68 ± 0.31 c	85.86
PDB	36.28 ± 0.09 a	11.97 ± 0.84 d	89.11

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.01

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.05

CV = 2.7 %



รูปที่ 14 การเจริญของเชื้อ *P. grisea* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้รับจากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDA (ซ้าย) CDA (กลาง) และ NA (ขวา) (แถวบนเป็นชุดควบคุม แถวล่างเป็นชุดทดสอบ)

ตารางที่ 8 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *R. oryzae*

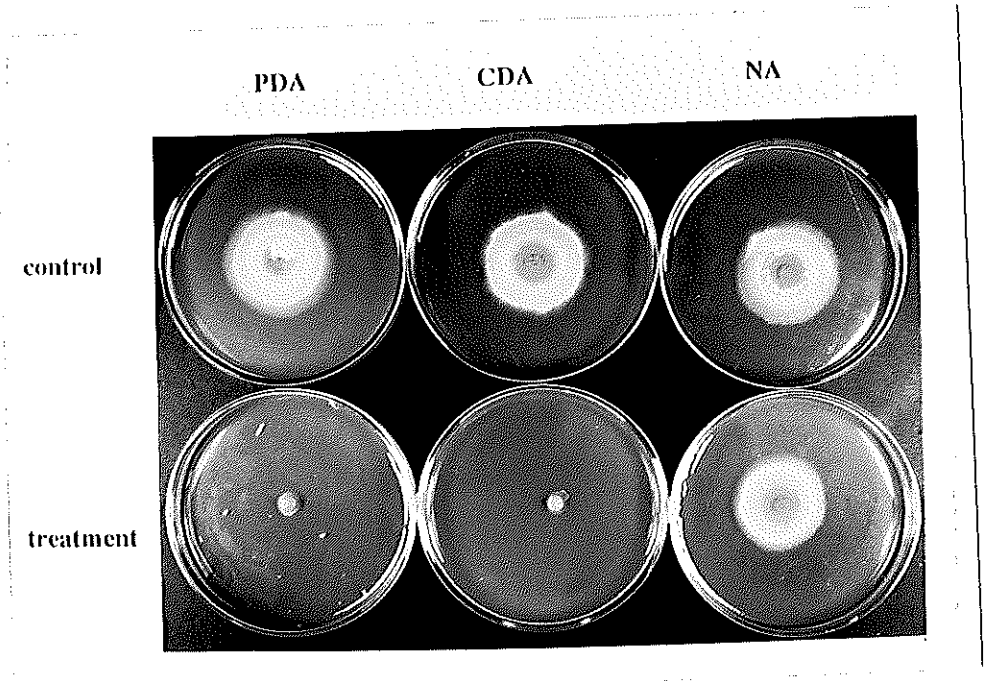
ชนิดของอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อรา (มม.) ± SD		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
NB	41.85 ± 0.40 a	32.28 ± 2.90 b	39.73
CDB	41.38 ± 0.17 a	8.45 ± 0.36 c	95.6
PDB	41.60 ± 0.23 a	8.73 ± 0.42 c	95.8

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.01

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.05

CV = 5.2 %



รูปที่ 15 การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้รับจากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDA (ซ้าย) CDA (กลาง) และ NA (ขวา) (แถวบนเป็นชุดควบคุม แถวล่างเป็นชุดทดสอบ)

ตารางที่ 9 การเจริญของเส้นใยราหลังจากที่สัมผัสกับสารผลิตชนิดระเหยแล้ว

อายุของเชื้อรา (วัน) หลังจากที่สัมผัสกับสารผลิตชนิดระเหย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเชื้อราที่ทดสอบ (มม.)	
	P. grisea	*R. oryzae*
0	12.18 ± 0.37 a	8.45 ± 0.36 a
1	14.67 ± 0.27 b	11.43 ± 0.34 b
2	19.78 ± 0.45 c	14.12 ± 0.42 c

หมายเหตุ

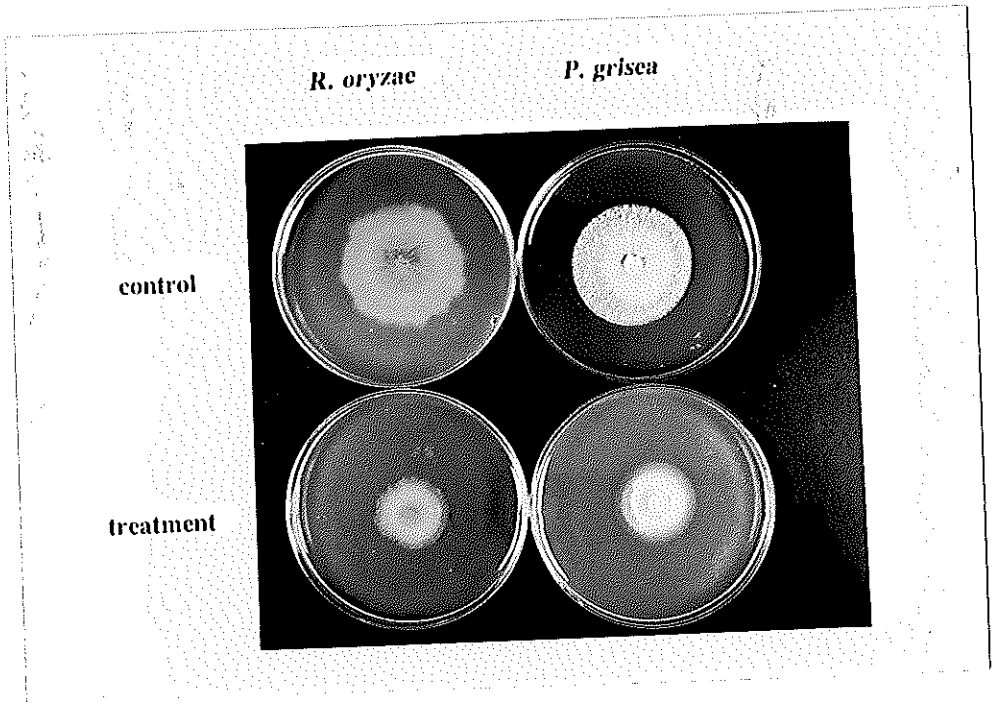
ตัวอักษรในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์(คือa, b และ c) หมายความว่าค่าที่ตัวอักษรกำกับอยู่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.05

ตารางที่ 10 ผลของสารปฏิชีวนะชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่มีอายุ 2 วัน

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (มม.)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
P. grisea	48.53 ± 0.47 a	28.28 ± 0.25 b	66.04
R. oryzae	47.78 ± 0.51 a	28.68 ± 0.16 b	63.97

หมายเหตุ

ตัวอักษรในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์(คือa, b,และ c) หมายความว่าค่าที่ตัวอักษรกำกับอยู่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.05



รูปที่ 16 การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* (ซ้าย) และ *P. grisea* (ขวา) ในอาหาร PDA ที่มีอายุ 2 วัน ก่อนที่จะนำมาประกบกับจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้รับจากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน (แถวบนเป็นชุดควบคุม แถวล่างเป็นชุดทดสอบ)

สำหรับการทดสอบกับเชื้อราที่เจริญแล้วโดยทำการเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* มาก่อนเป็นเวลา 2 วันจนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของ *P. grisea* และ *R. oryzae* มีขนาดเท่ากับ 17.2 และ17.8 มม.ตามลำดับก่อนนำมาประกบกับจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน พบว่าสารผลิตชนิดระเหยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยที่มีการเจริญมาแล้วได้ (รูปที่ 16) โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ได้ใกล้เคียงกันคือ 66.04 และ 63.97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 10) แต่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะต่ำกว่าการทดสอบกับเชื้อที่เริ่มเพาะเลี้ยงใหม่ๆ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราเริ่มต้น 5 มม.) ซึ่งถูกยับยั้งได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7 และ 8)

