รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษา คุณสมบัติ และกลไกการควบคุมโรคข้าวของ *Bacillus subtilis*

A Study on Characterization and Mechanism of Biological Control of Rice Diseases by *Bacillus subtilis*

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

และ

รองศาสตราจารย์ดวงพร คันธโชติ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Order Key 18198

BIB Key 156339

เลขหมู่ SB608.R5 ว32 2538

เลขทะเบียน ค 1

- 7 มิ.ย. 2542

(งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๓๘)

บทคัดย่อ

Bacillus subtilis NSRS 89-24, 89-26 และ B1 ได้ถูกนำมาแสดงสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคข้าว การควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv *oryzae* โดยใช้ *B. subtilis* B1 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งการเจริญได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Czapelc Dox Broth (CDB) +1% yeast extract ค่า MIC และ MBC ของสารละลายปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* B1 ต่อเชื้อ *X. campestris* pv *oryzae* มีค่าเท่ากับ 1:8 และ 1:4 ตามลำดับ การทดลองทางห้องปฏิบัติการพบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 มีส่วนยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Pyricularia grisea* และ *Rhynchosporium oryzae* ได้โดยเกิดบริเวณยับยั้งขึ้นระหว่างเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และเชื้อราทั้งสอง ผลในการกำจัดราเกิดจากการสร้างสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำแล้วปล่อยเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะที่ดีสุดในการสร้างสารปฏิชีวนะคือการเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 5 วัน ทำการแยกสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการตกตะกอนด้วยกรดเกลือที่ pH เป็น 2.0 และสกัดด้วย 80 % แอทธานอล สารปฏิชีวนะที่สกัดได้ สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราทั้งสองได้ดี เส้นใยส่วนปลายของเชื้อราด้านที่ถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะบวมและโป่งพอง นอกจากนี้ *B. subtilis* NSRS 89-24 ยังสามารถผลิตสารระเหยที่มีฤทธิ์ในการต้านราแบบชั่วคราว รวมทั้งยับยั้งการงอกของสปอร์ *Rhizoctonia. oryzae* และเม็ด sclerotium ของ *R.solani* สารดังกล่าวสามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA

Abstract

Bacillus subtilis NSRS 89-24, 89-26 and B1 were used for demonstration on antagonistic activity against bacteria and fungi which generate major diseases of rice. On the growth control of *Xanthomonas campestris* p.v. *oryzae* causing bacterial leaf blight in rice was conducted, using the antagonist *B. subtilis* B1. It is found that antagonist *B. subtlis* B1 having an advantage to impede the growth of *X.campestris* p.v. *oryzae*. Yet such an outcome derives from *B. subtilis* B1 producing antibiotics to the great extent when was grown in CDB+1% yeast extract medium. MIC and MBC of the *B. subtilis* B1 culture filtrate against *X.campestris* p.v. *oryzae* were 1:8 and 1:4, respectively. The ability of *B. subtilis* NSRS 89-24 to inhibit the fungal diseases in rice; *Pyricularia grisea* and *Rhynchosporium oryzae* was tested *in vitro* . Having cultured both for 48 hours, there was a clear zone between *B. subtilis* NSRS 89-24 and both fungi. The fungicidal activity suggests that *B. subtilis* NSRS 89-24 produced antibiotic substances as a water-soluble material, discharging in culture medium. Maximum inhibition apparently demonstrated following the growth of culture in PDB medium for 5 days. Antibiotic substances extracted with 80% ethanol from cell-free culture medium and precipitating with 12 N HCl (to pH 2), also inhibited growth of fungi when applied to the cut edge of growing mycelium. Microscopic examination revealed swollen and vacuolated mycelia. Likewise, the effect of *B. subtilis* NSRS 89-24 supports the suggestion that anti-fungal activity resulted from both antibiotic substances and volatile substances. Volatile substance was shown to have fungistatic effect on fungal growth and reached the maximum level upon culturing in PDA medium. The volatile substance also inhibited germination of the spores of *R. oryzae* and sclerotia of *Rhizoctonia solani*.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ	(2)
Abstract	(3)
สารบาญ	(4)
รายการตาราง	(5-6)
รายการรูป	(7-8)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	6
วิธีการ	7
ผลการทดลอง	18
วิจารณ์	37
สรุป	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	55

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการเจือจางของสารละลายปราศจากเซลล์ของ *B.subtilis* B1	11
2	การยับยั้งเชื้อทดสอบของ *B.subtilis* B1 กับ *P.fluorescens*	18
3	การเจริญของเชื้อชนิดต่างๆ ในระยะเวลาต่างกัน	19
4	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อการเจริญของเชื้อ *X.campestris* pv.*oryzae* เมื่อใช้สารละลายปราศจากเซลล์ที่อายุต่างกัน	19
5	ผลของอาหารต่อการสร้างยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B.subtilis* B1 เมื่อทดสอบตามคู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป 327-202	19
6	การยับยั้งเชื้อทดสอบโดยยาปฏิชีวนะจากเชื้อ *B.subtilis* B1 เมื่อใช้อาหารสูตรต่างกัน	20
7	การหาปริมาณเชื้อทดสอบที่ควรใช้เมื่อใช้สารละลายปราศจากเซลล์ของ *B.subtilis* B1 ปริมาตร 0.5 มล.	20
8	การหาปริมาณสารละลายปราศจากเซลล์ที่ควรใช้เมื่อใช้เชื้อทดสอบที่กำลังเจือจาง 10^{-1}-10^{-3}	20
9	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. grisea*	32
10	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *R.*	32
11	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *P. grisea*	33
12	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *R. oryzae*	33
13	การเจริญของเส้นใยราหลังจากที่สัมผัสกับสารผลิตชนิดระเหยแล้ว	34
14	ผลของสารปฏิชีวนะชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่มีอายุ 2 วัน	34

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ผลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไปต่อการผลิตสารผลิตชนิดระเหย	35
16	ผลของสารผลิตชนิดระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการเจริญของเชื้อ *R. solani*	35
17	ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกของสปอร์ *R. oryzae* ในเวลาต่างๆกัน	35

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	แสดงเชื้อทดสอบที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *B.subtilis* B1 และ *P.fluorescens* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ	7
2.	แสดงเชื้อทดสอบที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *B.subtilis* B1 และ *P.fluorescens*	8
3.	แสดงเชื้อทดสอบเพื่อดูความสามารถของเชื้อ *B.subtilis* B1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X.campestris* pv.*oryzae*	9
4.	แผนผังทำการสกัดสารปฏิชีวนะอย่างหยาบดัดแปลงจากวิธีการ ของ McKeen และคณะ (1986)	17
5.	ปฏิกริยาระหว่าง *B. subtilis* NSRS 89-24 กับ *P. grisea* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยราบริเวณยับยั้งมีลักษณะโป่งพองตามศรชี้ (B) และเส้นใยราปกติ (C)ที่กำลังขยาย 400 เท่า	27
6	ปฏิกริยาระหว่าง B.subtilis NSRS 89-24 กับ R. oryzae (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยราบริเวณยับยั้งมีลักษณะโป่งพองตามศรชี้ (B) และเส้นใยราปกติ (C)ที่กำลังขยาย 400 เท่า	28
7.	ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB เพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae*	29
8	การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารสกัดจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Agar disc diffusion ต่อเชื้อ *P. grisea* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยราบริเวณยับยั้ง (B) และเส้นใยราปกติ (C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า	30
9	การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารสกัดจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Agar disc diffusion ต่อเชื้อ *R.oryzae* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยราบริเวณยับยั้ง (B) และเส้นใยราปกติ (C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า	31

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
10.	การงอกของสปอร์ของเชื้อ *R.oryzae* ในอาหาร PDA ภายใต้การสัมผัสสารชนิดระเหย จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วัน ในอาหาร PDA ระยะเวลา 8-48 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400 เท่า	36
11	การงอกของ sclerotium ของ *R. solani* บนในอาหาร PDAในเวลาต่างๆกัน เมื่อสัมผัสกับสารชนิดระเหยผลิตโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วัน ในอาหาร PDA	36

บทนำ

การควบคุมโรคด้วยชีววิธีคือการใช้จุลินทรีย์ที่ลดจำนวนเชื้อก่อโรค หรือแอคติวิตีของเชื้อก่อโรคซึ่งเรียกว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microbials) การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืชเกิดขึ้นในราวปี ค.ศ. 1965 งานวิจัยในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืชจึงเริ่มได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องและแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน ทั้งนี้เพื่อจะมุ่งไปสู่การควบคุมโรคพืชแบบวิธีผสมผสานโดยมีวัตถุประสงค์หลักในเรื่องการ เพิ่มผลผลิต

การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มักจะคัดเลือกจากในบริเวณที่ไม่เกิดโรคหรือบริเวณที่โรคลดลงหรือบริเวณที่ไม่มีการแพร่กระจายของเชื้อโรค และในบริเวณที่มี host ซึ่งมีความว่องไวต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคมากกว่าบริเวณที่เกิดโรค (Baker and Cook, 1974)

กลไกการควบคุมโรคโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

1. กระบวนการ antibiosis

ใช้ผลผลิตซึ่งได้จากกระบวนการเมตาบอลิสมจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเข้าไปยับยั้งหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง

1.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics)

สารปฏิชีวนะซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ผลิตโดยจุลินทรีย์ มีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระดับความเข้มข้นต่ำ (Fravel, 1988) บทบาทของสารปฏิชีวนะต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เพื่อนำมาผลิตในอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

1.2 การสร้างสารระเหย (volatile substances)

มีรายงานการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีพบว่าสารระเหยบางชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา Howell และคณะ (1988) รายงานการควบคุมเชื้อ *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* และ *Verticillium dahilae* จากสารระเหยแอมโมเนียซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* นอกจากนั้น *alkyl pyrones* ก็เป็นสารระเหยชนิดหนึ่งซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราหลายชนิดโดยเฉพาะ *R.solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค damping-off ของผักกาดหอม (Claydon และคณะ, 1987) ไฮโดรเจนไซด์ยาไนด์จาก *Pseudomonas fluorescens* ควบคุมเชื้อ *Thielaciopsis basicola* ซึ่งเป็นสาเหตุก่อโรครากเน่าของต้นยาสูบ (Schippers และคณะ, 1990)

2. กระบวนการแก่งแย่งอาหาร (nutrient competition)

แหล่งคาร์บอนซึ่งได้รับจากคาร์โบไฮเดรทและกลูโคสเป็นสารอาหารหลักที่มีจำกัดเป็นเหตุให้จุลินทรีย์เกิดการแข่งขันซึ่งกันและกันในการนำสารอาหารนี้มาใช้ จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้เร็วและมี

กระบวนการที่มีประสิทธิภาพซึ่งสามารถที่จะนำเอาสารอาหารซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดมาใช้ได้ย่อมมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์อื่น (Gilbert และคณะ, 1990) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีกลไกหลักในการควบคุมโรคพืชแบบแข่งขันที่สำคัญ เช่น *Fusarium oxysporum* (Lemanceau และคณะ, 1993) ตัวอย่างเช่น *F. oxysporum* F047bio ใช้ควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* WES 816 ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าของมะเขือเทศ

3. กระบวนการปรสิต (parasitism)

พบในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรค ส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อรา เอนไซม์ตัวหลักที่สำคัญที่ทำหน้าที่นี้คือ เอนไซม์ chitinase และ β -1, 3-glucanase ซึ่งจะย่อยสลาย chitin และ β-1,3-glucan อันเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโครงสร้างของผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราชั้นสูง (Tweddell และคณะ, 1992) และผนังเซลล์ของ sclerotium (Benyagoub และ Jabaji-Hare, 1992) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มักจะสร้าง chitinase และ β-1,3-glucanase ในอาหารที่มีสภาพค่อนข้างเป็นกรด (Elad และคณะ, 1982)

Bacillus subtilis

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง มีการสร้างสปอร์ มีขนาดของเซลล์ต่างๆ กัน 0.5 x 1.2 - 2.5 x 10 µm มีเอนโดสปอร์ซึ่งมีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ พบได้ทั่วไปตามพื้นดิน ต้น ไม้ส่วนใบ ลำต้นและบริเวณรากพืช เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญได้ในอาหารหลายชนิด เติบโตได้ดีในอุณหภูมิปกติและพีเอชเป็นกลาง จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคแก่คนและสัตว์ สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ amylase และ protease เป็นต้น (Boer และ Diderichsen, 1991)

การจัดจำแนกหมวดหมู่ทางวิทยาศาสตร์ (classification and nomenclature) ตาม Bergey's manaul (Stanley และคณะ 1989)

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

สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ได้จาก *B. subtilis*

1. สารปฏิชีวนะประเภท lipopeptide

1.1 surfactin เป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Bernheimer และ Avigad 1970; Takahara และคณะ, 1976) และมีคุณสมบัติอื่นๆเช่น ยับยั้งการจับกลุ่มของ fribrin (Arima และคณะ, 1968; Bernheimer และคณะ, 1970) และ cyclic AMP phosphodiesterase (Hosono และ Suzuki, 1983)

1.2 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)

1.3 กลุ่ม difficidin และอนุพันธ์ ได้แก่ difficidin และ oxydifficidin สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ต่อต้านต่อเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่โดยเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อโรคที่สำคัญในคน เช่น *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, E. aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Proteus vulgaris, P. mirabilis, Serratia marcescensc* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Zimmerman และคณะ, 1977; Wilson และคณะ, 1987)

2. สารระเหย

บทบาทของสารระเหยที่เกี่ยวข้องในการควบคุมโรคพืชซึ่งได้รับจาก *B. subtilis* ที่ผ่านมายังไม่มีรายงานที่สามารถจำแนกให้ทราบถึงโครงสร้างและส่วนประกอบทางเคมี มีเพียงรายงานของ Fidddeman และ Rossall (1993) ที่พบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตสารระเหยบางชนิดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้

การนำ *B. subtilis* มาใช้ควบคุมโรคพืช

B. subtilis เหมาะที่จะเป็นจุลินทรีย์ต่อต้านเนื่องจาก

1. สามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้โดยตรง โดยการสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน และสามารถแก่งแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน (Sinclair และคณะ 1989)

2. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่โดยปกติมักอาศัยอยู่ตามส่วนต่างๆของพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืช

3. มีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรเปลี่ยนโดยการสร้างสปอร์และสามารถทนทานต่อสภาพอากาศร้อนชื้นได้ดี

