



สภาวะที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* เพื่อการ
ควบคุม *Rigidoporus microporus* เชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา
Growth Condition of Antagonistic Bacteria *Bacillus subtilis* for Controlling
White Root Rot (*Rigidoporus microporus*) in Para Rubber.

นพมาศ มณีนิล
Noppamas Maneenil

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Soil Resources Management
Prince of Songkla University

2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



สภาวะที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* เพื่อการ
ควบคุม *Rigidoporus microporus* เชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา
Growth Condition of Antagonistic Bacteria *Bacillus subtilis* for Controlling
White Root Rot (*Rigidoporus microporus*) in Para Rubber.

นพมาศ มณีนิล
Noppamas Maneenil

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Soil Resources Management
Prince of Songkla University

2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ สภาวะที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* เพื่อ
 การควบคุม *Rigidoporus microporus* เชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา
 ผู้เขียน นางสาวนพมาศ มณีนิล
 สาขาวิชา การจัดการทรัพยากรดิน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เฟื่องหนู)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราภรณ์ อินทसार)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กานดา ปานทอง)

(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เฟื่องหนู)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กานดา ปานทอง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จักรกฤษณ์ พูนภักดิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เถกิง วงศ์ศิริโชติ)

รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กานดา ปานทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(นางสาวนพมาศ มณีนิล)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวนพมาศ มณีนิล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus subtilis</i> เพื่อการควบคุม <i>Rigidoporus microporus</i> เชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา
ผู้เขียน	นางสาวนพมาศ มณีนิล
สาขาวิชา	การจัดการทรัพยากรดิน
ปีการศึกษา	2566

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา จากผลการศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 เพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพพบว่าการใช้รำข้าวที่ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ส่งผลให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 12.20 และ 12.16 log CFU/ml ตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ของรำข้าวและปลายข้าวมีแนวโน้มทำให้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์สูงกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ และการตอบสนองต่อรำข้าวมีแนวโน้มดีกว่าปลายข้าว สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น ทำให้เชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญได้ดีไม่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ขณะที่การเพิ่มรำข้าวทุกระดับความเข้มข้นในอาหาร ทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญได้ลดลงเท่ากับ 4.3 และ 3.6 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์และสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ต่อการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 พบว่าสารปฏิปักษ์และสารระเหยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเสริมรำข้าวและปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 เจริญผิดปกติ บิดเบี้ยว และปลายเส้นใยโป่งพอง และเมื่อตรวจสอบองค์ประกอบบางส่วนของสารสกัดจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ด้วยวิธี TLC และ NMR พบการปรากฏ

สัญญาณของโปรตอนชนิด olefinic proton, aliphatic proton และ aromatic proton ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ สำหรับการศึกษาคุณสมบัติการเป็นเชื้อส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถสังเคราะห์ปริมาณ IAA (Indole -3-Acetic Acid) ได้สูงสุดเท่ากับ 276.857 และ 263.659 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงด้วยรำข้าวและปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้การเจริญเติบโตของยางพาราในด้านความสูง ความยาวราก จำนวนใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตาม การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพาราได้ดีกว่า อาจจะเป็นไปได้ที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถช่วยเสริมสร้างความสมบูรณ์ของต้น ใบ และการพัฒนาของรากได้มากขึ้น ดังนั้นการพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microporus* โดยใช้รำข้าวเป็นแหล่งอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* และเป็นส่วนผสมในชีวภัณฑ์ จึงเป็นแนวทางที่ควรศึกษาต่อไปเพื่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิตเหลือใช้ทางการเกษตร

Thesis Title Growth Condition of Antagonistic Bacteria *Bacillus subtilis* for Controlling White Root Rot (*Rigidoporus microporus*) in Para Rubber.

Author Ms. Noppamas Maneenil

Major Program Soil Resources Management

Academic Year 2023

ABSTRACT

This research aimed to investigate suitable food sources for the growth of *Bacillus subtilis* (SM1 and LPDD3-2 strain) to control *Rigidoporus microporus* (NK6 strain) fungus and promote plant growth. The result showed that rice bran (1 and 3 percent) and broken rice (3 and 5 percent) are the most favorable carbon sources for cultivating and increasing the quantity and quality of *B. subtilis* strains. The cell count of both strains increased, reaching 12.20 and 12.16 log CFU/ml respectively. The concentration 3 percent of rice bran and broken rice directly correlated with the quantity of *B. subtilis* strains, with rice bran showing a more favorable response. However, at all concentration of broken rice, *R. microporus* strain NK6 grew well, but all concentrations of rice bran were added to the medium, the growth of mycelium decreased by 4.3 and 3.6 cm, respectively. It was found that the supernatant and volatile compounds of *B. subtilis* strains were able to inhibit the growth of *R. microporus* strain NK6 by more than 80 percent, such as rough mycelium, uneven fiber sizes, distorted growth and distend end of mycelium. Then, some constituents of the extracts from the two strains of *B. subtilis* strains were examined by TLC and NMR. The extracts showed signs of olefinic proton, aliphatic proton and aromatic proton, suggesting that both strains of *B. subtilis* were examined able to produce biosurfactants and release them outside the cell. For the study of the properties of Para rubber growth promoters, it was found that *B. subtilis* was able to synthesize the highest IAA content of 276.857 and 263.659 µg/ml that were cultured with rice bran and broken