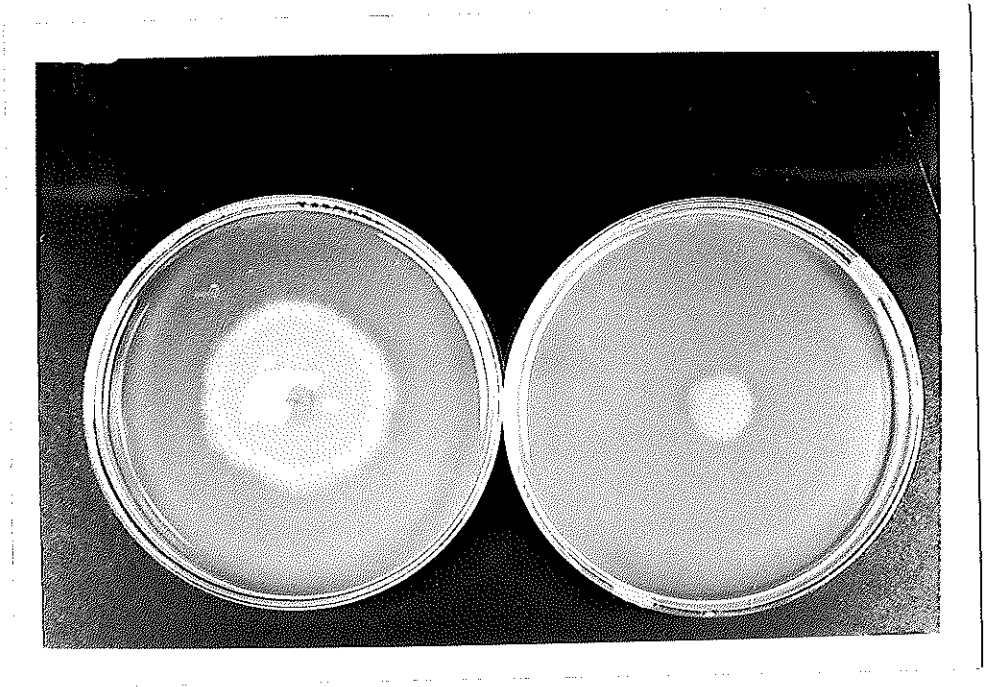
3.7.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารผลิตชนิดระเหยจากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไป

B. subtilis ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้มาจากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา และไม่มีประวัติว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชหรือผลิตสารชนิดระเหย เมื่อนำมาทดสอบพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไปนี้ สามารถสร้างสารระเหยที่มีฤทธิ์ต้านราได้ (รูปที่ 17,18 และ ตารางที่ 11) โดยมีค่าการยับยั้งต่อเชื้อ *P. grisea* และ *R.oryzae* เท่ากับ 28.44 และ 82.98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* ทั่วไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea* ได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งต่ำกว่าสารระเหยที่ผลิตโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 มาก แต่ผลต่อ *R.oryzae* นั้น ให้ผลการยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน

3.7.3 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเจริญของเชื้อ *R. solani*

การทดสอบความสามารถของสารผลิตชนิดระเหยจากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* โดยหลังจากประกบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. solani* พร้อมกับจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เป็นเวลา 2 วันมาแล้วพบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solani* ได้ดี (รูปที่ 19) โดยให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 93.49 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12) ในขณะที่ถ้ามีการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89 -24 มาก่อนเป็นเวลา 1 วันก่อนประกบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. solani* จะพบว่าเชื้อ *R. solani* จะถูกยับยั้งได้ดีกว่าการประกบเชื้อราพร้อมกับเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89 -24 จะไม่พบว่ามีเส้นใยงอกจากก้อนเชื้อตั้งต้นเลย (รูปที่ 20) ค่าการยับยั้งที่คำนวณได้เท่ากับ 98.97 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12) แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89 -24 มาก่อน 1 วัน ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่ สามารถผลิตสารชนิดระเหยได้ทันทีเมื่อนำมาประกบกับเชื้อราทดสอบทำให้เห็นผลการยับยั้งได้ชัดเจนกว่าการ

รูปที่ 17 การเจริญของเชื้อ *P. grisea* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้รับจากการเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไปในอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน (ซ้ายเป็นชุดควบคุม ขวาเป็นชุดทดสอบ)



รูปที่ 18 การเจริญของเชื้อ *R. oryzae* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยซึ่งได้รับจากการเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไปในอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน (ซ้ายเป็นชุดควบคุม ขวาเป็นชุดทดสอบ)

รูปที่ 19 การเจริญของเชื้อ *R. solani* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDA โดยประกบพร้อมกัน (แถวบนชุดควบคุมแถวล่างชุดทดสอบ)

รูปที่ 20 การเจริญของเชื้อ *R. solani* ในอาหาร PDA ภายใต้สารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วันในอาหาร PDA ก่อนประกบจาน (แถวบนชุดควบคุม แถวล่างชุดทดสอบ)

ตารางที่ 11 ผลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไปต่อการผลิตสารผลิตชนิดระเหย

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา(มม.)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
P. grisea	36.15 ± 0.24 a	30.58 ± 1.16 b	28.44
R. oryzae	36.97 ± 0.13 a	15.25 ± 0.88 b	82.98

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถว(คือ a,b) หมายความว่าค่าที่ตัวอักษรกำกับอยู่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.05

ตารางที่ 12 ผลของสารผลิตชนิดระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการเจริญของเชื้อ *R. solani*

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (มม.)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
R. solani/ *B. subtilis* NSRS 89-24 เลี้ยงพร้อมกัน	90.00 ± 0.00	22.95 ± 0.61	93.49
R. solani/ *B. subtilis* NSRS 89-24 (อายุ 1 วัน)	90..00 ± 0.13	9.13 ± 0.70	98..97

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียพร้อมกับเชื้อรา

3.7.4 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

จากการศึกษาจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยราโดยการตัดเส้นใยของเชื้อ *P. grisea* *R. oryzae* และ *R. solani* จากบริเวณขอบนอกของโคโลนีที่สัมผัสสารผลิตชนิดระเหยโดยไม่มีการแผ่ของเส้นใยออกไปแล้ว นำมาย้อมด้วย lactophenol cotton blue แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเชื้อราทั้งสามเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.7.5 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae*