4. *B. subtilis* บางสายพันธุ์มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตสารพวกเมตาบอไลท์บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการนำมาใช้กระตุ้นการเกิดความต้านทานโรคของพืชต่อเชื้อสาเหตุ (Stenzel และคณะ 1985)

5. สามารถควบคุมเชื้อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *X. campestris* pv. *viganeradiatac* (Thind และคณะ 1988), *Uromyces phaseoli* (Baker และคณะ 1985), *Verticillium dahliae* (Hall และคณะ 1986), *R. solani, Curvularia palliscens, Drechslera maydis, Macrophomina phaseoli, Colletotricum*

gloeosporioides f . sp. *manihotis* (Omifo and Ikotum, 1987) *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilinia fructicola* (Pusey และคณะ 1986) และ *Puccinia pelargoniizonalis* (Rytter และคณะ 1989)

B. subtilis เหมาะที่จะเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เนื่องจาก *B. subtilis* และมีผู้นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ควบคุมเชื้อ *U. phaseoli* (Baker, 1985) *P. pelargonii-zonalis* (Rytter, 1989) *V. dahliae* (Hall และคณะ 1986) *R. solani* (Tschen, 1987) *F. oxysporum f.sp.radicis-lycopersici* และ *Pseudomonas solanacearum* (Phae และคณะ, 1992) *M. fructicola* (Pusey และ Wilson, 1984) *Sclerotium cepivorum* (Utkhede,และ Rahe, 1983) *Eutypa lata* (Ferreira และคณะ 1991) McKeen และคณะ (1986) ได้ทำการศึกษาสารปฏิชีวนะที่ได้สกัดจาก *B. subtilis* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้อีกหลายชนิด

สำหรับประเทศไทยนั้นข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลัก เป็นสินค้าส่งออกเป็นอันดับ 4 ของประเทศ โดยประเทศไทยส่งข้าวออกเป็นอันดับ 1 ของโลก คิดเป็นมูลค่าประมาณปีละ 2-3 หมื่นล้านบาท มีเนื้อที่ของการเพาะปลูกประมาณ 60 ล้านไร่ เกษตรกรของไทยร้อยละ 80 มีอาชีพปลูกข้าว ในแต่ละปีความเสียหายซึ่งเกิดจากแมลงศัตรูพืชและโรคพืชคิดเป็นมูลค่าประมาณ 4,000-5,000 พันล้านบาท แม้จะมีการควบคุมโรคพืชโดยสารเคมีได้ก็ตาม แต่ก็มีข้อเสียต่างๆคือ ผลเสียต่อสภาพแวดล้อมทำให้ระบบนิเวศน์วิทยาเปลี่ยนแปลง ศัตรูพืชต้านทานสารเคมี อันตรายต่อสุขภาพ และเพิ่มค่าใช้จ่ายแก่เกษตรกรผู้ปลูก การนำ *B. subtilis* มาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชข้าวจะช่วยลดความเสียหายจากการกระจายของเชื้อโรคและปริมาณของสารเคมีที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคข้าว

โรคข้าวที่สำคัญ

1. โรคไหม้ (Rice blast) เกิดจากเชื้อ *Pyricularia grisea*

<u>ลักษณะอาการของโรค</u> จะมีลักษณะเป็นแผลที่ใบคล้ายสลักของแกนที่ใช้ปั่นฝ้าย ตรงกลางแผลกว้างและมีปลายทั้งสองข้างแคบลงและแหลม คล้ายรูปตา แผลโรคขนาดใหญ่มีความยาวประมาณ 1.0 ถึง 0.5 เซนติเมตร และความกว้างประมาณ 0.3 ถึง 0.5 เซนติเมตร ตามปกติตรงกลางแผลจะมีสีเทาแผลโรคขนาดเล็กสีน้ำตาลเป็นเครื่องชี้ให้ทราบว่าพันธุ์ข้าวนั้นต้านทานโรค ซึ่งบางครั้งก็คล้ายกับแผลโรคใบจุดสีน้ำตาล

<u>วงจรของโรค</u> การก่อโรคเริ่มจากสปอร์ที่เรียกว่า conidia จะถูกปลดปล่อยจาก host cell ที่เป็นโรคซึ่งส่วนมากมักจะเกิดเวลากลางคืน ในขณะที่มีน้ำค้างหรือน้ำฝน และจะถูกลมพาไปตกบนต้นข้าว เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม conidia จะเริ่มงอกโดยสร้าง germ tube ออกมาส่วนใหญ่มักจะใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมงและที่ปลายของ germ tube จะมีการสร้าง appressorium ซึ่งจะเป็นส่วนที่มีบทบาทในการช่วยยึดเกาะกับ host surface หลังจากการมีการสร้าง apperssorium แล้ว เชื้อราจะสร้างส่วนที่เป็นเส้นใยบางๆ เป็นปมเล็กๆ (peg penetration) แทงเข้าไปยังผนังชั้นนอกของ epidermal cell ต่อจากนั้นเชื้อราก็จะเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของ host เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ก็จะมีการสร้าง conidia พร้อมที่จะเข้าสู่วงจรของโรคอีกต่อไป (Ou, 1973; Reissig และ คณะ, 1986)

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

การป้องกันและควบคุมโรคใบไหม้โดยใช้สารเคมี

ที่นิยมใช้เช่น Blasticin S , Kasugamycin, Kitazin P, Hinosan, Rabcide, Oryzacmate, Fujione

2. โรคใบวงสีน้ำตาล เกิดจากเชื้อ *Rhynchosporium oryzae*

ลักษณะอาการของโรค ตามปกติเชื้อราจะทำให้ต้นข้าวมีแผลโรคที่ปลายใบและบางครั้งทำให้เกิดแผลโรคที่ขอบหรือส่วนอื่นๆของแผ่นใบ แผลโรคจะเป็นวงรีหรือค่อนข้างกลมเป็นรอยช้ำ ยาวประมาณ 1 - 5 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร การขยายตัวของแผลจะเป็นวงซ้อนกันคล้ายหน้าตัดของเนื้อไม้ยืนต้น ขอบของแต่ละวงจะเป็นสีน้ำตาลแก่ ส่วนพื้นที่ระหว่างวงจะเป็นสีน้ำตาล ใบถูกทำลายอย่างรุนแรงจะแห้งเป็นฟาง และมีวงสีน้ำตาลเหลืออยู่

วงจรของโรค เริ่มจาก conidia ปลิวตกลงบนใบข้าวต่อจากนั้น conidia จะมีการงอก germ tube และเจริญไปเป็นเส้นใยที่มีความแข็งแรง (vigorous hyphae) ซึ่งจะยึดติดกับปากใบข้าวและสร้างโครงสร้างเหมือน appressorium ในขนาดต่างๆ แล้วจึงเข้าสู่ช่องปากใบ การเจริญของเส้นใยในช่วงหลังจากนี้จะมีขนาดหนาขึ้นและเจริญมากมายในช่อง substromatal ผ่านเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์และชั้น mesophyll ตามลำดับก่อนจะสร้างแขนง conidiophores ผ่านชั้นปากใบออกมาเพื่อผลิตสปอร์และพร้อมที่จะเข้าสู่วงโคจรต่อไป (C.A.B., 1985)

การป้องกันและควบคุมโรคใบวงสีน้ำตาลโดยใช้สารเคมี

ไม่นิยมควบคุมโดยสารเคมีเพราะสารฆ่าเชื้อราบางชนิดกระตุ้นให้สปอร์ของเชื้องอก ส่วนใหญ่จะหลีกเลี่ยงปุ๋ยที่มีส่วนผสมของปริมาณไนโตรเจนสูง

3. โรคขอบใบแห้ง เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv.*oryzae*

มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย รูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ที่ส่วนปลายโค้ง มีขนาด 1-2 x 0.8-1 ไมครอน monotrichour flagellum 6-8 ไมครอน เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่มีสปอร์ (Ishima, 1922) มีแคปซูลเมือกเหนียว ลักษณะโคโลนีกลม นูน มีสีเหลืองเข้ม ผิวเรียบ ขอบเรียบ ทึบแสง รงควัตถุสีเหลือง ไม่ละลายน้ำ (Mizukami, 1961)

ลักษณะอาการของโรค เป็นตั้งแต่ระยะกล้า-ออกรวง กล้าก่อนนำไปปักดำมีจุดเล็กๆ ลักษณะช้ำที่ขอบใบของใบล่างๆ ต่อมาประมาณ 7-10 วัน จุดช้ำนี้จะขยายกลายเป็นทางสีเหลืองยาวไปตามใบข้าว ใบที่เป็นโรคจะแห้งเร็ว และสีเขียวจะจางลงเป็นสีเทาๆ โรคในระยะกล้าสังเกตได้ยากสักหน่อย อาการในระยะปักดำจะแสดงหลังปักดำแล้วหนึ่งเดือน ถึงเดือนครึ่ง ใบที่เป็นโรคขอบใบมีรอยขีดช้ำ ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลืองที่แผลมีหยดน้ำสีครีมคล้ายยางสนกลมๆขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด ต่อมาจะกลายเป็นสีน้ำตาลและหลุดไปตามลม น้ำ หรือฝน แผลจะขยายไปตามความกว้างและยาวของใบ บางครั้งขยายเข้าไปข้างใน

ตามเส้นใบทำให้ขอบแผลมีลักษณะเป็นของลายหยัก แผลนี้เมื่อนานเข้าจะเปลี่ยนเป็นสีเทา ใบที่เป็นโรคขอบใบจะแห้ง และม้วนตามความยาว ในบางกรณีที่เชื้อมีปริมาณสูงเข้าทำลายทำให้ท่อน้ำ ท่ออาหารอุดตัน ต้นข้าวทั้งต้นจะเหี่ยวเฉาและตายโดยรวดเร็ว

การป้องกันและกำจัด ใช้พันธุ์ข้าวที่ต้านทาน เช่น กข 5 กข 7 หรือใช้ยาเคมี ฟีนาซินในเวลาที่เหมาะสม ตามคำแนะนำของนักวิชาการและอย่าใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากในดินที่อุดมสมบูรณ์

4. โรคกาบใบแห้งเกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ พบว่ามีการแพร่ระบาดทำความเสียหายในนาข้าวเพิ่มขึ้นทุกปี โดยเฉพาะกับพันธุ์ข้าวที่ใส่ปุ๋ยมากให้ผลผลิตสูง

ลักษณะอาการของโรค พบในข้าวระยะแตกตอเป็นต้นไป ยิ่งต้นข้าวเบียดแน่น โรคนี้จะรุนแรง ลักษณะแผลสีเขียวปนเทาของแผลมีสีน้ำตาลไหม้ขนาด 1-4 x 2-10 มม. ปรากฏตามกาบใบตรงใกล้ระดับน้ำ แผลจะขยายใหญ่จนมีขนาดไม่จำกัดและลุกลามขยายขึ้นใบข้าว ถ้าเป็นพันธุ์ข้าวอ่อนแอ แผลสามารถลุกลามถึงใบข้าวและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยว ผลผลิตลดลงเป็นอย่างมาก เชื้อราสามารถสร้างเม็ดขยายพันธุ์ อยู่ได้นานในตอซังหรือวัชพืชในนาหรือตามดินนา และมีชีวิตข้ามฤดูหมุนเวียนทำลายข้าวได้ตลอดฤดูการทำนา

การป้องกันกำจัด

1. เผาตอซัง, กำจัดวัชพืช และพลิกไถหน้าดิน เพื่อลดโอกาสการทำลายของเม็ดขยายพันธุ์
2. ใช้พันธุ์ข้าวต้านทานเช่น กข 13 เป็นต้น
3. ใช้ยาเคมี เช่น วาลิดาไมซิน, เบนเลท หรือฮิโนซาน ตามคำแนะนำของนักวิชาการ

การนำ *B. subtilis* มาใช้ในการป้องกันโรคข้าว

นลินีและคณะ (2534) ได้ทำการศึกษาป้องกันกำจัดโรคข้าวที่สำคัญโดยใช้เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 และ B1 ซึ่งแยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวและทดสอบเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวในระดับปฏิบัติการพบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 จะควบคุมการเกิดโรคเป็นแบบ antibiosis ในขณะที่ *B. subtilis* NSRS 89-26 และ B1 จะควบคุมเป็นแบบ parasitism เนื่องจากสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในอาหารวุ้น เมื่อเทียบกับเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคข้าว ดังนั้นการทดสอบในขั้นต่อไปจึงเป็นการศึกษาเพื่อหาข้อมูลที่ละเอียดในด้านสมบัติและการเจริญของตัวเชื้อ *B. subtilis* ในสภาวะและอาหารต่างๆ และกลไกการออกฤทธิ์ การผลิตสารปฏิชีวนะและผลต่อเซลล์และการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะเซลล์ สภาวะการเจริญและการดำรงชีพของเชื้อ antagonist *B.subtilis*
2. ทดสอบการยับยั้งหรือการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและรา สาเหตุโรคข้าวโดยเซลล์ *B.subtilis*
3. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดยสารปฏิชีวนะและสารระเหยที่ผลิตจาก *B. subtilis*

วิธีการทดลอง

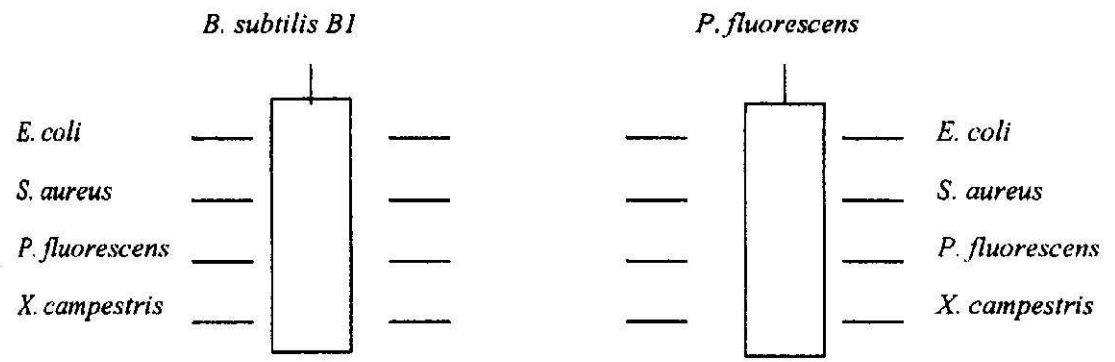
1. <u>การศึกษาลักษณะเซลล์ สภาวะการเจริญและการดำรงชีพของของเชื้อ *B. subtilis*</u>