rice at the concentration of 3 percent. As a result, the growth of Para rubber in height, root length, leaf number, fresh weight and dry weight were not statistically different. However, both strains of *Bacillus subtilis* antagonistic bacteria were more likely to promote the growth of Para rubber. It may be possible that these antagonistic bacteria strains could enhance plant health, leaf and root development. Therefore, the bio-agent development of *B. subtilis* antagonistic bacteria for controlling *R. microporus* by using rice bran in culture medium of *B. subtilis* and as an ingredient in bio-agent is an approach that should be further studied.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู และรองศาสตราจารย์ ดร.กานดา ปานทอง ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม ที่ทำให้ผู้เขียนได้หัวข้อในการทำวิทยานิพนธ์ นอกจากนี้ยังได้ให้ข้อมูลและคำแนะนำต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์โดยเฉพาะการวางเค้าโครง แนวทางการเขียนเนื้อหาและบทวิเคราะห์ ตลอดจนการกำหนดกรอบเวลาในการเสนอความคืบหน้าของงาน ซึ่งถือเป็นแรงกระตุ้นให้แก่ผู้เขียนได้อย่างดี รวมไปถึงสละเวลาตรวจสอบความถูกต้องของเล่มวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ไว้ ณ ที่นี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราภรณ์ อินทสาร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จักรกฤษณ์ พูนภักดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาชี้แนะแนวทางและคำแนะนำ ตลอดจนกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ต่าง ๆ อันผู้เขียนมิได้เอ่ยนาม ที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้ทางด้านวิชาการ และกัลยาณมิตรพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา ระยะเวลาที่ศึกษาและจัดทำวิทยานิพนธ์ ไปจนถึงเจ้าหน้าที่ภาควิชาธรณีศาสตร์ทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวก และประสานงานในการดำเนินการทำวิทยานิพนธ์ให้ผู้เขียนตลอดมา

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ทุนการศึกษาที่ได้ รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

สุดท้ายผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อเสรี และคุณแม่รุ่งฤดี มณีนิล ที่ท่านช่วยสนับสนุนในทุกด้าน และเป็นกำลังใจสำคัญ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ โดยหากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีประโยชน์และคุณค่าทางการศึกษาแก่ผู้ที่สนใจ ผู้เขียนขอยกความดีทั้งหมดแต่ท่านรองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน คณาจารย์และผู้มีพระคุณ รวมทั้งบิดา มารดาที่ได้อบรมเลี้ยงดูให้ความรู้ความเมตตาแก่ผู้เขียน แต่หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความบกพร่องประการใดผู้เขียนขอน้อมรับความผิดพลาดไว้แต่เพียงผู้เดียว

นพมาศ มณีนิล

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(13)
รายการตารางผนวก	(14)
รายการภาพผนวก	(16)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	18
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	19
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	19
วิธีการทดลอง	21
3. ผลการทดลอง	30
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	61
5. สรุปผลและข้อเสนอแนะ	75
เอกสารอ้างอิง	76
ภาคผนวก	91
ประวัติผู้เขียน	99

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> ด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl acetate	51
2. ปริมาณการผลิต IAA ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i>	53
3. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> ต่อการเจริญเติบโตของรากยางพารา	55
4. ความสูงส่วนเหนือดิน จำนวนใบ และความยาวรากของยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลองที่ต้นยางพาราอายุ 1, 2 และ 3 เดือน	58
5. น้ำหนักสดของส่วนลำต้น ใบ และรากของต้นยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลองที่ต้นยางพาราอายุ 1, 2 และ 3 เดือน	59
6. น้ำหนักแห้งของส่วนลำต้น ใบ และรากของต้นยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลองที่ต้นยางพาราอายุ 1, 2 และ 3 เดือน	60