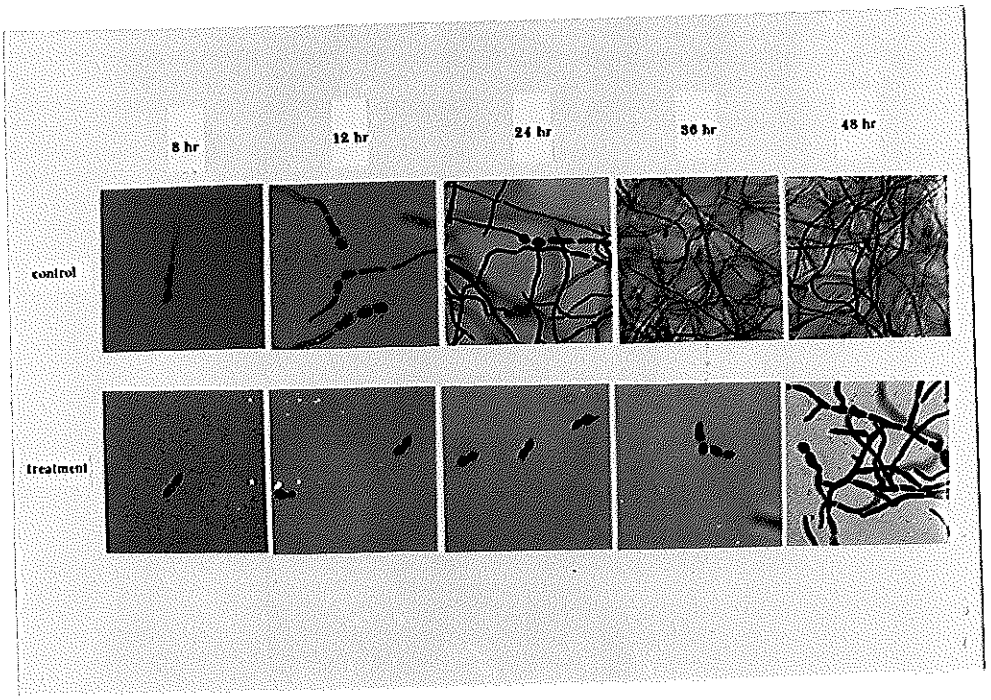
จากการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 วัน ก่อนประกบกับจานอาหาร PDA ที่เกลี่ยสารละลายแขวนลอยของสปอร์เชื้อราที่มีจำนวนสปอร์ 10^5 สปอร์/มล. จำนวน 200 µl ปิดจานทั้งสองด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 8, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ทำการเปิดจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ออกไปแล้ว นำจานอาหารที่มีสปอร์ของ *R.oryzae* มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (เพื่อนับจำนวนสปอร์งอกและคำนวนเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ผลการทดลอง (ตารางที่13) พบว่าในช่วง 36 ชั่วโมงแรกนั้น สปอร์ในชุดทดสอบมีการงอกน้อยมากเพียงประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่สปอร์ของชุดควบคุมงอกได้หมด 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *R. oryzae* ได้ดี นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของสปอร์อย่างชัดเจน โดยสปอร์มีลักษณะบวมผิดปกติมาก (รูปที่ 21) เมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ของชุดควบคุมแต่หลังจาก 36 ชั่วโมง เป็นต้นไปแล้วจะพบว่าสปอร์ยังคงสามารถงอกได้ตามปกติ แต่ลักษณะของเส้นใยที่งอกจากสปอร์หลังจากสัมผัสกับสารชนิดระเหยในชั่วโมงที่ 48 มีความผิดปกติแตกต่างจากในชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจนตรงเส้นใยของราที่สัมผัสสารชนิดระเหยมีขนาดสั้นและใหญ่กว่า

3.7.6 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกของเม็ด sclerotium ของเชื้อ *R. solani*

จากการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงในจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นประกบกับจานอาหาร PDA ซึ่งเลี้ยงเม็ด sclerotium ของ *R. solani* ขนาด 2 มม. จำนวน 3 เม็ดต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ ปิดจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองเข้าด้วยกันแล้วพันด้วยแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการงอกของเม็ด sclerotium ทุกวัน พบว่าเม็ด sclerotium ในจานอาหารที่ประกบกับ *B. subtilis* NSRS 89-24 นั้นไม่มีการงอกเป็นเส้นใย จนกระทั่งถึงวันที่ 3 ของการทดลอง ในขณะที่เม็ด sclerotium ในชุดควบ

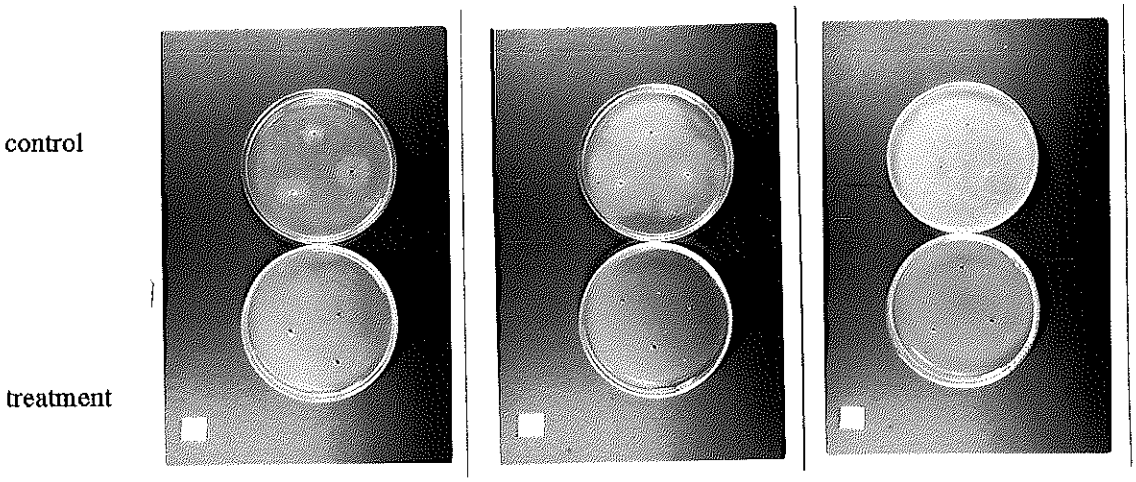
ตารางที่ 13 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกของสปอร์ *R. oryzae* ในเวลาต่างๆกัน

เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์		
เวลา(ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
8	78	2
12	99	3
24	100	3
36	100	3
48	100	100



รูปที่ 21 การงอกของสปอร์ของเชื้อ *R.oryzae* ในอาหาร PDA ภายใต้การสัมผัสสารชนิดระเหยจากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วัน ในอาหาร PDA ระยะเวลา 8-48 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400 เท่า

คุมงอกเป็นเส้นใยตั้งแต่วันที่ 1 และในวันที่ 3 นั้น เส้นใยเจริญจนเต็มจานอาหาร แสดงว่าสารผลิตชนิดระเหยที่ *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสามารถยับยั้งการงอกของเม็ด sclerotium ได้อย่างดี (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 การงอกของ sclerotium ของ *R. solani* บนในอาหาร PDAในเวลาต่างๆกัน เมื่อสัมผัสกับสารชนิดระเหยผลิตโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วัน ในอาหาร PDA (บนเป็นจานควบคุม ล่างเป็นจานทดสอบจากซ้ายไปขวาอายุ 1, 2 และ 3 วัน ตามลำดับ)

4. วิจารณ์

4.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านราของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อ *P. oryzae* และ *R. oryzae* พบว่าเกิดบริเวณยับยั้งขึ้นระหว่างเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 กับเชื้อราทั้งสองแสดงให้เห็นถึงความสามารถของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในการปลดปล่อยสารที่มีฤทธิ์ต้านราบางอย่างออกมา การยับยั้งเริ่มปรากฏชัดเจนเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 นาน 2 วัน โคโลนีของเชื้อรามีสีเข้มขึ้นมากเมื่อเวลาผ่านไปหลายวันซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวเป็นระยะที่เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 อยู่ในภาวะของการสร้างสปอร์ ดังนั้นกระบวนการปฏิปักษ์น่าจะเกี่ยวข้องกับการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) มากกว่าสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) (Blakeman และ Fokkeman, 1982) และการเกิดบริเวณการยับยั้งแสดงให้เห็นว่าสารต้านราที่ *B. subtilis* NSRS 89-24 หลั่งออกมานั้นมีคุณสมบัติในการละลายน้ำสามารถแพร่ซึมเข้าไปในวุ้นอาหารได้ซึ่งเป็นข้อสังเกตขั้นต้นที่จะช่วยให้มีการสกัดสารดังกล่าวออกมาศึกษาทั้งนี้สังเกตได้จากขอบเขตของการยับยั้งเชื้อราที่เป็นบริเวณกว้าง จากการศึกษาวิจัยส่วนใหญ่พบว่ากระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะเป็นกลไกหลักของ *B. subtilis* ที่สามารถต้านราชนิดต่างๆ (Ferreira และคณะ, 1991, Baker และคณะ, 1985, McKeen และคณะ, 1986) นอกจากนี้ Katz และ Demain (1977) พบว่า *B. subtilis* มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะประเภทเปปไทด์ได้ไม่น้อยกว่า 68 ชนิด

สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* และปล่อยออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อนำมาทดสอบพบว่ามีฤทธิ์ต้านรา (Phae และคณะ, 1992 และ Frereira และคณะ, 1991) กระบวนการหลั่งเอนไซม์เพื่อยับยั้งการแพร่หรือรุกรานจากเชื้อราโรคพืชก็อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืช (Sinclair, 1989)

ขอบเขตของการยับยั้งเชื้อ *P. grisea* ด้านที่อยู่ตรงข้ามกับเชื้อ *B. subtilis* มีลักษณะเป็นเส้นตรงและกว้างกว่าขอบเขตการยับยั้งเชื้อ *R. oryzae* ซึ่งมีลักษณะเป็นรัศมีครึ่งวงกลมและแคบกว่าแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. oryzae* มีความว่องไวต่อสารปฏิชีวนะมากกว่าเชื้อ *R. oryzae* สารปฏิชีวนะที่พบว่าสร้างจาก *B. subtilis* และเข้าไปเกี่ยวข้องในกระบวนการยับยั้งเชื้อราโรคพืช

ชนิดต่างๆ ที่เคยรายงานตัวอย่างเช่น fengecin ควบคุม *R. solani* (Tschen, 1987) piplastin ควบคุม *Colletotrichum trifolii* (Yamada และคณะ, 1990) และ iturin ควบคุมเชื้อราโรคพืชหลายชนิด (Douville และ Boland, 1987) เป็นต้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารปฏิชีวนะที่ได้รับจากการทดลองนี้อาจเป็นสารตัวใดตัวหนึ่งหรือหลายตัวรวมกันในการออกฤทธิ์ต้านรา *P. grisea* และ *R. oryzae*

4.2 การศึกษาการผลิตและฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24

จากการศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร NB CDB และ PDB พบว่าอาหาร PDB เป็นอาหารที่ช่วยส่งเสริมหรือชักนำให้ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีการผลิตสารปฏิชีวนะมากที่สุด รองลงมาคือ CDB และ NB ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Rytter และคณะ (1989) ซึ่งแสดงให้ทราบว่าอาหารจะมีผลต่อกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะ และอาหาร NB เป็นอาหารที่ส่งเสริมให้ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีการผลิตสารปฏิชีวนะได้น้อย ขณะที่ Pusey และ Wilson (1984) พบว่าหากนำอาหาร NB มาผสมกับ Yeast extract แล้วจะช่วยให้ *B. subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะได้ดีกว่าอาหาร NB มาก ซึ่งการทดลองของ Ferreira และคณะ (1991) ก็ได้ผสม Yeast extract ลงในอาหาร CDB เพื่อช่วยให้ผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามหากพิจารณาธาตุอาหารที่อยู่ในอาหาร Yeast extract เพียงธาตุเดียวจะพบว่าแหล่งธาตุที่สำคัญคือไนโตรเจน (N) จะมีปริมาณมากกว่าที่อยู่ในอาหาร NB ดังนั้นธาตุอาหารไนโตรเจนน่าจะมีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะ และจากการทดลองของ Pusey และ wilson (1984) พบว่าอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบมักไม่ค่อยพบการผลิตสารปฏิชีวนะ

Sandrin และคณะ (1990) รายงานว่าแม้อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสารอาหารซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบแต่จะต้องอยู่ในรูปที่ง่ายต่อกระบวนการเมตาบอลิสมเพื่อนำไปใช้ การทดลองนี้พบว่า *B. subtilis* จะสร้างสารปฏิชีวนะได้มากในอาหาร PDB ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาหาร PDB น่าจะมีแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปที่สามารถนำไปใช้ได้ดีกว่าอาหาร CDB และ NB จึงทำให้มีการสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีกว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ PDB ในช่วงเวลา 1-5 วัน ผลการทดลองพบว่าสารปฏิชีวนะเริ่มผลิตปริมาณมากในช่วงวันที่ 3 ต่อจากนั้นปริมาณเริ่มจะคงที่ สารปฏิชีวนะที่ได้จากการทดลองนี้อาจมีมากกว่าหนึ่งชนิดและแต่ละชนิดก็อาจจะผลิตออกมาในช่วงเวลาที่แตกต่างกันได้ ส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะจาก

B. subtilis มักจะถูกสร้างในระยะ stationary phase (Nakano และคณะ, 1988 ; Chevanet และคณะ, 1985 ; Besson และคณะ, 1987) ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์ของ *B. subtilis* เริ่มเข้าสู่กระบวนการสร้างสปอร์และเป็นสภาวะที่เซลล์เริ่มขาดแคลนสารอาหารในการดำรงชีวิตแต่ก็มีสารปฏิชีวนะบางชนิดที่เริ่มสร้างในระยะ exponential phase เป็นต้นไป เช่น surfactin (Cooper และคณะ, 1981 ; Sheppard และ Mulligan, 1987) จากการศึกษาสารปฏิชีวนะที่มีบทบาทในการควบคุมโรคพืชโดยส่วนใหญ่พบว่าระยะการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* ในปริมาณมากที่สุดมักจะใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 4 วันเป็นต้นไป (McKeen และคณะ, 1986 และ Ferreira และคณะ, 1991)

สำหรับการทดลองของ Phae และคณะ (1992) พบว่าการผลิตสารปฏิชีวนะ iturin ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราหลายชนิดโดย *B. subtilis* จะใช้เวลาถึง 5 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณสารปฏิชีวนะมากที่สุด แต่ช่วงเวลาที่ผลิตสารปฏิชีวนะดังกล่าวนี้อาจแปรเปลี่ยนไปตามกระบวนการผลิตที่เปลี่ยนแปลง การสกัดสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ปริมาณของ crude extract 210 มก. จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDB 1 ลิตร ซึ่งปริมาณดังกล่าวนี้อาจจะแตกต่างจากค่าที่แสดงโดย McKeen และคณะ (1986) คือ 760 มก. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ทั้งนี้อาจจะเกิดเนื่องมาจากความแตกต่างกันของสายพันธุ์ (variation) ของ *B. subtilis* ที่ใช้ทดลอง