นำเชื้อ *Bacillus* ทั้งสามสายพันธุ์ คือ NSRS 89-24, NSRS 89-26 และ B1 ที่แยกบริสุทธิ์แล้วมาอย่างละ 1 loop มาเขี่ยเชื้อบนอาหารวุ้นให้มีการกระจายจนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว แล้วจึงนำโคโลนีเดี่ยวมาย้อมสีแกรม แล้วส่องกล้องดูลักษณะของเซลล์และสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวไปเพาะต่อบนอาหารวุ้น เช่น Nutrient Agar (NA) Potato Dextrose Agar (PDA) และ Czapek Dox Agar (CDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 37 ^{0}ซ ทิ้งไว้ค้างคืน นำมาย้อมหาลักษณะและปริมาณของสปอร์ที่เกิดขึ้น ตรวจลักษณะการเคลื่อนที่ของเชื้อ *Bacillus* ในอาหารวุ้นโดยสังเกตจากการแผ่ของโคโลนีออกไปรอบๆ

2. <u>การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง (*X. campestris* pv.*oryzae*)</u>

2.1 การเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *B. subtilis* B1 กับเชื้อ *P. fluorescens* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยวิธี paper-strip

1. เขียนชื่อแบคทีเรียทดสอบชนิดต่างๆ ดังรูป
2. ลงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดตามรอยเส้นที่กำหนดไว้ โดยใช้ loop แตะเชื้อจาก NA slant ลากเป็นเส้นตรง
3. นำ *B. subtilis* B1 อายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 loop จุ่มลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มล. ปั่นด้วย vortex mixer
4. จุ่มกระดาษกรองขนาด 1 x 6 ซม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในข้อ 3 หลังจากนั้น นำไปวางบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ลงเชื้อทดสอบไว้
5. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1-4 แต่เปลี่ยนเชื้อแบคทีเรียเป็น *P. fluorescens* แทน *B. subtilis* B1
6. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30^{0}ซ นาน 48 ชั่วโมง ดูผลการเจริญของเชื้อต่างๆ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ทุกๆ การทดลองจะทำ 2 ซ้ำ



รูปที่ 1 แสดงเชื้อทดสอบที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *B. subtilis* B1 และ *P. fluorescens* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

2.2 การศึกษาอายุของ *B. subtilis* B1 และ *P. fluorescens* ที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญ *X. campestris pv.oryzae*

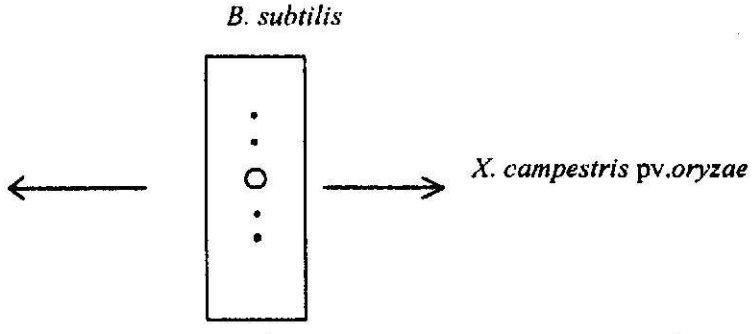
1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X.. campestris* pv.*oryzae* ในอาหาร NB ปริมาตร 10 มล. ในหลอดแก้วทดลองขนาด 15x100 มม. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญโดยวัดค่า OD_{660} บันทึกผล
2. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B1 กับ *P. fluorescens* อายุ 10, 18 และ 24 ชั่วโมง ในอาหาร NB ปริมาตร 10 มล. ในหลอดแก้วทดลองขนาด 15x100 มม. ที่อุณหภูมิ 30°ซ
3. นำ *B. subtilis* B1 และ *P. fluorescens* ที่อายุต่างๆ ไปวัดค่า OD_{660} และเก็บส่วนหนึ่งไว้สำหรับทดสอบ
4. นำ *X. campestris* pv.*oryzae* จากข้อ 1 ปริมาตร 0.1 มล. Spread ลงบน NA
5. นำ *B. subtilis* B1 และ *P. fluorescens* ที่เก็บไว้ในข้อ 2 ปั่นความเร็ว 4,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายปราศจากเซลล์ 0.1 มล. หยอดลงใน cup ซึ่งวางอยู่บนข้อ 4
6. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30° ซ ดูผลเมื่อ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงสำหรับผลที่แสดงเป็นอายุ 72 ชั่วโมง

2.3 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารต่อการสร้างยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* B1

1. เลี้ยง *B. subtilis* B1 ในอาหารทั้ง 4 สูตร ปริมาตรอาหารแต่ละชนิด 100 มล. ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด

2.4 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* B1 (ดัดแปลงวิธีทดสอบของคู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป 327-202)

1. เลี้ยง *B. subtilis* B1 ในอาหารเหมือนการทดลองที่ 3 ทั้ง 4 สูตร ปริมาตรอาหารแต่ละชนิดในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปกรองโดย Millipore filter ขนาดรูแผ่นกรอง 0.45 μ เก็บสารละลายปราศจากเซลล์ไว้ทดสอบ
2. ลงเชื้อ *X. campestris* pv.*oryzae* จาก PPA slant อายุ 72 ชั่วโมง จำนวน 1 loop ตรวจจุดศูนย์กลางของจานเพาะเลี้ยง PPA แบ่งครึ่ง ลากเป็นสองทาง
3. นำกระดาษกรองจุ่มลงในสารละลายปราศจากเซลล์ที่ได้จากข้อ 1 วางตั้งฉากกับ ข้อ 2 ที่จุดศูนย์กลางของจานเพาะเลี้ยง
4. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อทดสอบ



รูปที่ 3 แสดงเชื้อทดสอบเพื่อดูความสามารถของเชื้อ *B. subtilis* B1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. campestris* pv.*oryzae*

2.5 การศึกษาหาปริมาณเชื้อทดสอบที่ควรใช้ เมื่อใช้สารละลายปราศจากเซลล์ของเชื้อ *B. subtilis* B1 ปริมาตร 0.5 มล.

1. การเตรียมเชื้อทดสอบ *X. campestris* pv.*oryzae*
   1.1 เลี้ยง *X. campestris* pv.*oryzae* ในอาหาร PPB ปริมาตร 10 มล. ในหลอดแก้วทดลอง ขนาด 15x100 มม. บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที. เป็นเวลา 3 วัน
   1.2 นำเชื้อที่ได้วัดความเจริญ โดยวัดค่า OD_{660} บันทึกผล
   1.3 เจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-5} ใช้ PPB เป็นตัวเจือจาง suspension ของเชื้อต่อหลอด คือ 10 มล.
2. การเตรียมสารละลายปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* B1
   2.1 เลี้ยง *B. subtilis* B1 ในอาหาร CDB + 1% yeast extract ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที. เป็นเวลา 3 วัน
   2.2 นำเชื้อที่ได้มากรองโดย Millilpore filter ที่มีรูขนาด 0.45 μm เก็บสารละลายปราศจากเซลล์ไว้ทดสอบ

3. นำสารละลายปราศจากเซลล์ 0.5 มล. ใส่ในข้อ 1.3 ทุกๆ ค่าความเข้มข้นเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นวัดการเจริญของเชื้อ *X. campestris* pv.*oryzae* โดยวัดค่า OD_{660} เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ใส่สารละลายปราศจากเซลล์ ซึ่งเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน

2.6 การศึกษาหาปริมาณของสารละลายปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* B1 ที่ควรใช้เมื่อใช้เชื้อทดสอบที่กำลังความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-3}

1. การเตรียมเชื้อทดสอบ *X. campestris* pv.*oryzae*
   1.1 เลี้ยง *X. campestris* pv.*oryzae* ในอาหาร PPB ปริมาตร 10 มล. ในหลอดแก้วทดลองขนาด 15x100 มม. บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน
   1.2 นำเชื้อที่ได้วัดการเจริญโดยวัดค่า OD_{660} บันทึกผล
   1.3 เจือจางเชื้อทดสอบให้มีความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-3} ใช้ PPB เป็นตัวเจือจาง suspension ของเชื้อต่อหลอด คือ 10 มล.
2. การเตรียมสารละลายปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* B1
   2.1 เลี้ยง *B. subtilis* B1 ในอาหาร CDB +1% yeast extract ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน
   2.2 นำเชื้อที่ได้มากรองโดย Millipore filter ขนาดรูแผ่นกรอง 0.45 μ เก็บสารละลายปราศจากเซลล์ไว้ทดสอบ
3. นำสารละลายปราศจากเซลล์ 1 มล. และ 2 มล. ใส่ในข้อ 1.3 ทุกๆค่า ความเข้มข้น เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นวัดการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวัดที่ OD_{660} เปรียบเทียบกับ OD_{660} ของ *X . campestris* pv.*oryzae* ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-3} ที่ไม่ใส่สารละลายปราศจากเซลล์ (control) ซึ่งเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน

2.7 การหาค่า MIC โดย tube dilution method

1. การเตรียมเชื้อทดสอบ *X. campestris* pv.*oryzae*
   1.1 เลี้ยง *X. campestris* pv.*orryzae* ในอาหาร PPB ปริมาตร 10 มล. ในหลอดแก้วทดลอง ขนาด 15x100 มม. บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน
   1.2 เจือจางเชื้อทดสอบความเข้มข้น 10^{-3}
2. การเตรียมสารละลายปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* B1
   2.1 เลี้ยง *B. subtilis* B1 ในอาหาร CDB +1% yeast extract ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน
   2.2 นำเชื้อที่ได้กรองโดย Millipore filter ขนาดรูแผ่นกรอง 0.45 μ เก็บสารละลายปราศจากเซลล์ไว้ทดสอบ

3. เตรียมสารละลายปราศจากเซลล์ ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับสารละลายปราศจากเซลล์ที่ไม่ได้เจือจาง ตามตารางที่ 1

   3.1 เขียนเลขกำกับที่หลอดตั้งแต่หลอดที่ 1 ถึง 10

   3.2 นำ 0.5 มล. PPB ใส่ในหลอดที่ 2 ถึง 10

   3.3 นำ 0.5 มล. ของสารละลายปราศจากเซลล์ใส่ในหลอดที่ 1 และ 2 ผสมสารละลายในหลอดที่ 2 ให้เข้ากัน จากนั้นนำมา 0.5 มล. ใส่ในหลอดที่ 3 ผสมให้เข้ากันแล้วดูดใส่หลอดที่ 4 จำนวน 0.5 มล. ทำซ้ำกันเช่นนี้จนถึงหลอดที่ 9 แล้วนำ 0.5 มล. จากหลอดที่ 9 ทิ้ง

ตารางที่ 1 แสดงการเจือจางของสารละลายปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* B1

หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PPB (มล.)	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
สารละลายปราศจากเซลล์ (มล.)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
เชื้อทดสอบ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Final dilution	1:2	$1:2^2$	$1:2^3$	$1:2^4$	$1:2^5$	$1:2^6$	$1:2^7$	$1:2^8$	$1:2^9$	-

4. ใส่เชื้อทดสอบที่ไม่ได้เจือจางลงในหลอดทุกหลอด หลอดละ 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน
5. เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน
6. สังเกตดูความขุ่นใสในแต่ละหลอด ซึ่งจะบ่งบอกถึงการเจริญของเชื้อทดสอบอ่านค่า MIC โดยค่าความเข้มข้นของหลอดสุดท้ายที่ใส คือ MIC บันทึกผล
7. ดูดเชื้อ 0.1 มล. จากหลอดที่ใสทุกหลอดนำไปเกลี่ยบน PPA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง อ่านค่า MBC

สำหรับการทดลองนี้ได้มีการแปรผันเชื้อทดสอบตรงข้อ 4 คือ การทดลองหาค่า MIC อีกชุดหนึ่งจะใช้เชื้อทดสอบที่เจือจาง 10^{-3} เท่าด้วย

3. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* และสารที่ผลิต

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

ใช้ที่เจาะรู (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. เจาะโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิดตรงตำแหน่งปลายของเส้นใยที่กำลังเจริญ นำมาวางยังตำแหน่งตรงกลางวุ้นอาหาร PDA จานใหม่ เพาะเลี้ยง

ที่อุณหภูมิ 25 °ซ จนโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2 ซม. นำ *B. subtilis* NSRS 89-24 ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ปริมาตร 5 µl มาหยดห่างจากโคโลนีของเชื้อรา 2 ซม. นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5 วัน ตรวจดูผลทุกวัน โดยตรวจดูขอบเขตของการยับยั้ง (clear zone) และความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* หลังจากปลายด้านหนึ่งด้านใดของเชื้อราเจริญถึงขอบจานเพาะเชื้อ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยราบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยทำการตัดเส้นใยมาย้อมดูด้วยน้ำยา lactophenol cotton blue ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะเส้นใยบริเวณเชื้อราที่ใช้เป็นชุดควบคุมซึ่งเป็นบริเวณที่เส้นใยของเชื้อราไม่ถูกยับยั้งโดย *B. subtilis* NSRS 89-24

3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. Subtilis* NSRS 89-24

3.2.1 การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในการผลิตสารปฏิชีวนะ

3.2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (stock culture)

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

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

เติมหัวเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เริ่มต้นที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.1.1 (4 % ของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในอาหารเหลว NB, PDB และ CDB ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสค์ขนาด 500 มล. แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดนำไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 g นาน 20 นาที เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียออก นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่ได้ทำการทดลองตามข้อ 3.2.1.3 ต่อไป

3.2.1.3 การเตรียมวุ้นอาหารผสมสารปฏิชีวนะ

นำสารปฏิชีวนะซึ่งละลายอยู่ในส่วนเหลวที่ได้จาก ข้อ 3.2.1.2 มาผสมกับวุ้นอาหาร PDA ในอัตราส่วน 1000 มล.ต่อวุ้นอาหาร PDA 39 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. จานละ 6 มล. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปทดสอบในขั้นต่อไป สำหรับจานควบคุมเตรียมโดยใช้อาหารเหลวแต่ละชนิด ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 นำไปผสมกับวุ้นอาหาร PDA เช่นเดียวกัน