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างของ iturin, surfactin และ fengycin	15
2. การเจริญของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ <i>B. subtilis</i> บนแหล่งอาหารต่างชนิด	34
3. การเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> บนแหล่งอาหารต่างชนิด	35
4. การเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> บนอาหารแหล่งอาหารต่างชนิด ที่อายุ 7 วัน	36
5. ลักษณะทางจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งอาหารต่างชนิด ที่อายุ 7 วัน	36
6. ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 บนแหล่งอาหารต่างชนิด	39
7. ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 ที่ทดสอบร่วมกับแบคทีเรียปฏิบัคษ์ <i>B. subtilis</i> บนแหล่งอาหารต่างชนิด ที่อายุ 7 วัน	40
8. ลักษณะทางจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA ที่เพิ่มแหล่งต่างชนิดกัน ที่อายุ 7 วัน	41
9. การแปรผันอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ <i>B. subtilis</i> ร่วมกับการเจริญของเชื้อรา <i>R. microporus</i> บนอาหารเสริมคาร์บอน	42
10. ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 ทดสอบร่วมกับแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 7 วัน	43
11. ลักษณะทางจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 7 วัน	44
12. ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี pour plate	45

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13. ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี pour plate	46
14. ลักษณะทางจุลทรรศน์วิทยาของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี pour plate	46
15. ประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite	48
16. ลักษณะเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 เลี้ยงร่วมกับสารระเหยจากเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่หนึ่งและไม่มีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite	49
17. ลักษณะเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 เลี้ยงร่วมกับสารระเหยจากเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่หนึ่งและไม่มีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite	49
18. ลักษณะทางจุลทรรศน์วิทยาของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงร่วมกับสารระเหยจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite	50
19. การวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC จากการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i>	51
20. กราฟแสดงสเปกตรัม NMR (300 MHz, CDCl ₃) จากการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i>	52

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
21. ลักษณะ Halo Zone ของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ <i>B. subtilis</i> ที่สามารถผลิต IAA บนอาหารแข็ง PDA ที่เติม L-tryptophan 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร	53
22. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ <i>B. subtilis</i> ต่อการเจริญของรากยางพารา ในระดับห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 14 วัน	54
23. ลักษณะรากยางพาราหลังเติมเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ <i>B. subtilis</i> ที่อายุ 1, 2 และ 3 เดือน	57

รายการตารางผนวก

ตารางผนวกที่	หน้าที่
1. สูตรอาหารเสริมรำข้าวและปลายข้าว	93
2. ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหารเสริมคาร์บอน	94
3. ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหารเสริมไนโตรเจน	94
4. ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหารเสริมฟอสฟอรัส	95
5. ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหารเสริมโพแทสเซียม	96

รายการภาพผนวก

ภาพผนวกที่	หน้าที่
1. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SM1 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งอาหารต่างชนิด	96

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งที่มีการส่งออกเป็นอันดับต้น ๆ ของประเทศไทยที่สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้มากและเพื่อเป็นการรักษาสภาพการผลิตและการส่งออกไม่ให้ลดต่ำกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบันเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราจึงควรมีความรู้และการปฏิบัติดูแลปรับปรุงสวนยางพาราที่ต้องตามหลักวิชาการเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสม่ำเสมอและมีคุณภาพ ซึ่งการปลูกยางพาราให้ได้ผลผลิตดีขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพื้นที่ปลูก ธาตุอาหาร และการเลือกพันธุ์ยางพาราปลูกให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ ปัจจุบันมีการขยายพื้นที่ปลูกยางพาราเพิ่มขึ้น และมีการใช้พื้นที่ปลูกยางพาราอย่างต่อเนื่องซ้ำในพื้นที่เดิม ทำให้เกษตรกรผู้ปลูกยางพาราโดยส่วนใหญ่มักประสบกับปัญหาต่าง ๆ มากมายโดยเฉพาะความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตลดลง อีกทั้งยังทำให้ต้นอ่อนแอและโรคเข้าทำลายได้ง่าย มีทั้งแมลง เชื้อรา และแบคทีเรีย เช่น *Rigidoporus microporus* สาเหตุของโรครากขาว *Ganoderma pseudoferreum* สาเหตุของโรครากแดง เป็นต้น นับว่ามีผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตและผลผลิตของยางพาราโรครากขาว (white root rot disease) จัดเป็นโรคทางรากที่สำคัญอย่างหนึ่ง เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (SW.) Overeem เป็นเชื้อราที่มักเกิดกับพืชได้หลายชนิด เช่น ยางพารา โกโก้ กาแฟ พริกไทย เป็นต้น อาการของโรคเกิดทุกส่วนของพืช สามารถเจริญเข้าทำลายบริเวณเปลือกกรากค่อนข้างรุนแรง จะทำให้ใบร่วงและสีของใบยางพาราจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยอาการที่ปรากฏระยะแรก อาการเหลืองอาจเกิดที่กิ่งใดกิ่งหนึ่ง หลังจากนั้นจะลุกลามจนอาการเหลืองของใบเกิดทั้งต้น และยืนต้นตายในที่สุด หลังจากต้นยางพาราตายจะเกิดดอกเห็ดสีส้มที่โคนต้น และสร้างสปอร์จำนวนมากเพื่อแพร่ไปตามลม น้ำ แมลง สัตว์ มนุษย์ และติดไปกับเครื่องมือ ระบาดมากในฤดูฝนหรือสภาพที่มีความชื้นสูง (พรพิมล, 2552) ปัจจุบันโรครากขาวเป็นโรคที่มีการระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรง โดยทำให้ยางพาราที่เป็นโรคยืนต้นตายหรือโคนล้ม เนื่องจากระบบรากถูกทำลาย พบได้ทั้งสวนยางที่มีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราเป็นอย่างมาก ทำให้ผลผลิตของน้ำยางพาราและผลผลิตของไม้ยางพาราลดน้อยลงหรือด้อยคุณภาพ เพื่อลดปัญหาดังกล่าว