Sandrin และคณะ (1990) ได้ทดลองศึกษาเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* พบว่าความแตกต่างในส่วนประกอบของอาหารและสายพันธุ์ของ *B. subtilis* ที่ใช้ทดลองจะให้ปริมาณของสารปฏิชีวนะทั้ง iturin และ surfactin ที่ได้รับจะแตกต่างกัน ลักษณะของ crude extract ที่ได้รับจากการทดลองนี้มีลักษณะสีน้ำตาล มีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องได้นานมากกว่า 8 เดือนและทนต่อความร้อนซึ่งคล้ายกับ crude extract ที่ได้รับจากการทดลองของ McKeen และคณะ (1986) เมื่อนำ crude extract ที่สกัดได้มาทดสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อ *P. oryzae* และ *R. oryzae* โดยดูจากลักษณะและขอบเขตของการยับยั้งเปรียบเทียบกับสารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ร่วมกับเชื้อราทั้งสองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดดังกล่าวกับสารที่ปลดปล่อยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกัน ขอบเขตของการยับยั้งอันเกิดเนื่องจาก crude extract ที่มีต่อเชื้อราทั้งสองพบว่ายังคงอยู่เป็นเวลาหลายวัน แสดงให้ทราบว่าสารปฏิชีวนะที่สกัดได้มีความเสถียรต่อการถูกทำลายโดยเชื้อราโรค *P. oryzae* และ *R. oryzae* ค่อนข้างสูง

เมื่อทดสอบสารปฏิชีวนะที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงเส้นใยของเชื้อราโดยทำการตัดเส้นใย

ของเชื้อราที่อยู่ใกล้กับสารปฏิชีวนะมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าปลายของเส้นใยเชื้อรา ทั้งสองจะมีลักษณะบวมและโป่งพองซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับผลการทดลองโดย Ferreira และคณะ (1991) แสดงให้ทราบว่า เป้าหมายในการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะอยู่ที่ชั้นเมมเบรนของเซลล์รา

Phae และคณะ (1992) วิเคราะห์ว่าการบวมและโป่งพองดังกล่าว เกิดเนื่องจากเส้นใยของเชื้อราถูก *B. subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะ iturin เข้าไปยังเส้นใยของเชื้อรา โดยเมื่ออยู่ในสภาวะของเหลว iturin จะอยู่ในรูป micelle เข้าไปจับกับส่วนที่เป็นไขมันที่เป็นส่วนประกอบในชั้นเมมเบรน (Latoud และคณะ, 1987) โดยกรดอะมิโน tyrosine ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ iturin จะมีบทบาทที่สำคัญในการจับกับส่วนที่เป็นไขมันในชั้นเมมเบรน (Harnois และคณะ, 1989) หลังจากนั้นจะทำให้คุณสมบัติการคัดเลือกสารผ่านเข้าออกเปลี่ยนแปลงไปอันเป็นผลให้เกิดการบวมและโป่งพอง

4.3 การศึกษาการผลิตและฤทธิ์ของสารชนิดระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24

เมื่อทำการศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงในอาหาร PDA CDA และ NA เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารชนิดระเหย ผลการทดลองพบว่าอาหารที่ช่วยเสริมการผลิตสารชนิดระเหยได้มากคืออาหาร PDA และอาหาร CDA รองลงมาอาหาร NA ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Fiddaman และ Rossall (1993) ซึ่งกล่าวว่าในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลมากดังเช่นที่พบว่าในอาหาร PDA ช่วยเสริมให้อัตราการผลิตสารชนิดระเหยในปริมาณที่สูง ในขณะที่อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำ สารชนิดระเหยที่ได้รับจะมีค่าต่ำด้วย อย่างไรก็ตามสำหรับการผลิตสารระเหยแอมโมเนียที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *P. ultimum* และ *R. solnia* พบว่าจะถูกยับยั้งหากมีปริมาณน้ำตาลที่มากเกินไป ถ้าหากปริมาณของสารชนิดระเหยที่ผลิตจาก *B. subtilis* ขึ้นกับปริมาณของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ บทบาทของปริมาณน้ำตาลที่มีผลต่อกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะคือ

1. ปริมาณน้ำตาลซึ่งอยู่ในอาหาร PDA คิดเป็น 2 % ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณดังกล่าว นี้อยู่ในช่วงที่จะช่วยเร่งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* เร็วขึ้น (Ferreira และคณะ, 1991) น่าจะเสริมหรือสนับสนุนผลการทดลองที่พบว่าสารชนิดระเหยถูกผลิตโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 ออกมาในปริมาณมากกว่าธรรมดา

2. เนื่องจากโมเลกุลน้ำตาลซูโครส มีปริมาณของธาตุ C H O เป็นองค์ประกอบปริมาณมาก และกระบวนการเมตาบอลิสมของน้ำตาลซูโครส เพื่อให้ได้ธาตุดังกล่าวมาใช้ก็ไม่ยุ่งยาก ซึ่งอาจจะ

ช่วยเอื้อประโยชน์ในการนำธาตุดังกล่าวมาสร้างสารชนิดระเหยได้ปริมาณมากกว่าปกติ นอกจากนี้ สารอาหาร PDA ยังช่วยส่งเสริมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma komigii* II ในการผลิตสารชนิดระเหย 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one ได้ดีอีกด้วย (Simon และคณะ, 1988)

มีผู้ศึกษาบทบาทของสารระเหยต่อการการควบคุมโรคพืชกันแพร่หลาย ส่วนใหญ่มักจะมุ่งไปศึกษาถึงความสามารถของดินที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืช ซึ่งเป็นผลเกี่ยวเนื่องโดยตรงจากการสร้างสารระเหยของจุลินทรีย์ในดิน โดยเฉพาะสารระเหยจากแบคทีเรีย สำหรับสารระเหยที่ผลิตจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ของการทดลองนี้พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ค่อนข้างสูง และมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ด้วยจึงมีประโยชน์อย่างมาก ถ้าหากนำมาควบคุมโรคพืชซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากดินโดยตรง อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องทราบสูตรโครงสร้าง และคุณสมบัติรายละเอียดทั่วไปของสารเสียก่อน สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus spp.* รายงานโดย Wrigth และคณะ (1991) พบว่า สามารถผลิต Isoamyl alcohol ซึ่งเป็นสารระเหยที่มีความสามารถในการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Cyanobacteria* ได้ดี ในขณะที่ Fiddaman และ Rossall (1993) พบว่า *B. subtilis* สามารถสร้างสารระเหยที่สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคบางชนิดได้เช่นกัน แต่ยังไม่ทราบชนิดสูตรโครงสร้างที่แน่นอนของสารดังกล่าว

สารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 มีฤทธิ์เพียงการยับยั้งแบบชั่วคราว และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ที่เจริญมาก่อนได้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของฤทธิ์ต้านราของสารชนิดระเหยต่อการนำมาใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรคข้าวดังกล่าวได้ทั้งในระยะเริ่มแรกของการก่อโรคและระยะที่เชื้อราเจริญก่อโรคแล้ว อย่างไรก็ตามสำหรับโรคข้าวซึ่งเชื้อรามักก่อโรคอยู่เหนือส่วนบนพื้นดินของพืช สารผลิตชนิดระเหยจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 ควรมีความสามารถต่อการละลายและแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้จึงจะสามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา

การทดสอบความสามารถของสารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้ง *R. solani* พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solani* ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทั้งสองแบบการทดลองคือการเลี้ยงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* มาก่อน 1 วัน และการเพาะเลี้ยงพร้อมกับเชื้อ *R. solani* เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *R. solani* แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. solani* ได้ดี และเชื้อ *R. solani* เป็นเชื้อก่อโรคที่ติดต่อทางดิน ดังนั้นบทบาทในการควบคุมเชื้อ *R. solani* โดย *B. subtilis* NSRS 89-24 ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์โดยสาร