3.2.1.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

นำก้อนเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. มาวางลงตำแหน่งตรงกลางบนอาหาร PDA ซึ่งเตรียมได้จาก ข้อ 3.2.1.3 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จานเลี้ยงเชื้อ นำมาบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทุกวันในแนวตั้งฉากกันแล้วหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติในเรื่องความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT VERSION 9.2 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยวิธี F-test และคำนวนหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร (Gamlicl และคณะ, 1989)

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

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

3.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด

3.2.2.1 เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ตามข้อ 3.1.1.1

3.2.2.2 เลือกอาหารชนิดที่ดีที่สุดที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งทราบจากผลการทดลองในข้อ 3.2.1 คืออาหาร PDB มาเตรียมการทดลองโดยใส่ในฟลาสค์ขนาด 500 มล.ปริมาตร 100 มล.จำนวน 8 ฟลาสค์

3.2.2.3 เติมเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เริ่มต้นลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ใน ข้อ 3.2.2.2 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ 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 นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่เก็บได้แต่ละวันมาทดสอบตามวิธีการในข้อ 3.2.1.3 และ 3.2.1.4 ตามลำดับ

3.2.3 วิธีการสกัดสารปฏิชีวนะ

ทำการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหารและระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้ข้อมูลจากผลการทดลองข้อที่ 3.2.1 และ 3.2.2 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* NSRS 89-24 ที่ตกตะกอนทิ้ง นำส่วนใสมาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 2 ด้วยสารละลาย 12 N HCl จากนั้นจึงนำไปปั่นอีก

ครั้งที่ความเร็ว 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 (รูปที่ 4)

3.2.4 การทดสอบความสามารถของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

นำสารปฏิชีวนะที่สกัดได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* โดยวิธี agar disc diffusion (Lorian, 1980) โดยเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* ที่อุณหภูมิ 25 °ซ จนมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 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 °ซ เป็นเวลา 5 วัน สังเกตบริเวณที่มีการยับยั้ง (clear zone) ทุกวัน

3.2.5 การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

หลังจากทดสอบตามข้อ 3.2.4 และมี clear zone เกิดขึ้นแล้ว ทำการตัดเส้นใยบริเวณส่วนปลายที่อยู่ใกล้กับสารปฏิชีวนะนำมาย้อมด้วย lactophenol cotton blue ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Phae, 1992) สังเกตลักษณะของเส้นใยของเชื้อราหลังจากสัมผัสสารปฏิชีวนะเปรียบเทียบกับเส้นใยในชุดควบคุม

3.3 การศึกษาการผลิตและฤทธิ์ของสารระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24

3.3.1 การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการผลิตสารระเหย

3.3.1.1 การเตรียม stock *B. subtilis* NSRS 89-24 (ตามข้อ 3.2.1.1) จากนั้นดูดหัวเชื้อปริมาตร 200 µl หยดลงบนจานอาหาร PDA NA และ CDA (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มม) เกลี่ยเชื้อบนอาหารให้กระจายทั่ว

3.3.1.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

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

3.3.1.3 การทดสอบ

นำจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (จากข้อ 3.3.1.1) มาประกบกับจานอาหารที่เพาะเชื้อราสาเหตุโรคข้าว (จากข้อ 3.3.1.2) แล้วปิดรอบจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองเข้าด้วยกันโดยใช้แผ่นพาราฟิล์มพันรอบเพื่อป้องกันไม่ให้สารระเหยที่ *B. subtilis* NSRS 89-24 ผลิตรั่วออกจากจานเลี้ยงเชื้อทั้งสอง

โดยวางให้จานอาหารที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 อยู่ด้านบนนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราทุกวันเป็นเวลา 5 วัน (Fiddaman และ Rossall, 1993) นำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.4 สำหรับชุดควบคุมใช้จานอาหารแต่ละชนิดที่ไม่มี *B. subtilis* NSRS 89-24 มาประกบกับเชื้อราในแต่ละชุดทดสอบทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารผลิตชนิดระเหย

3.3.2.1 การทดสอบผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเจริญของเส้นใยราการทดลองนี้แบ่งทำเป็นสองกรณี ดังนี้

ก. ทำการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 บนอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารระเหยที่ดีที่สุดจากผลการทดลองข้อ 3.3.1 คือบนอาหาร PDA ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.3.1.3 โดยนำจานอาหารที่วางก้อนเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. มาประกบกับจานที่มีเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราที่นำมาทดสอบได้แก่ *P. grisea* *R. oryzae* และ *R. solani* ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราทุกวันจนครบ 3 วัน หรือจนกระทั่งขนาดโคโลนีของราในจานทดสอบไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับเชื้อ *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญรวดเร็วมาก วัดผลการทดลองเมื่อเชื้อในจานควบคุมโตเต็มจานจากนั้นทำการตัดเส้นใยบริเวณริมนอกสุดของโคโลนีราในจานทดสอบมาย้อมด้วย lactophenol cotton blue ตรวจดูลักษณะของเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับ เชื้อราในชุดควบคุมในการทดลองนี้ได้ใช้เชื้อ *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 °ซ ต่ออีก 2 วัน ทำการบันทึกขนาดของโคโลนี ดูผลของการยับยั้งว่าเป็นแบบชั่วคราวหรือถาวร

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

3.3.2.2 การทดสอบผลของสารผลิตชนิดระเหย ต่อการงอกของสปอร์รา *R. oryzae*

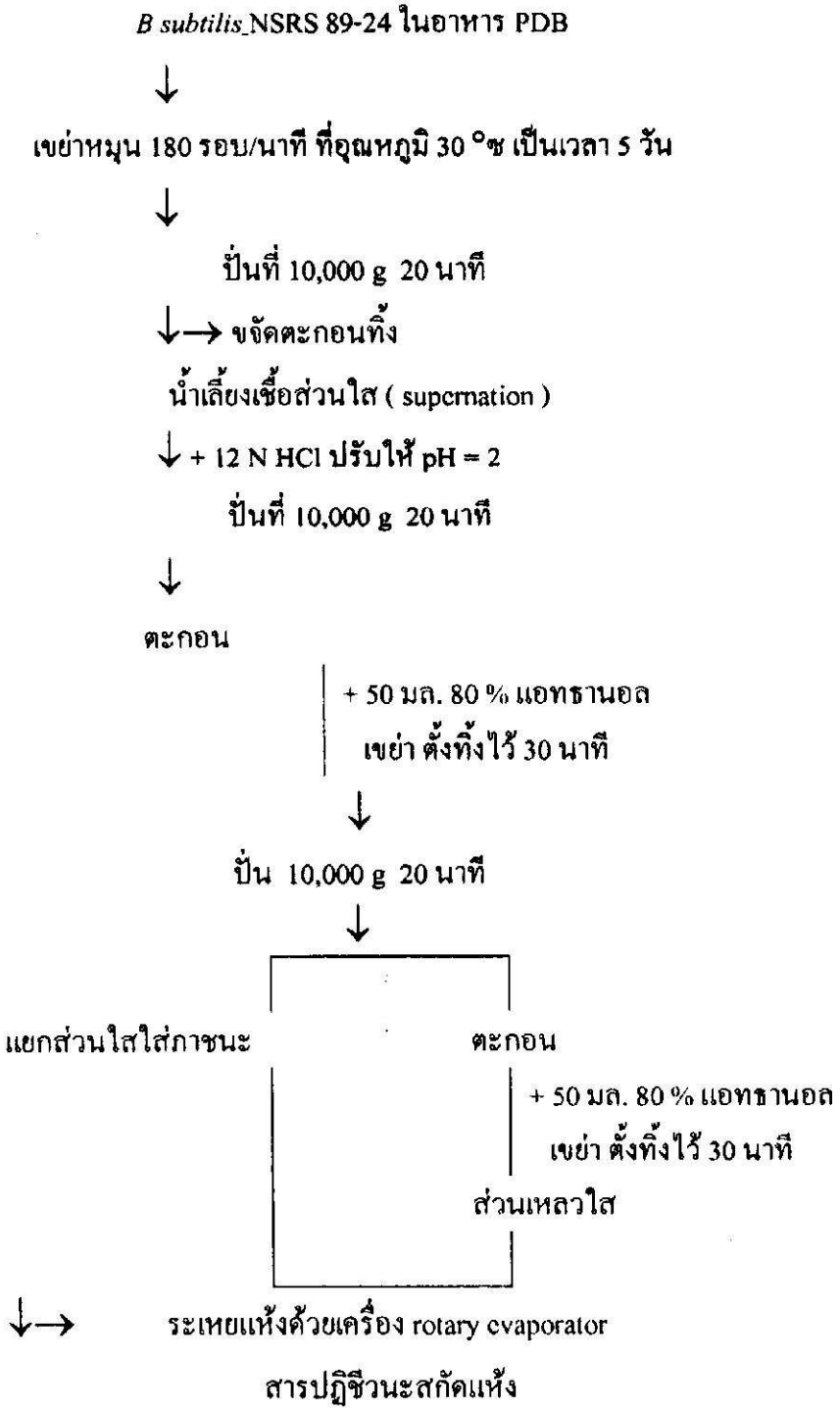
สปอร์ที่ใช้ทดลองคือสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae* ทำการเตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธี Phae และคณะ (1992) โดยเลี้ยงเชื้อรา *R. oryzae* บนอาหาร PDA ให้เจริญเต็มจานเพาะเชื้อนาน 10 วัน ดูดน้ำกลั่นไร้เชื้อใส่บนจานเพาะเชื้อ *R. oryzae* ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้กระจายทั่ว นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านผ้าก๊อซไร้เชื้อที่ซ้อนกัน 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 3.3.1 คืออาหาร PDA นำมาประกบกับจานที่มีสปอร์เข้าด้วยกัน ปิดจานทั้งสองด้วยแผ่นพาราฟิล์มนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ ตรวจดูความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับสปอร์ โดยเปิดจานอาหารเพาะเชื้อที่เลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 แต่ละชุดการทดลองออกจากจานอาหารเพาะเชื้อที่เลี้ยงสปอร์เชื้อรา เมื่อเวลา 8, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และนำไปตรวจดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือมีเฉพาะสปอร์ราที่งอกตามภาวะปกติ แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำโดยใช้หลักการว่าสปอร์ที่งอกหมายถึงสปอร์ที่มี germ tube มีความยาวเป็นครึ่งหนึ่งของขนาดสปอร์เดิม

3.3.2.3 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 °ซ เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูความสามารถในการงอกของเม็ด sclerotium ทุกวันบันทึกผล



รูปที่ 4 แผนผังการสกัดสารปฏิชีวนะอย่างหยาบดัดแปลงจากวิธีการ ของ McKeen และคณะ (1986)

ผลการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะเซลล์ สภาวะการเจริญและการดำรงชีพของเชื้อ Antagonist *B.subtilis*

การหาลักษณะและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* ทั้งสามสายพันธุ์คือ NSRS 89-24 และ 89-26 และ B1 นั้น พบว่าเมื่อย้อมสีแกรม และส่องตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบการติดสีเป็นเชื้อแกรมบวกรูปร่างเป็นแท่งมี เอนโดสปอร์ อยู่ตรงกลางเซลล์ เมื่อเพาะเชื้อบนอาหารวุ้น NA และ PDA เป็นเวลา 1 วัน พบว่าทั้งสามเชื้อสามารถเคลื่อนที่ในอาหารวุ้นด้วยความเร็วแตกต่างกัน โดยเฉพาะสายพันธุ์ NSRS 89-26 และ B1 สามารถเคลื่อนที่ได้ดีกว่าสายพันธุ์ NSRS 89-24 เป็นอย่างมากและทั้ง NSRS 89-24 และ 89-26 เป็นสายพันธุ์ที่สร้าง pigment สีชมพูอมแดง โดยดูสีของ colony บนอาหารวุ้น PDA เจริญได้ดีทั้งอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 30° ซ และเชื้อทั้งสามสายพันธุ์สร้างสปอร์ในอาหารวุ้นได้มากกว่า 90% หลังจากบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-26 และ B1 เมื่อบ่มนาน 1 วัน พบว่ามีการขยายของ colony แผ่ออกไปเป็นโซนกว้างมาก เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ NSRS 89-24 B.*subtilis* ทั้งสามสายพันธุ์เมื่อเพาะบนอาหารวุ้นที่เหมาะสำหรับเลี้ยงเชื้อรา เช่น CDA หรือ PDA เชื้อ *Bacillus* ทั้งสามสายพันธุ์ดังกล่าวก็สามารถเจริญเติบโตได้ดี

โดยสรุปเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24, 89-26 และ B1 เป็นเชื้อเจริญได้เร็วใช้อาหารวุ้นทั่วไปที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียหรืออาหารสำหรับเชื้อราก็เจริญได้ดีให้สีและลักษณะของโคโลนีที่แยกจากเชื้ออื่นๆ ได้อย่างเห็นได้ชัด

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง (X.*campestris* pv.*oryzae*)

2.1 ผลการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *B.subtilis* B1 กับ *P.fluorescens* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

ตารางที่ 2 การยับยั้งเชื้อทดสอบของ *B.subtilis* B1 กับ *P.fluorescens* โดยวิธีการ paper strip

เชื้อทดสอบ	ความสามารถในการยับยั้ง	
	B.subtilis B1	*P.fluorescens*
E.coli	-	-
S.aureus	-	-
P.fluorescens	+	-
B.subtilis B1	-	+
X.campestris	++	++

หมายเหตุ ++ ยับยั้ง , + ยับยั้งเล็กน้อย, -ไม่ยับยั้ง

2.2 ผลอายุของเชื้อ *B. subtilis* B1 กับ *P. fluorescens* ที่มีต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญ *X. campestris* pv.*oryzae*

ตารางที่ 3 การเจริญของเชื้อชนิดต่างๆ ในระยะเวลาต่างกัน

แบคทีเรีย	การเจริญ (OD_{660}) ที่ระยะเวลาต่างๆ		
	10 ชม.	18 ชม.	24 ชม.
B. subtilis B1	0.05	0.15	0.13
P. fluorescens	0.04	0.10	0.111
X. campestris	-	-	0.34 *

หมายเหตุ - ไม่ได้วัด

* เลี้ยงโดยการเขย่า 200 รอบ/นาที

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. campestris* pv.*oryzae* เมื่อใช้สารละลายปราศจากเซลล์ที่อายุต่างกัน

สารละลายปราศจากเซลล์ของเชื้อ	ความสามารถในการยับยั้ง *X. campestris*		
	10 ชม.	18 ชม.	24 ชม.
B. subtilis B1	-	++	+++
P. fluorescens	-	+	-

2.3 ผลของอาหารต่อการสร้างยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* B1

ตารางที่ 5 ผลของอาหารต่อการสร้างยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* B1 โดยวิธี paper-strip

สูตรอาหาร	ความสามารถในการยับยั้ง *X. campestris* pv. *oryzae* ที่อายุ 72 ชั่วโมง
CDB + 1% yeast extract	+++
NB	++
Mckeen และคณะ	-
Sandrin และคณะ	+

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

2.4 ผลของอาหารต่อการสร้างยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* B1

ตารางที่ 6 การยับยั้งเชื้อทดสอบโดยยาปฏิชีวนะจากเชื้อ *B. subtilis* B1 เมื่อใช้อาหารสูตรต่างกัน

สูตรอาหาร	ความสามารถในการยับยั้ง *X. campestris* pv. *oryzae*
CDB +1% yeast extract	++
NB	-
Mckeen และคณะ	-
Sandrin	+

2.5 ผลปริมาณเชื้อทดสอบที่ควรใช้ เมื่อใช้สารละลายปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* B1 ปริมาตร 0.5 มล.

ตารางที่ 7 การหาปริมาณเชื้อทดสอบที่ควรใช้ เมื่อใช้สารละลายปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* B1 ปริมาตร 0.5 มล.

เชื้อทดสอบที่กำลัง	การเจริญของเชื้อทดสอบที่ OD_{660}	
	control	สารละลายปราศจากเซลล์ 0.5 มล
10^{-1}	1.0245	1.002
10^{-2}	1.0195	1.002
10^{-3}	-0.033	0.006
10^{-4}	-0.036	-0.003
10^{-5}	-0.029	-0.004

2.6 ผลปริมาณของสารละลายปราศจากเซลล์ที่ควรใช้ เมื่อใช้เชื้อทดสอบที่กำลังเจือจาง 10^{-1}-10^{-3}

ตารางที่ 8 การหาปริมาณสารละลายปราศจากเซลล์ที่ควรใช้ เมื่อใช้เชื้อทดสอบที่กำลังเจือจาง 10^{-1}-10^{-3}

สารละลายปราศจากเซลล์	การเจริญของเชื้อทดสอบที่กำลังเจือจางต่างๆกัน (OD_{660})		
(มล.)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
0	0.792	0.724	0.450
1	0.159	0.157	0.024
2	-0.021	-0.016	-0.013

2.7 ค่า MIC และ MBC ของสารละลายปราศจากเซลล์ *B. subtilis* B1

ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *X.campestris* pv.*oryzae* คือ 1:8 (อัตราส่วนการเจือจางสารละลายปราศจากเซลล์)

ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) *X.campestris* pv.*oryzae* คือ 1:4 (อัตราส่วนการเจือจางสารละลายปราศจากเซลล์)

3. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24

จากการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 °ซ จนโคโลนีเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ซม. จึงหยดเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อราทั้งสองอยู่ โดยให้ห่างจากปลายเส้นใยของเชื้อราประมาณ 2 ซม. จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงภายในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ 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 actophenol 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. ซึ่งบรรจุอาหารเหลว ปริมาตร 100 มล. อาหารที่ใช้คือ PDB CDB และ NB เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วที่ 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ 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 *R. oryzae* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. มาเลี้ยงใน

จานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ผลการทดลองพบว่าอาหาร PDB ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ อาหาร CDB และ NB ตามลำดับ โดยพบว่าอาหาร PDB และ CDB นั้นมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญ *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 9) สำหรับของ *R. oryzae* นั้นถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะที่ *B. subtilis* NSRS 89-24 ผลิตขึ้นในอาหารทั้งสามชนิดคือ PDB CDB และ NB อย่างมีนัยสำคัญด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 98.42 , 77.03 และ 53.85 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) สรุปได้ว่าสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของเส้นใยราของทั้ง *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 3.2 ปริมาตร 100 มล.จำนวน 7 ขวด แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ 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 °ซ เป็นเวลา 5 วันทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีรา เทียบกับชุดควบคุมและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ผลการทดลองพบว่ามีการสร้างสารปฏิชีวนะตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้จากขนาดโคโลนีทั้งของ *P. grisea* และ *R. oryzae* เล็กกว่าในจานควบคุม โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 71.29 และ 98.17 ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อมากขึ้นเชื้อราทั้งสองจะถูกยับยั้งมากขึ้นด้วย (รูปที่ 7) ระดับการยับยั้งสูงเพิ่มขึ้นมากในวันที่ 4 ของอายุ *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยที่ *P. grisea* และ *R. oryzae* ถูกยับยั้งคิดเป็น 86 และ 98.42 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และยับยั้งได้สมบูรณ์เมื่ออายุของ *B. subtilis* NSRS 89-24 คือ 5 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° ซ 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 8 และรูปที่ 9 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 8B และรูปที่ 9B) แตกต่างจากเส้นใยในด้านที่ไม่มี *B. subtilis* NSRS 89-24 ซึ่งมีรูปร่างลักษณะปกติอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 8C และรูปที่ 9C) ลักษณะที่ผิดปกตินี้เป็นไปในลักษณะเดียวกับเส้นใยจากบริเวณยับยั้งที่ทดสอบด้วยตัวเชื้อ *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* โดยให้จานเลี้ยงเชื้อราแต่

ละชนิดอยู่ด้านล่างของจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ปิดจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองด้วยแผ่นพาราฟิล์มนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25 °ซ 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 11) และเมื่อทดสอบกับเชื้อ *R. oryzae* ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน อาหารที่ดีที่สุดคือ PDA และ CDA รองลงมาได้แก่ NA โดยมีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเท่ากับ 95.80, 95.60 และ 39.73 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

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 $\pm$ 0.37 และ 8.45 $\pm$ 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 $\pm$ 0.45 และ 14.12 $\pm$ 0.42 มม. ตามลำดับ (ตารางที่ 13) แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะชนิดระเหยนี้มีฤทธิ์เพียงการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราแบบชั่วคราวเท่านั้น

สำหรับการทดสอบกับเชื้อราที่เจริญแล้วโดยทำการเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* มาก่อนเป็นเวลา 2 วันจนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของ *P. grisea* และ *R. oryzae* มีขนาดเท่ากับ 17.2 และ 17.8 มม. ตามลำดับก่อนนำมาประกบกับจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5 วัน พบว่าสารผลิตชนิดระเหยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยที่มีการเจริญมาแล้วได้โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ได้ใกล้เคียงกันคือ 66.04 และ 63.97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 14) แต่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะต่ำกว่าการทดสอบกับเชื้อที่เริ่มเพาะเลี้ยงใหม่ๆ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราเริ่มต้น 5 มม.) ซึ่งถูกยับยั้งได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11 และ 12)

3.7.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารผลิตชนิดระเหยจากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไป

B. subtilis ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้มาจากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา และไม่มีประวัติว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชหรือผลิตสารชนิดระเหย เมื่อนำมาทดสอบพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไปนี้สามารถสร้างสารระเหยที่มีฤทธิ์ต้านราได้ (ตารางที่ 15) 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 โดยให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 93.49 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16) ในขณะที่ถ้ามีการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มาก่อนเป็นเวลา 1 วันก่อนประกบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. solani* จะพบว่าเชื้อ *R. solani* จะถูกยับยั้งได้ดีกว่าการประกบเชื้อราพร้อมกับเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 จะไม่พบว่ามีเส้นใยงอกจากก้อนเชื้อตั้งต้นเลย ค่าการยับยั้งที่คำนวณได้เท่ากับ 98.97 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16) แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มาก่อน 1 วัน ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่ สามารถผลิตสารชนิดระเหยได้ทันทีเมื่อนำมาประกบกับเชื้อราทดสอบทำให้เห็นผลการยับยั้งได้ชัดเจนกว่าการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียพร้อมกับเชื้อรา

3.7.4 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

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

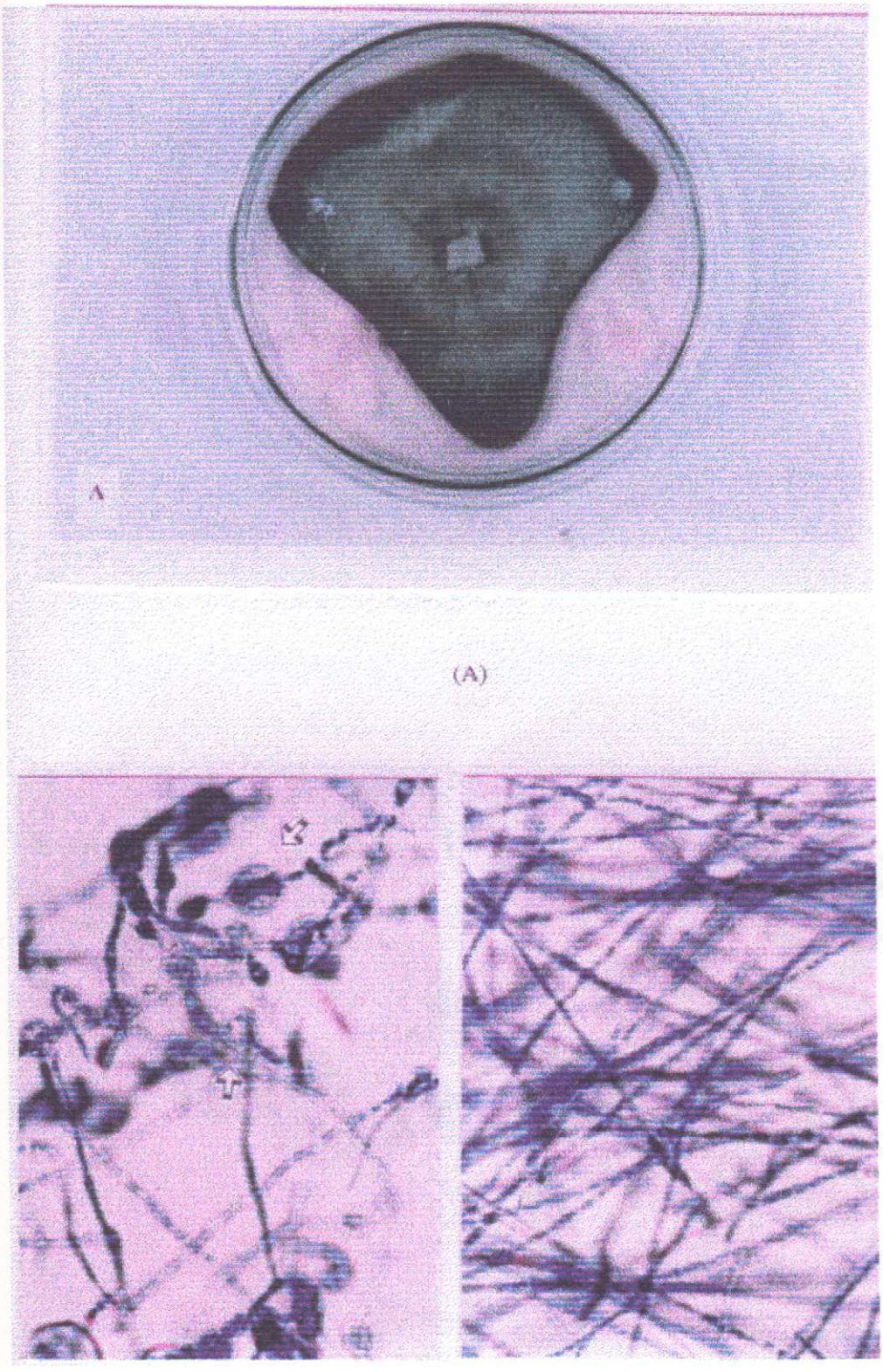
3.7.5 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae*

จากการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25^{0} ซ เป็นเวลา 1 วัน ก่อนประกบกับจานอาหาร PDA ที่เกลี่ยสารละลายแขวนลอยของสปอร์เชื้อราที่มีจำนวนสปอร์ 10^{5} สปอร์/มล. จำนวน 200 µl ปิดจานทั้งสองด้วยแผ่นพาราฟิล์มนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25^{0} ซ นาน 8, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ทำการเปิดจานเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ออกไปแล้ว นำจานอาหารที่มีสปอร์ของ *R.oryzae* มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (เพื่อนับจำนวนสปอร์งอกและ

คำนวนเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ผลการทดลอง (ตารางที่17) พบว่าในช่วง 36 ชั่วโมงแรกนั้น สปอร์ในชุดทดสอบมีการงอกน้อยมากเพียงประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่สปอร์ของชุดควบคุมงอกได้หมด 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *R. oryzae* ได้ดี นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของสปอร์อย่างชัดเจน โดยสปอร์มีลักษณะบวมผิดปกติมาก (รูปที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ของชุดควบคุมแต่หลังจาก 36 ชั่วโมง เป็นต้นไปแล้วจะพบว่าสปอร์ยังคงสามารถงอกได้ตามปกติ แต่ลักษณะของเส้นใยที่งอกจากสปอร์หลังจากสัมผัสกับสารชนิดระเหยในชั่วโมงที่ 48 มีความผิดปกติแตกต่างจากในชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจนตรงเส้นใยของราที่สัมผัสสารชนิดระเหยมีขนาดสั้นและใหญ่กว่า

3.7.6 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกของเม็ด sclerotium ของเชื้อ *R. solani*