ชนิดระเหย ก็สามารถนำมาใช้ควบคุมเชื้อดังกล่าวได้

สำหรับ *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไป ซึ่งใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรค *P. grisea* และ *R. oryzae* ได้แสดงว่าสารผลิตชนิดระเหยชนิดนี้สามารถที่จะสร้างได้จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆได้ด้วย ดังนั้น *B. subtilis* ที่อาศัยอยู่ในดินในธรรมชาติอาจเป็นปัจจัยเสริมอีกอย่างหนึ่งที่จะช่วยในการควบคุมเชื้อราโรคพืชโดยชีววิธีให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

เมื่อทำการทดลองโดยตัดเส้นใยเชื้อรา *P. grisea* *R. oryzae* และ *R. solani* ซึ่งสัมผัสสารผลิตชนิดระเหยมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เส้นใยของเชื้อราที่ทดสอบไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ไม่มีการบวมหรือโป่งพองเกิดขึ้นเหมือนกับการทดลองของสารปฏิชีวนะที่สกัดตามวิธีการของ McKeen และคณะ (1986) แสดงให้ทราบว่ากลไกการยับยั้งของสารผลิตชนิดระเหย น่าจะเกี่ยวข้องกับการเข้าไปขัดขวางขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการเมตาบอลิสมภายในเซลล์ของเชื้อรา จนทำให้กระบวนการดังกล่าวไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้ตามปกติจึงทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต และหากสารผลิตชนิดระเหยเจือจางไปเซลล์ก็น่าจะเจริญได้ตามปกติโดยใช้เวลาไม่นานนัก ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองในเรื่องผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเจริญของเส้นใยรา ซึ่งพบว่าหากเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ออกและนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อราไปเลี้ยงต่อ เชื้อราดังกล่าวจะเจริญได้ตามปกติ

การศึกษาเพื่อทดสอบผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อความสามารถในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae* แสดงให้ทราบว่าสารชนิดระเหยสามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae* ได้ดีเช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะชนิดไม่ระเหยซึ่งรายงานโดย McKeen และคณะ (1986) และ Ferreira และคณะ (1991) ความเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการบวมของสปอร์ของเชื้อราอาจเกิดจากการสะสมสารชนิดระเหยภายในเซลล์ของสปอร์ ซึ่งอาจเข้าไปขัดขวางขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการเมตาบอลิสม อันเป็นผลทำให้เซลล์ของสปอร์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติและก่อให้เกิดการสะสมสารพิษภายในเซลล์ขึ้น

Fiddaman และ Rossall (1993) รายงานไว้ว่าสารระเหยจาก *B. subtilis* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคบางชนิดได้ แต่รายงานนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าสารระเหยจาก *B. subtilis* สามารถที่จะยับยั้งหน่วยสืบพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคได้และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่ผิดปกติอย่างชัดเจน

การป้องกันการแพร่กระจายอันเกิดจากการงอกของเชื้อราก่อโรคได้ถือเป็นวัตถุประสงค์หลักในควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Cook และ Baker, 1983) จากประสิทธิภาพของการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae* และเม็ด sclerotium ของ *R. solani* ในการทดลองนี้และด้วยคุณสมบัติในการระเหยของสารปฏิชีวนะชนิดระเหย ซึ่งไม่ต้องกังวลพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อมด้วยแล้ว ยิ่งช่วยเพิ่มข้อดีและความสนใจในการนำ *B. subtilis* เข้ามาควบคุมโรคพืชเพิ่มขึ้น

สำหรับ *B. subtilis* จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการศึกษาในด้านที่เกี่ยวข้องกับชีวเคมีและด้านพันธุวิศวกรรมเป็นอย่างมาก Simonen และ Palva (1993) ใช้ *B. subtilis* มาเป็น host สำหรับ การผลิต extracellular enzyme หลายชนิดตัวอย่างเช่น amylase, Protease จาก *Bacillus* Proteins จาก Staphylococcal และ alkaline phosphatase จาก *E. coli* นั้น นอกจากอาศัยความสามารถเฉพาะในการผลิตสารปฏิชีวนะด้วยตัว *B. subtilis* เองแล้ว ยังสามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของ*B. subtilis* ในการควบคุมเชื้อโรคต่างๆได้ด้วยวิธีการต่อไปนี้

1. การโคลน (Clone) ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปรสิตที่ได้รับจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆอาทิเช่นเอนไซม์ chitinase และ glucanase เข้าไปยังจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่ต้องการ

2. การโคลน (Clone) ยีนที่ควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆที่ได้รับจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นๆ เข้ายังกลุ่มยีนของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะนั้นๆมาช่วยเสริมให้สามารถควบคุมโรคได้มากยิ่งขึ้น

หลังจากทำการศึกษาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิดที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว (*in vitro*) ขั้นตอนต่อไปคือการนำไปทดสอบในภาคสนาม (*in vivo*) ซึ่งอาจให้ผลในการต่อต้านหรือไม่ก็ได้ ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ

1. ตัวเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในด้าน
   - ปริมาณเชื้อตั้งต้น การกระจายและการคงรูปของเชื้อที่จะออกฤทธิ์
   - ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะและความคงทนในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม
   - รูปแบบและการผลิตหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการเอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เจริญเติบโตออกมาจากผงเชื้อหรือเม็ดเชื้อ
   - การเก็บรักษาเชื้อได้นานและประสิทธิภาพไม่แปรผัน
2. สภาพแวดล้อม เช่น

- คุณสมบัติของดินทั้งด้านเคมีและกายภาพซึ่งมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์
- ระดับขั้นความรุนแรงของโรคที่มีการแพร่ระบาดรุนแรงขนาดไหน รวมถึงการเกิดโรคแทรกซ้อนจากเชื้ออื่นๆ เป็นต้น

3. วิธีการนำไปทดสอบต้องพิจารณาถึง

- ความเหมาะสมทั้งด้านเวลาและอัตราการใช้
- คำนึงถึงข้อจำกัดต่างๆ เช่น การใช้ร่วมกับสารเคมีอื่นๆมีผลกระทบต่อเชื้อหรือเปล่า

5. สรุป

1. ฤทธิ์ต้านราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว *P. grisea* และ *R. oryzae* จะเป็นลักษณะของการหลั่งสารปฏิชีวนะออกมายับยั้ง โดยมีเป้าหมายการออกฤทธิ์อยู่ที่เซลล์เมมเบรน สังเกตได้จากการโป่งพองของเส้นใยของเชื้อราโรคข้าวทั้งสองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2. สารปฏิชีวนะจาก *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 จะผลิตได้มากที่สุดในการเลี้ยงด้วยอาหาร PDB เขย่าที่อุณหภูมิ 30 % °C เป็นเวลา 5 วัน และสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จะมีสีน้ำตาล ละลายได้ดีใน 80 % เอทธานอล และทนต่อความร้อนได้สูง

3. สารผลิตชนิดระเหยจาก *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ผลิตได้มากที่สุดในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 °C ออกฤทธิ์ต่อ *P. grisea* และ *R. oryzae* เป็นแบบการยับยั้งชั่วคราว สามารถยับยั้งหน่วยสืบพันธุ์ของเชื้อราโรคข้าวได้ ทั้งสปอร์ของ *R. oryzae* และ sclerotium ของ *R. solani* โดยเฉพาะสปอร์ของ *R. oryzae* การยับยั้งจะเกิดภายใน 48 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2535. "แมลงและสัตว์ศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการเกษตร".ไอเดีย สแควร์. 400 หน้า

เปรมปรีย์ ณ.สงขลา. 2537." การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช", วารสารเคหการเกษตร.12 (ธันวาคม 2537) , 175-183

Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 28:59-72

Andrews, J. H., Berbee, F. M., and Nordheim, E. V. 1983. Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen *Venturia inequalis*. Phytopathology 73: 228-234

Arima, K., Kakinuma, A., and Tamura, G. 1968. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* : isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31:488-494

Baker, K. F. and Cook, R. J. 1974. Biological control of plant pathogens. St. Paul : Am. Phytopathol. Soc. 433.pp

Baker, C. J., Stavely, J. R. and Mock, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Dis. 69:770-772

Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, C. A., Sasser, M., and MacFall, J. S., 1983. Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on the development of rust pustules on bean leaves. Phytopathology 73: 148-1152

Benyagoub, M., and Jabaji-Hare, S. H. 1992. Parasitism of hyphae and sclerotia of *Rhizoctonia solani* by *Stachybotrys elegans.* Phytopathology 82:1119

Bernheimer, A.W., and Avigad, L. S. 1970. Nature and properties of acytolytic agent produced by *Bacillus subtilis.* J. Gen. Microbiol. 61:361-369

Besson , F., Chevanet, C., and Michel, G. 1987. Influence of the culture medium on the productin of iturin A by *Bacillus subtilis.* Gen Microbiol 133:767-772

Blakeman, J. P., and Fokkema, N. J., 1982. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. Annu. Rev. Phytopathol. 20:167-192

Boer, A. S., and Diderichsen, B. 1991. On the safty of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* : A review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:1-4

Buyer, J. S., Lorenzo, V., and Neilands, J. B. 1991. Production of the siderophore aerobactin by halophilic pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2246-2250

C.A.B. International Mycological Institute. 1985. Rice Disease.Cambrisn News, UK. 380 pp.

Chevanet, C., Besson, F. and Michel, G. 1985. Effect of various growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis.* Can. J. Microbiol. 32:254-258

Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R., and Avent, A. G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum.* Trans. Br. Mycol. Soc. 88:503-513

Cook, R. J. 1985. Biological control of plant pathogens: theory to application. Phytopathology 75:25-29

Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopatho. 31:53-80

Cook, R. J., and Baker, K. R. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, MN : Am. Phytopathol. Soc. 539 pp

Cooper, D. G., MacDonald, C. R., Duff, S. J. B., and Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* by continuous remove and metal cation additions. Appl. Environ. Microbiol. 42:408-412

Cowan, S. T., Holt, J. G., Liston, J., Murray, R. G. E., Niven, C. F., Ravin, A.W., and Stanier, R. Y. 1974. Bergey›s Manual of Determinative Bacteriology, 8 th ed. the Williams and Wilkins co., Baltimore, 1268 p

Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Pachlatko, J. P., and Schwinn, F. J. 1992. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. Phytopatology. 82: 131-135

Douville, Y., and Boland, G. J. 1987. A note on the antibiotic properties of *Bacillus subtilis*. Trans. Mycol. Soc.J apan. 28:483-493 (abstract)

Elad, Y., Chet, I., and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 28:719-725

Ferreira, J. G. S., Matthee, F. N., and Thomas, A. C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. Phytopathology 81:283-287

Fiddaman, P. J., and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis*. J. Appl Bacterol. 74:119-126

Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 26:75-91

Gamliel, A., Kantan, J. and Cohon, E. 1989. Toxicity of choronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum and Rhizoctonia solani* as related to their structure Phytoparasitica. 17:101-106

Gilbert, G. S., Handelsman, J., and Parke, J. L. 1990. Bacterial communities in soil and on soybean roots, and the effects of a biological control agent. Phytopathology 80:995

Gueldner, R. C., Reilly C. C., Pusey, P. L., Costello, C. E., Arrendale, R. H., Crumley, F. G., Himmelsbach, D. S., and Cutler, H. G. 1988. Isolation and denitrification of iturin as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. J.Agri.Food Chem. 36:366- 370

Hall, T. J., Schreiber, L. R., and Leben, C. 1986. Effects of xylem-colonizing *Bacillus spp.* on Verticillium wilt in maples. Plant Dis. 70:521-524

Harnois, I., Maget-Dana, R., and Ptak, M. 1989. Methylation of the antifungal lipopeptide iturin A modifies its interaction with lipids. Biochimie. 71: 111-116

Howell, C. R., Beier, R. C., and Stipanovic, R. D. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possiblerole in biological control of Pythium preemergence damping-off by the bacterium. Phytopathology 78:1075-1078

Howell, C. R. 1991. Biological control of Pythium-off of cotton with seed-coating preparations of *Gliocladium virens.* Phytopathology 81:738-741

Hodono, K., and Suzuki, H. 1983. Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 1 3', 5'- monophosphate phosphodiesterase. J. Antibiotics. 36:194-196

Jenny, K., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1991. Biosurfactant from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:5-13

Katz, E. A., and Demain, A. C. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus spp.* chemical, biogenesis, and possible functions. Bacteriol. Res. 41:449-474

Kempf, H.-J., Bauer, P. H., and Schroth, M.N. 1993. Herbicolin A associated with crown and roots of wheat after seed treatment with *Erwinia herbicola.* B247. Phytopathology 83:213-216

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature 286:885-886

Latoud, C., Peypoux, F., and Michel, G. 1987. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the Yeast *saccharomyces cerevisiae*: modification of membrane permeability and lipid composition. J. Antibiotics. 40:1588-1594

Lemanceau, P., Bakker, P. A., and Kogel, W. J., Alabouvette, C. and Schippers, B. 1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Appl. Environ. Microbiol. 59:74 -82

Leong, J. 1986. Siderophore: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 24:187-209

Lorian, V. 1986. Antibiotics in laboratory medicine. 2nd. ed. Williams & Wilkins, Baltimore,1259p

Lumsden, R. D., and Locke, J. C. 1989. Biological control of damping-off caused by *Pytium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. Phytopathology 79:361-366.

Matsuura, K. 1986. Scanning electron microscopy of the infection process of *Rhizoctonia solani* in leaf sheaths of rice plants. Phytopathology 76: 811-814

McCormack, P. J., Wildman, H. G and Jeffries, P. 1994. Production of antibacterial compounds by phylloplane inhibiting yeasts and yeastlike fungi. Appl. Environ. Microbiol. 60:927-931

Mckeen, C. D., Reilly, C. C. and Pusey P. L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathology 76:136-139

Mhammedi, A., Peypoux, F., Besson, F. and Michel, G. 1982. Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group : Isolation and characterization. J. Antibiotics. 35:306-311

Nakano, M. M., Mohamed, A. M., and Zuber, P. 1988. Identification of a genitic locus reqiured for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 170:5662-5668

Nalinee, C., Panee, N., Manoon, A., and Bunmee, W. 1991. Biological control of bacterial leaf blight and some fungal pathogens of rice in Thailand by *Bacillus subtilis*. Thai J. Agric. Sci. 24:283-299

Ou, S.H. 1973. A hand book of rice disease in the tropics. International Rice Research Institute, Los Banos,Philippines.

Ordentlich, A., Elad, Y., and Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 78:84-88

Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Delcambe, Das, B. C. and Lederer, E. 1978. Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*.