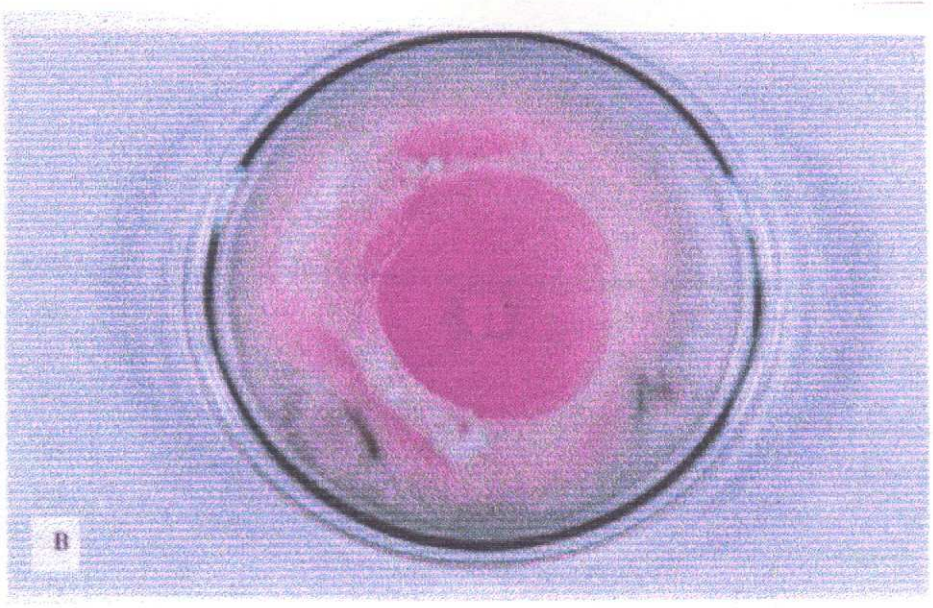
จากการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลงในจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25^{0}ซ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นประกบกับจานอาหาร PDA ซึ่งเลี้ยงเม็ด sclerotium ของ *R. solani* ขนาด 2 มม. จำนวน 3 เม็ดต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ ปิดจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองเข้าด้วยกันแล้วพันด้วยแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25^{0} ซ เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการงอกของเม็ด sclerotium ทุกวัน พบว่าเม็ด sclerotium ในจานอาหารที่ประกบกับ *B. subtilis* NSRS 89-24 นั้นไม่มีการงอกเป็นเส้นใย จนกระทั่งถึงวันที่ 3 ของการทดลอง ในขณะที่เม็ด sclerotium ในชุดควบคุมงอกเป็นเส้นใยตั้งแต่วันที่ 1 และในวันที่ 3 นั้น เส้นใยเจริญจนเต็มจานอาหาร แสดงว่าสารผลิตชนิดระเหยที่ *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสามารถยับยั้งการงอกของเม็ด sclerotium ได้อย่างดี (รูปที่ 11)



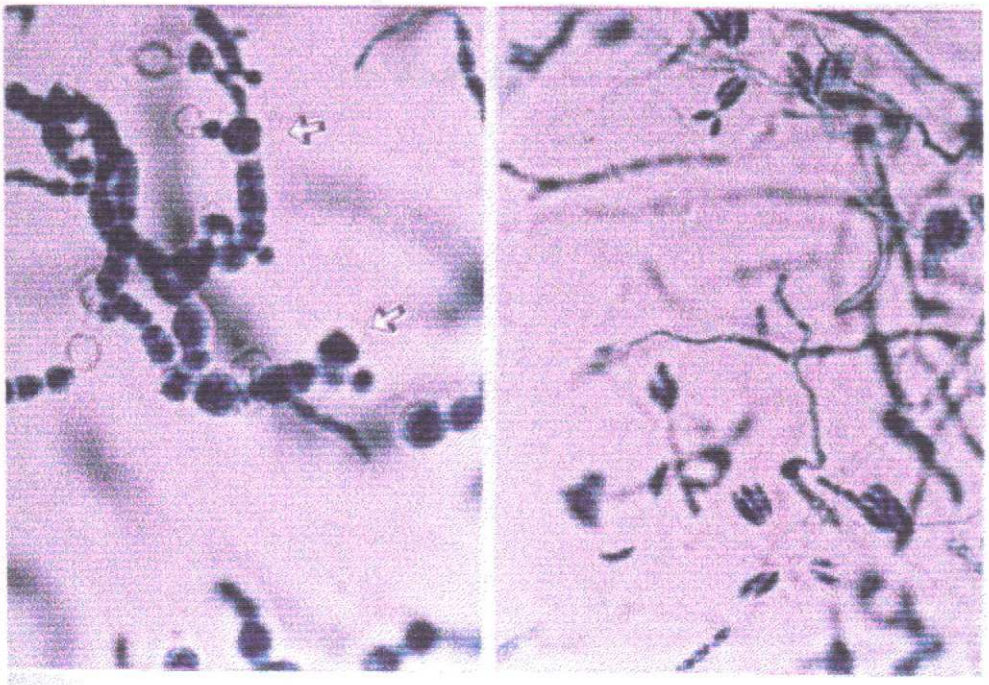
(A)

(B) (C)

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

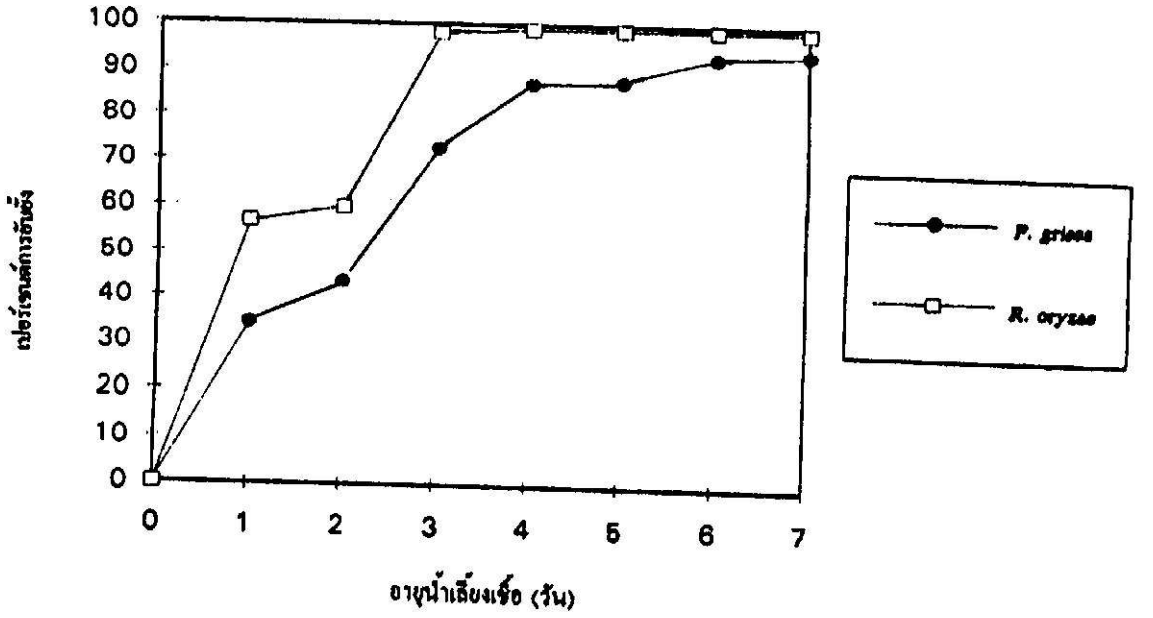


(A)

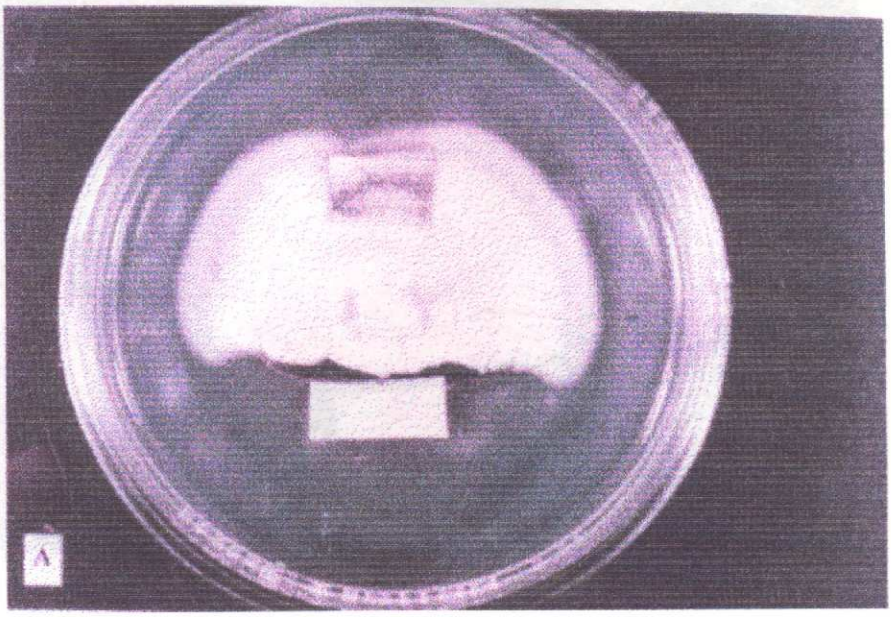


(B) (C)

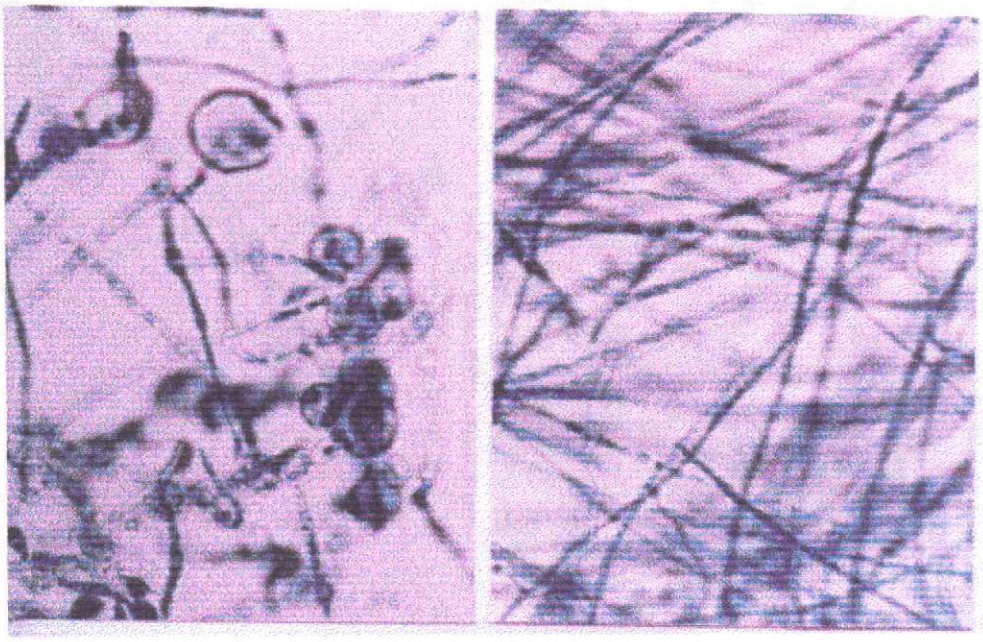
รูปที่ 6 ปฏิกริยายาระหว่าง *B. subtilis* NSRS 89-24 กับ *R. oryzae* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยรา บริเวณยับยั้งมีลักษณะโป่งพองตามศรชี้(B) และเส้นใยราปกติ (C)ที่กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร PDB เพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae*

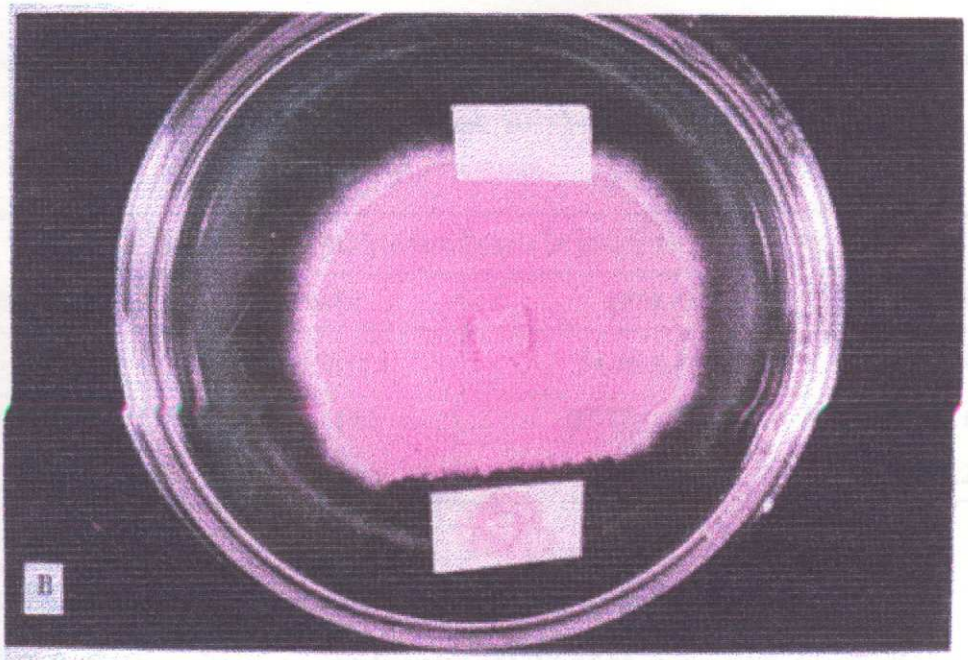


(A)

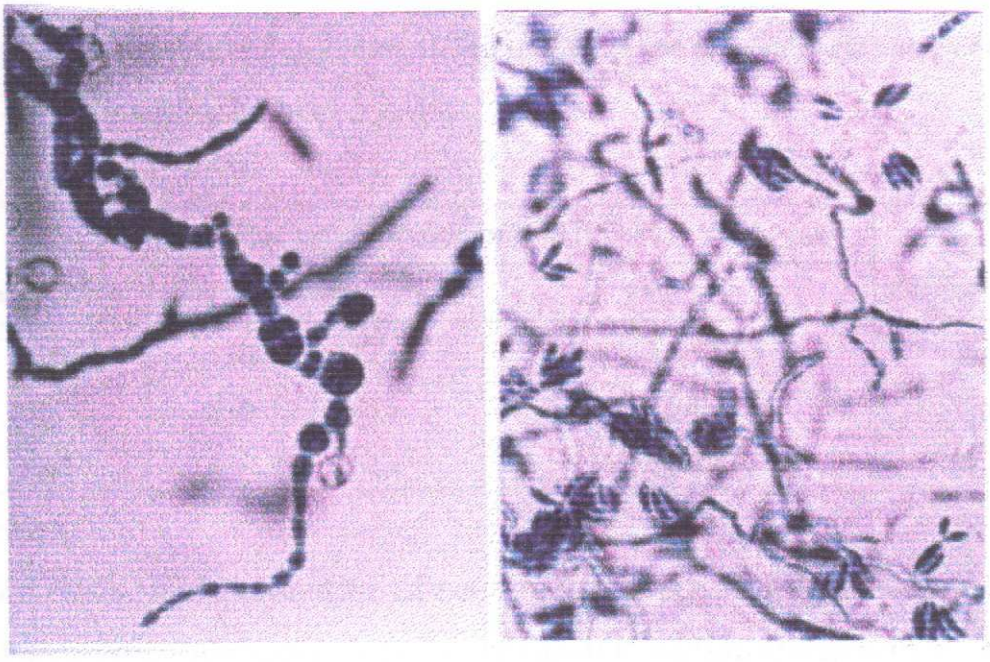


(B) (C)

รูปที่ 8 การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารสกัดจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Agar disc diffusion ต่อเชื้อ *P. grisea* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยราบริเวณยับยั้ง (B) และ เส้นใยราปกติ (C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



(A)



(B) (C)

รูปที่ 9 การทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารสกัดจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 โดยวิธี Agar disc diffusion ต่อเชื้อ *R. oryzae* (A) รูปร่างลักษณะของเส้นใยราบริเวณยับยั้ง (B) และเส้น ใยราปกติ (C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 9 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 ± 0.14 b	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 %

ตารางที่ 10 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *R. oryzae*

ชนิดของอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อรา (มม.) ± SD		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
NB	48.33 ± 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 %

ตารางที่ 11 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 %

ตารางที่ 12 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	95.60
PDB	41.60 ± 0.23 a	8.73 ± 0.42 c	95.80

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.01

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P = 0.05

CV = 5.2 %

ตารางที่ 13 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 14 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

ตารางที่ 15 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

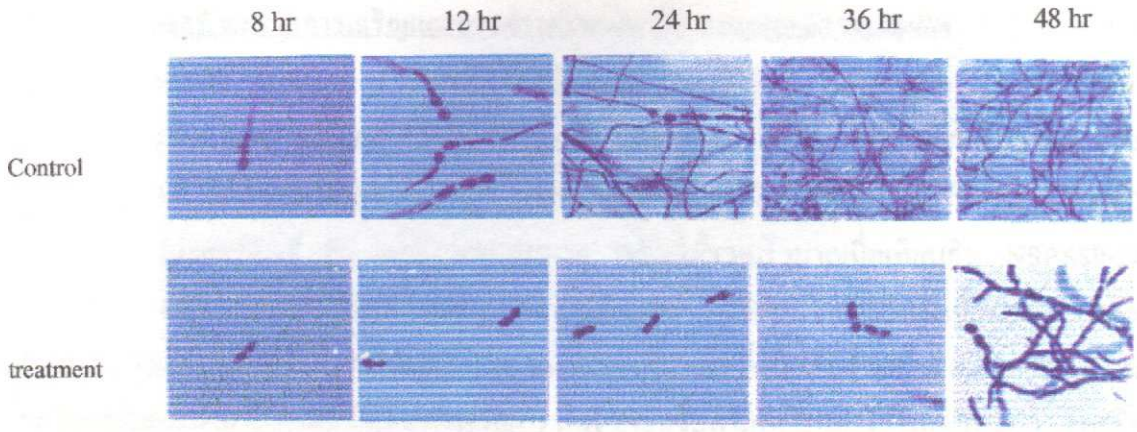
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถว (คือ a,b) หมายความว่าค่าที่ตัวอักษรกำกับอยู่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.05

ตารางที่ 16 ผลของสารผลิตชนิดระเหยของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการเจริญของเชื้อ *R. solani*

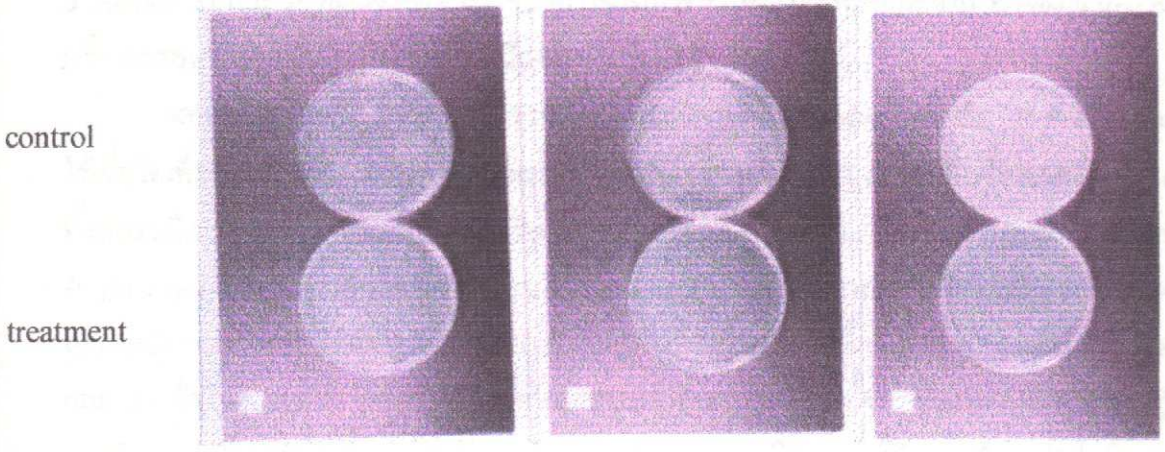
เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (มม.)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
R. solani/ *B. subtilis* NSRS 89-24 เลี้ยงพร้อมกัน	90.00 ± 0.00	22.95 ± 0.61	93.49
R. solani/ *B. subtilis* NSRS 89-24 (อายุ 1 วัน)	90..00 ± 0.13	9.13 ± 0.70	98..97

ตารางที่ 17 ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการงอกของสปอร์ *R. oryzae* ในเวลาต่างๆกัน

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



รูปที่ 10 การงอกของสปอร์ของเชื้อ *R.oryzae* ในอาหาร PDA ภายใต้การสัมผัสสารชนิดระเหยจากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 1 วัน ในอาหาร PDA ระยะเวลา 8-48 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400 เท่า



อายุ 1 วัน อายุ 2 วัน อายุ 3 วัน

รูปที่ 11 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)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ลักษณะเซลล์ สภาวะการเจริญและการดำรงชีพของเชื้อ Antagonist *B.subtilis*

antagonist *B.subtilis* สายพันธุ์ NSRS89-24 และ 89-26 มีลักษณะพื้นฐานทางจุลชีววิทยาที่คล้ายคลึงกันในแง่การเกิดสีของโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA คือ สีชมพูอมแดง ในขณะที่ *B.subtilis* B1 มีลักษณะสีของโคโลนีสีขาวขุ่นเหมือน *B.subtilis* ทั่วไป เมื่อพิจารณาการเคลื่อนที่ในอาหารวุ้นพบว่าสายพันธุ์ B1 และ NSRS89-26 เจริญได้รวดเร็วมากเมื่อเทียบกับ NSRS89-24, เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคข้าวบนอาหารแบบเดียวกัน จึงพบว่าการยับยั้งเชื้อของ Antagonist *B.subtilis* NSRS 89-24 น่าจะเกิดในลักษณะ antibiosis ในขณะที่สายพันธุ์ NSRS 89-26 และ B1 น่าจะใช้กลไกการแก่งแย่งอาหารและอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรคมาใช้ในการควบคุมโรคพืช

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโรคขอบใบแห้ง

จากผลการทดลองที่ 2.1 พบว่าทั้งเชื้อ *B. subtilis* B1 และ *P. fluorescens* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* แต่สามารถยับยั้งการเจริญของ *X. campestris* pv.*oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคข้าว และยังพบว่า *B. subtilis* B1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. fluorescens* ในทำนองเดียวกัน *P. fluorescens* ก็สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* B1 จากการทดลองที่ 2.1 นี้พบว่า *B. subtilis* B1 และ *P. fluorescens* น่าจะนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจาก *X. campestris* pv.*oryzae* (เชื้อทดสอบ) ได้แต่ไม่ควรใช้ร่วมกันเนื่องจากจะยับยั้งซึ่งกันและกัน

ผลการทดลองที่ 2.2 ต้องการตรวจสอบว่า ระหว่างเชื้อ *B. subtilis* B1 กับ *P. fluorescens* ควรจะใช้เชื้อใดเพื่อควบคุมเชื้อทดสอบ และขณะเดียวกันก็ต้องการทราบว่า การยับยั้งเชื้อทดสอบจากแบคทีเรียทั้งสองชนิด เป็นผลจากสารปฏิชีวนะหรือไม่ พบว่า *B. subtilis* B1 มีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบดีกว่า *P. fluorescens* และการยับยั้งเชื้อทดสอบของ *B. subtilis* B1 เกิดจากยาปฏิชีวนะที่เชื้อสร้าง เพราะสารละลายปราศจากเซลล์ที่ได้จากเชื้ออายุ 10 ชั่วโมง ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบ แต่เมื่ออายุ 18 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง จะมีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบมากขึ้นตามอายุของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่าเชื้อจะสร้างยาปฏิชีวนะเมื่อเชื้อจะเริ่มเข้าระยะ stationary phase หรือ ระยะที่มีการสร้างสปอร์ เชื้อ *B. subtilis* โดยทั่วไปเริ่มสร้างสปอร์เมื่ออายุ 18 ชั่วโมง (นภาพร, 2535) และ *B. subtilis* B1 จะสร้างสปอร์ได้มากกว่า 90 % หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง

สำหรับผลการทดลองที่ 2.3 และ 2.4 เพื่อที่จะดูผลของอาหารที่มีต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* B1 ซึ่งจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดี โดยใช้อาหาร 4 สูตร พบว่าอาหาร CDB + 1% yeast extract ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดทั้งสองการทดลอง ส่วนสูตรอาหารของ McKeen และคณะไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้งสองการทดลอง สำหรับสูตรอาหาร NB จากผลการทดลองทั้งสองได้ผลต่างกันและสูตรอาหารของ Sadrin และคณะจากผลการทดลองทั้งสองให้ผลยับยั้งเชื้อทดสอบได้แต่ไม่ดีเท่า CDB + 1% yeast extract แสดงว่าองค์ประกอบของอาหารสูตรนี้ก่อให้เกิดการสร้างยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดใน 4 สูตรที่ทำการทดลอง

ผลการทดลองที่ 2.5 พบว่า เมื่อใช้สารละลายปราศจากเซลล์ (สารปฏิชีวนะจะอยู่ในสารละลายนี้) ของเชื้อ *B. subtilis* B1 ปริมาตร 0.5 มล. กับเชื้อทดสอบที่อัตราการเจือจาง 10^{-1}-10^{-5} เท่า ผลที่ได้ไม่แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบเท่าที่ควร ซึ่งอาจจะเกิดจากสาเหตุในสารละลายปราศจากเซลล์มียาปฏิชีวนะน้อยเกินไป เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อ เพราะสารละลายปราศจากเซลล์ไม่ได้มีการทำให้เข้มข้น (ยังไม่ได้สกัดสารปฏิชีวนะออกมา) ดังนั้นในการทดลองที่ 2.6 จึงใช้สารละลายปราศจากเซลล์ 1 มล. และ 2 มล. พบว่าการใช้สารละลายปราศจากเซลล์เพียง 1 มล. ก็แสดงผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่มีปริมาณ 10^{-1}-10^{-3} ได้ดี แสดงว่าปริมาตรที่เหมาะสมของสารละลายปราศจากเซลล์ที่ใช้ทดสอบ คือ 1 มล. เมื่อใช้ปริมาณเชื้อทดสอบที่กำลังการเจือจาง 10^{-1}-10^{-3} เท่า (เชื้อเริ่มต้น OD_{660} = 0.196)

การทดลองที่ 2.7 ผลการหาค่า MIC และ MBC ของสารละลายปราศจากเซลล์จากเชื้อ *B. subtilis* B1 ที่มีต่อเชื้อทดสอบ *X. campestris* pv. *oryzae* พบว่าค่า MIC คือ อัตราการเจือจาง 1:8 และ MBC คือ อัตราการเจือจาง 1:4

จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า *B. subtilis* B1 สร้างสารที่มีฤทธิ์ต้าน *X. campestris* pv. *Oryzae* ออกมาในอาหารเหลว CDB+1% yeast extract

3. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

3.1 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 ในการปลดปล่อยสารที่มีฤทธิ์ต้านราบางอย่างออกมาการยับยั้งเริ่มปรากฏชัดเจนเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 นาน 2 วัน โคโลนีของเชื้อรามีสีเข้มขึ้นมากเมื่อเวลาผ่านไปหลายวัน ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวเป็นระยะที่เชื้อ *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* มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะประเภทเปปไตด์ได้ไม่น้อยกว่า 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* และเข้าไปเกี่ยวข้องในกระบวนการยับยั้งเชื้อราโรคพืชชนิดต่างๆ 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*

3.2 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 น่าจะมีแหล่ง

ในโตรเจนที่อยู่ในรูปที่สามารถนำไปใช้ได้ดีกว่าอาหาร CDB และ NB จึงทำให้มีการสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีกว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ PDB ในช่วงเวลา 1-5 วัน ผลการทดลองพบว่าสารปฏิชีวนะเริ่มผลิตปริมาณมากในช่วงวันที่ 3 ต่อจากนั้นปริมาณเริ่มจะคงที่ สารปฏิชีวนะที่ได้จากการทดลองนี้อาจมีมากกว่าหนึ่งชนิด และแต่ละชนิดก็อาจจะผลิตออกมาในช่วงเวลาที่แตกต่างกันได้ 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 Phac 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

เมื่อทดสอบสารปฏิชีวนะที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงเส้นใยของเชื้อราโดยทำการตัดเส้นใยของเชื้อราที่อยู่ใกล้กับสารปฏิชีวนะมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าปลายของเส้นใยเชื้อราทั้งสองจะมีลักษณะบวมและโป่งพองซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับผลการทดลองโดย Ferreira และคณะ (1991)แสดงให้ทราบว่า เป้าหมายในการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะอยู่ที่ชั้นเมมเบรนของเซลล์รา

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

3.3 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 พบว่าปริมาณดังกล่าวนี้อยู่ในช่วงที่จะช่วยเร่งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* เร็วขึ้น (Ferreira และคณะ, 1991) น่าจะเสริมหรือสนับสนุนผลการทดลองที่พบว่าสารชนิดระเหยถูกผลิตโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 ออกมาในปริมาณมากกว่าธรรมดา