Biochemistry 17:3992-3996

Peypoux, F., Pommier, M. T., Das, B. C., Besson, F., Delcambe, L. and Michel, G. 1984. Structures of bacillomycin D and bacillomycin L, peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. J. Antibiotics. 37:1600-1604

Peypoux, F., Pommier, M. T., Marion, D., Ptak, M., Das, B. C., and Michel, G. 1986. Revise structure of mycosubtilin, A peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. J. Antibiotics. 39:636-641

Phae, C. G., Sasaki, M., Shoda, M. and Kubota, H. 1990. Characteristics of *Bacillus subtilis* isolated from composts suppressing phytopathogenic microorganisms. Soil Sci. Plant Ntr. 36:575-586

Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M. and Ushiyama, K. 1992. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58:329-339

Phae, C. G., Shoda, M., and Kubota, H. 1990. Suppression effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. J. Ferment. Bioeng. 69:366-370

Pusey, L. P., Hotchkiss, M. W., Dulmage, H. T., Baumgardner, R. A., Zehr, E. I., Reilly, C. C. and Wilson, C. L. 1988. Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. Plant Dis. 72:622-626

Pusey, L. P., and Wilson, C. L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit

brown rot by *Bacillus subtilis.* Plant Dis. 68:753-756

Reissig, W. H., Heinrichs, E. A., Litsinger, J. A., Moody, K., Fiedler, L., Mew, T. W., and Barrion, A. T. 1986. Illustrated guide to integrated pest management in rice in tropical asia. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.

Rytter, J. L., Lukezic, F. L., Craig, R., and Moorman, G. W. 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis.* Phytopathology 79:367-370

Ridout, C. J., Lumsden, R. D., and Hruschka, W. R. 1992. Identification of mycelial polypeptides associated with gliotoxin-producing strains of the biocontrol fungus *Gliocladium virens.* Phytopathology 82:479-484

Sandrin, C., Peypoux, F., and Michel, G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis.* Biotechnol. Appl. Biochem. 12:370-375

Sanford, G.B. 1926. Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies.* Phytopathlogy 16:525-547

Sanford, G. B., and Broadfoot, W. C. 1931. A note on the biological control of root rots of cereals. Studies of the effects of other soil-inhibiting microorganisms on the virulence of *Ophiobolus* graminis. Sacc. Sci. Agric. 11:460, 512-528

Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. H. M., and Peer, R.V. 1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere

interactions. Plant and Soil 129:75-83

Schroth, M. N., and Hancock, J. G. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. Science 216:376-381

Sheppard, J. D., and Mulligan, C.N. 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:110-116

Simon, A., Dunlop, R. W., Ghisalberti, E. L., and Sibasithamparam, K. 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyron compound with antibiotic properties. Soil. Biol. Biochem. 20:263-264

Simonen, M., and Palva, I. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol. Rev. 57:109-137

Sinclair, J. B. 1989. *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant diseases. Perspectives in phytopathology. pp. 367-374 (abstract)

Smith, V. L., Wilcox, W. F., and Harman, G.E. 1990. Potential for biological control of phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium spp.* Phytopathology 80:880-885

Takahara, Y., Hirose, Y., Yasuda, N., Mitsugi, K., and Murao, S. 1976. Effect of peptidolipids produced by Bacillus on the emzymatic lysis of Gram-negative bacterial cells. Agric. Biol. Chem. 40:1901-1903

Takesako, K., Ikai, K., Haruna, F., Endo, M., Shimanaka, K., Sona, K., Nakamura,

T., and Kato, I. 1991. Aureobasidins, new antifungal antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation and properties. J. Antibiotics. 44:919-924

Tauber, M. J., Hoy, M. A., and Herzog, D. C. 1985. "Biological control in Agricultural IPM symtem: A brief overview of the current status and future prospects", Page 1-9 in: Biological control in Agricultural IPM systems. Marjoric, A. H. and Donald, C. H., eds. Lon don:academic Press.

Tschen, J. S. M. 1987. Control of *Rhizoctonia solani by Bacillus subtilis*. Trans. Mycol. Soc. Japan. 28:483-493 (abstract)

Tweddell, R. J., Jabaji-Hare, S. H., and Charest, P.M. 1992. Production of chitinases and β-1, 3- glucanases by *Stachybotrys elegans* , a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Appl. Environ. Microbiol. 60:489-495

Utkhede, R. S., and Rahe, J. E. 1983. Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. Phytopathology 73:890-893

Vannacci, G., and Harman, G. E. 1987. Biocontrol of seed-borne *Alternaria raphani* and *A. brassicicola*. Can. J. Microbiol. 33:850-856

Vicedo, B., Penalver, R., Asins, M. J., and Lopez, M. M. 1992. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pHgk 84 Transfer with *Agrobacterium radiobactor* k84 and theTra- mutant strain 026. Appl. Environ. Microbiol. 59:309-315

Walther, D., and Gindrat, D. 1988. Biological control of damping-off of sugarbeet and cotton with *Chaetomium globosum* or a fluorescent *Pseudomonas* sp. Can. J. Microbiol. 34:631-637

Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407

Wilson, C. L, and Wisniewski, M. E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables : an emerging technology. Annu. Rev. Phytopathol. 27:425-441

Wilson, K. E., Flor, J. E., Schwartz, R. E., Joshua, H., Smith, J. L., Pelak, B. A., Liesch, J. M., and Hensens, O. D. 1987. Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization. J. Antibiotics. 40:1682-1691

Wright, S. J. L., Linton, C. J., Edwards, R. A., and Drury, E., 1991. Isoamyl alcohol (2-methy-1-butanol), a volatile anti-cyanobacterial and phytotoxic product of some *Bacillus spp.* Lett. Appl. Microbiol. 13:130-132

Yaegashi, H., Matsuda, I., and Sato, Z., 1987. Production of appressoria at the tips of hyphae of *Pyricularia oryzae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 53:203-209

Yamada, S., Takayama, Y., Yomanaka, M., Ko, K., and Yamaguochi, I. 1990. Biological activity of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis*. J. Pest. Sci. 15:95-96

Yune, G. Y., Craig, M. L., and Giesler, L. J. 1994. Biological control of *Rhizoctonia solani* on tallfescue using fungal antagonists. Plant Dis.78:118-123

Zimmerman, S. B., Schwartz, C. D., Monaghan, R. L., Pelak, B. A., Weissberger, B., Gilfillan, E. C., Mochales, S., Hernandez, S.,Currie, S.A., Tejera, E., and Stapley, E. O. 1987. Difficidin and oxydifficidin : Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. J. Antibioics 40:1677-1681

ภาคผนวก

อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารวุ้น PDA

สารอาหาร

Potato dextrose agar	200.0 g
Distilled water	1000.0 ml

2. อาหารวุ้น CDA

สารอาหาร

Sucrose	30.0 g
Sodium nitrate	3.0 g
Dipotassium phosphate	1.0 g
Magnesium sulfate	0.5 g
Potassium chloride	0.5 g
Iron (II) sulfate	0.1 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000.0 ml

3. อาหารวุ้น NA

สารอาหาร

Nutrient Agar	23.0 g
Deionized water	1000.0 ml

4. อาหารวุ้น PDB

สารอาหาร

Potato decocetion	200.0 g
Glucose (dextrose)	20.0 g
Distilled water	1000.0 ml

5. อาหารวุ้น CDB

สารอาหาร

Sucrose	30.0 g
Sodium nitrate	3.0 g
Dipotassium phosphate	1.0 g
Magnesium sulfate	0.5 g
Potassium chloride	0.5 g
Iron (II) sulfate	0.1 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000.0 ml

6. อาหารวุ้น NB

สารอาหาร

Gelatin peptone	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Sodium chloride	8.0 g
Deionized water	1000.0 ml

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสุชล แก้วพรหม
วัน เดือน ปีเกิด	28 สิงหาคม 2509

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การศึกษาบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	2534