2. เนื่องจากโมเลกุลน้ำตาลซูโครส มีปริมาณของธาตุ C H O เป็นองค์ประกอบปริมาณมากและกระบวนการเมตาบอลิสมของน้ำตาลซูโครส เพื่อให้ได้ธาตุดังกล่าวมาใช้ก็ไม่ยุ่งยาก ซึ่งอาจจะช่วยเอื้อประโยชน์ในการนำธาตุดังกล่าวมาสร้างสารชนิดระเหยได้ปริมาณมากกว่าปกติ นอกจากนี้สารอาหาร

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 และมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ด้วยจึงมีประโยชน์อย่างมากถ้าหากนำมาควบคุมโรคพืชซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากดินโดยตรง อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องทราบสูตรโครงสร้าง และคุณสมบัติเฉพาะเอียดทั่วไปของสารเสียก่อน สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. รายงานโดย Wrigth และคณะ (1991) พบว่าสามารถผลิต Isoamyl alcohol ซึ่งเป็นสารระเหยที่มีความสามารถในการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Cyanobacteria* ได้ดี ในขณะที่ Fiddaman และ Rossall (1993) พบว่า *B. subtilis* สามารถสร้างสารระเหยที่สามารถควบคุม เชื้อราก่อโรคบางชนิดได้เช่นกัน แต่ยังไม่ทราบชนิดสูตรโครงสร้างที่แน่นอนของสารดังกล่าว

สารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 มีฤทธิ์เพียงการยับยั้งแบบชั่วคราว และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* ที่เจริญมาก่อนได้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของฤทธิ์ต้านราของสารชนิดระเหยต่อการนำมาใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรคข้าว ดังกล่าวได้ทั้งในระยะเริ่มแรกของการก่อโรคและระยะที่เชื้อราเจริญก่อโรคแล้ว 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 ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์โดยสารชนิดระเหยก็สามารถนำมาใช้ควบคุมเชื้อดังกล่าวได้

สำหรับ *B. subtilis* สายพันธุ์ทั่วไป ซึ่งใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *P. grisea* และ *R. oryzae* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรค *P. grisea* และ *R.. oryzae* ได้

แสดงว่าสารผลิตชนิดระเหยชนิดนี้สามารถที่จะสร้างได้จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆได้ด้วย ดังนั้น *B. subtilis* ที่อาศัยอยู่ในดินในธรรมชาติอาจเป็นปัจจัยเสริมอีกอย่างหนึ่งที่จะช่วยในการควบคุมเชื้อราโรคพืชโดยชีววิธีให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

เมื่อทำการทดลองโดยตัดเส้นใยเชื้อรา *P. grisea* *R. oryzae* และ *R. solani* ซึ่งสัมผัสสารผลิตชนิดระเหยมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของเชื้อราที่ทดสอบไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ไม่มีการบวมหรือโป่งพองเกิดขึ้นเหมือนกับการทดลองของสารปฏิชีวนะที่สกัดตามวิธีการของ McKeen และคณะ (1986) แสดงให้ทราบว่ากลไกการยับยั้งของสารผลิตชนิดระเหยน่าจะเกี่ยวข้องกับการเข้าไปขัดขวางขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการเมตาบอลิสมภายในเซลล์ของเชื้อรา จนทำให้กระบวนการดังกล่าวไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้ตามปกติจึงทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต และหากสารผลิตชนิดระเหยเจือจางไปเซลล์ก็น่าจะเจริญได้ตามปกติโดยใช้เวลาไม่นานนัก ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองในเรื่องผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อการเจริญของเส้นใยราซึ่งพบว่าหากเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ออกและนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อราไปเลี้ยงต่อ เชื้อราดังกล่าวเจริญได้ตามปกติ

การศึกษาเพื่อทดสอบ ผลของสารผลิตชนิดระเหยต่อความสามารถในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae* แสดงให้ทราบว่าสารชนิดระเหยสามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae* ได้ดีเช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะชนิดไม่ระเหยซึ่งรายงานโดย McKeen และคณะ (1986) และ Ferreira และคณะ (1991) ความเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการบวมของสปอร์ของเชื้อราอาจเกิดจากการสะสมสารชนิดระเหยภายในเซลล์ของสปอร์ ซึ่งอาจเข้าไปขัดขวางขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการเมตาบอลิสมอันเป็นผลทำให้เซลล์ของสปอร์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติและก่อให้เกิดการสะสมสารพิษภายในเซลล์ขึ้น

Fiddaman และ Rossall (1993) รายงานไว้ว่าสารระเหยจาก *B. subtilis* มีความสามารถในยับยั้งเชื้อราก่อโรคบางชนิดได้ แต่รายงานนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าสารระเหยจาก *B. subtilis* สามารถที่จะยับยั้งหน่วยสืบพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคได้และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่ผิดปกติอย่างชัดเจนการป้องกันการแพร่กระจายอันเกิดจากการงอกของเชื้อราก่อโรคได้ถือเป็นวัตถุประสงค์หลักในควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (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* ในการควบคุมเชื้อโรคต่างๆได้

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

2. การโคลน (Clone) ยีนที่ควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ที่ได้รับจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นๆ เข้ายังกลุ่มยีนของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะนั้นๆ มาช่วยเสริมให้สามารถควบคุมโรคได้มากยิ่งขึ้น

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

สรุป

1. *B.subtilis* NSRS 89-24, 89-26 และ B1 สามารถสร้างสปอร์ภายใน 24 ชั่วโมง และเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น PDA และ CDA

2. การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *B.subtilis* NSRS 89-24 จะเกิดขึ้นในรูปของการสร้างสารปฏิชีวนะ ในขณะที่ *B.subtilis* NSRS89-26 และ B1 ใช้กลไกของความสามารถในการเจริญที่รวดเร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรคสำหรับการยับยั้ง

3. *B. subtilis* B1 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรียโรคขอบใบแห้ง *X. campestris* pv.*oryzae* ได้ดีกว่า *P. fluosescens* และสารปฏิชีวนะที่ผลิตและปล่อยออกมาที่มีผลการยับยั้งสูงสุดเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CDB + 1% yeast extract ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1:8 และ 1:4 ตามลำดับ

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

5. สารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 จะผลิตได้มากที่สุดในการเลี้ยงด้วยอาหาร PDB เขย่าที่อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ เป็นเวลา 5 วัน และสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จะมีสีน้ำตาลละลายได้ดีใน 80% แอทธานอล และทนต่อความร้อนได้สูง

6. สารผลิตชนิดระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ผลิตได้มากที่สุดในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ ออกฤทธิ์ต่อ *P. grisea* และ *R. oryzae* เป็นแบบการยับยั้งชั่วคราว สามารถยับยั้งหน่วยสืบพันธุ์ของเชื้อราโรคข้าวได้ ทั้งสปอร์ของ *R. oryzae* และ sclerotium ของ *R. solani* โดยเฉพาะ สปอร์ของ *R. oryzae* การยับยั้งจะเกิดภายใน 48 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

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

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

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., 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

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

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

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

Ishima, S. (1922) Studies on the white leaf disease of rice plants Report of the Agricultural Experiment Station, Tokyo 45, 233-251

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

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

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

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

Mizukami, T. (1961) Studies on the ecological properties of Xanthomonas oryzae (Uyeda et Ishiyama) Downson, the caus al organism of bacterial leaf blight of rice plant. Ibid 13.1-85.

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

Omifo, C., and Ikotun, T. 1987. Inhibition of growth of some plant pathogens by antagonistic microoragnism J.basic microbiol 27 (9): 515-519.

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

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., 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

subtilis NB22. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58:329-339

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

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

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

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)

Sinclair J.B., Agrihotre. p.v., Singh, N., Chaute B.S., Sinngh U.S., Swivedi,, J. seds. 1989. B.subtilis as a biocontrol agent for plant sisease PERSPECTIVES IN PHYTOPATHOLOGY, PP. 367-374

Staley, J.T.., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Johnson, .L. and Jones, D. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2298p.

Stenzel, K., Steinter, U., and Schoenbeck, F 1985. Effect of induced resistance on the dfficiency of powdery mildew harstoria in wheat and barley, PHYSIOL. PLANT PATPOL. 27(3) : 357-367.

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

Thind, B.S., Jindai, K.K., Onanamanickam S.S., and Manhadevan Aeds. 1988. Evaluation of green gram seed microflora for the eradication of X.C. pv.vignaeradiatae from green gram seeds ADVANCE IN RESEARCH ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA INI. BIOSCI SEP.pp. 119-127

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

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

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

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

CZAPEK DOX BROTH (ตามวิธีของ Ferreira และคณะ, 1991)

Saccharose. Difco	30	g
Sodium Nitrate	3	g
Dipotassium Phosphate	1	g
Magnesium Sulphate	0.5	g
Potassium Chloride	0.5	g
Ferrous Sulfate	0.01	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.5

ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

สูตรอาหาร (ตามวิธีของ Mckeen และคณะ, 1986)

Difco-Bacto dextrose	20	g
DL-glutamic acid	5	g
$MgSO_4.7H_2O$	1.02	g
K_2HPO_4	1.00	g
KCl	0.50	g
Trace element solution	1	ml
Distilled water	1,000	ml

pH 6.0-6.2 with 5N NaOH

หมายเหตุ Trace element solution

0.5 g of $MnSO_4.H_2O$

0.16 g of $CuSO_4.5H_2O$

0.015 g of $FeSO_4.7H_2O$

100 ml of distilled water

ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

สูตรอาหาร (ตามวิธีของ Sadrin และคณะ, 1990)

glucose	20	g
L-glutamic acid	5	g
KH_2PO_4	1	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	g
KCl	1	g
$FeSO_4 \cdot 6H_2O$	1.2×10^{-3}	g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.6×10^{-3}	g
$MnSO_4$	0.4×10^{-3}	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.5

ฆ่าเชื้อที่ 121° ซ นาน 15 นาที

Patato Peptone Agar (PPA ตามวิธีของนลินี และคณะ, 2534)

มันฝรั่ง	300	g
วุ้นผง	15	g
น้ำตาลทราย	20	g
Calcium nitrat-4 hydrate	0.5	g*
Bacto-Peptone	5	g*
Di-sodium hydrogen phosphate	2	g*
Distilled water	1,000	ml

* ชั่งใส่ plate รวมกันใส่น้ำ

<u>วิธีทำ</u>

1. ปอกเปลือกมันฝรั่ง นำมาชั่งให้ได้ 300 g แล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตวงน้ำมา 1,000 ml ใส่มันฝรั่งลงไปนำไปตั้งไฟต้มให้เดือด เมื่อเดือดแล้วลดไฟลงไม่ให้เดือดแรง (ถ้าเดือดแรงจะทำให้คุณค่าทางอาหารลดลง และมันฝรั่งจะแตกเป็นเศษเล็กๆ ทำให้น้ำมันฝรั่งไม่ใส เป็นการยุ่งยากในการดูเชื้อ) เมื่อต้มมันฝรั่งจนเดือด และลดไฟจับเวลาได้ประมาณ 10 -15 (มันจะสุกพอดี) ยกลงกรองเอาแต่น้ำมาใช้
2. นำน้ำมันฝรั่งที่ต้มได้มาตั้งไฟ ชั่งวุ้นมา 15 g ใส่วุ้นลงไปในหม้อน้ำมันฝรั่งหรี่ไฟให้อ่อน ต้องคนวุ้นตลอดเวลา เพื่อไม่ให้วุ้นติดก้นภาชนะ และไม่ให้วุ้นไหม้ ถ้าไหม้อาหารวุ้นจะมีสีคล้ำ คนวุ้นประมาณ 8-10 นาที วุ้นละลายหมดแล้วนำมาตวงให้ครบ 1,000 ml หากไม่ครบให้เติมน้ำร้อน ถ้าเติมน้ำเย็นวุ้นจะเป็นก้อน เมื่อวุ้นละลายแล้วใส่สารเคมี Bactro, Calcium, Natrium hydrogen ตามสูตร ต้องชั่ง plate แล้วหักน้ำหนัก plate ชั่งรวมกันทั้งสามชนิด ชั่งเสร็จแล้วใส่น้ำกลั่นลงใน plate เล็กน้อย แล้วบี้ให้สารละลายละลายจนหมดแล้วจึงใส่ในหม้อน้ำมันฝรั่งกับวุ้น เสร็จแล้วใส่น้ำตาล 20g คนให้ละลายประมาณ 1-2 นาที ละลายหมด ปิดไฟยกลง เทใส่ flask หรือ test tube นำไปฆ่าเชื้อที่ 121° ซ นาน 25-30 นาที

Patato Peptone Broth (PPB ตามวิธีของนลินี และคณะ, 2534)

มันฝรั่ง	300	g
น้ำตาลทราย	20	g
Calciumnitrat-4-hydrat ($Ca(NO_3)_2$) + H_2O	0.5	g
Bacto - Peptone	5	g
Di - Natriumhydrogenphosphate 12-hydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	2	g
Distilled water	1,000	ml

<u>วิธีทำ</u>

1. ล้างมันฝรั่ง หรือจะปอกเปลือกก็ได้ หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตวงน้ำมา 1,000 ml ใส่มันฝรั่งลงไปต้มให้เดือดพอมันฝรั่งสุกยกลง จะใช้เวลาต้มประมาณ 10-15 นาที นำมันฝรั่งที่ต้มมากรองเอาแต่น้ำมันฝรั่ง
2. นำน้ำมันฝรั่งมาต้มตั้งไฟ ตวงใหม่อีกครั้งให้ได้ 1,000 ml เอาสารเคมีสามอย่าง สารเคมีสามอย่างนี้ต้องชั่งรวมกัน เพราะเป็นสารที่ละลายยาก ต้องชั่งใส่ plate แล้วเอาน้ำกลั่นใส่ลงไปเล็กน้อยเพื่อช่วยให้สารละลาย เมื่อละลายดีก็นำไปใส่ในน้ำต้มมันฝรั่งคนไปเรื่อยๆจนละลายเข้ากันดีประมาณ 5 นาที ก็ใส่น้ำตาลคนไปเรื่อยๆจนน้ำตาลละลายประมาณ 2-3 นาที น้ำตาลก็จะละลายหมด (ไม่ต้องให้เดือด) เสร็จแล้วเอาอาหารเหลวที่ได้เทใส่ flask หรือ tube นำไปฆ่าเชื้อที่ 121° ซ นาน 25-30 นาที

สารเคมี 3 อย่าง คือ 1. $Ca(NO_3)_2$ + H_2O
2. Bacto - Peptone
3. $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$