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรสามารถเลือกใช้เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นวิธีที่มีความปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม โดยการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ ซึ่งมีอยู่มากมายในธรรมชาติ โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น การควบคุมเชื้อรา *Bipolaris maydis* สาเหตุโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Djaenuddin *et al.*, 2020) การควบคุมโรคเหี่ยวของกล้วยที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Fusarium oxysporum* (Bubici *et al.*, 2019) การควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโคนเน่าในแตงกวา (Huang *et al.*, 2012) และการควบคุม *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว (Wiwattanapatapee *et al.*, 2013; Chumthong *et al.*, 2016) เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกมาได้ เช่น iturin, fengycin, surfactin, bacylomycin, macrolactin, bacillaene และ bacilysin (Rabbee *et al.*, 2019; Khedherab *et al.*, 2021) รวมไปถึงสามารถผลิตเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ cellulase (Singh *et al.*, 2008; Taechapoempol *et al.*, 2011) เป็นต้น สารปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชแตกต่างกัน รวมทั้งมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคด้วย ซึ่งเป็นข้อดีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ *Bacillus* spp. สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว เลี้ยงง่าย สามารถใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของซากพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อีกทั้งยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย กากน้ำตาล รำข้าว และปลายข้าว เป็นต้น ส่วนเกลือแร่ต่าง ๆ มักต้องการในปริมาณน้อย เช่น แคลเซียมและแมงกานีส จะช่วยเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า เอนโดสปอร์ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถอยู่รอดได้แม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง ขาดแคลนอาหาร และแสงยูวี และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม *Bacillus* spp. สามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่โดยง่าย ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพธรรมชาติ (Shoda, 2000) ซึ่งการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ได้ปริมาณมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย เช่น ชนิดของแหล่งอาหาร ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ การให้อากาศ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตาม การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืชที่ได้ผลมักจะต้องใช้เชื้อปฏิปักษ์ที่เพิ่ม

ปริมาณเชื้อได้จำนวนมาก ทำให้ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะส่วนประกอบของแหล่งอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ที่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* เพื่อพัฒนาเป็นเซลล์ความหนาแน่นสูง และศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรในการลดการใช้สารเคมีต่อไปในอนาคต

2.งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยางพารา

ยางพาราเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่มีอายุยืนยาว เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ อยู่ใน Family Euphorbiacea มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ พบบริเวณลุ่มน้ำอเมซอนในประเทศบราซิล (Law, 2009; Mead, 2001) ซึ่งยางพาราจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับมันสำปะหลัง ละหุ่ง โกสณ โป๊ยเซียน และชวนชม เป็นต้น

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ยางพารา (เอกชัย, 2537; เรวัต, 2547; สำนักวิจัยและพัฒนากิจการที่ดิน, 2548)

ราก (Root) ยางพารามีราก 2 ชนิด คือ รากแก้ว ความยาวประมาณ 1.5- 2 เมตร ทำหน้าที่หาอาหารและยึดลำต้น และรากแขนงที่สามารถแผ่ได้ไกลถึง 20 เมตร

ลำต้น (Stem) ยางพาราเป็นไม้ยืนต้นประเภทเนื้ออ่อน เปลือกหนาประมาณ 6.5-15 มิลลิเมตร โดยลำต้นยางพาราประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ เนื้อไม้แข็ง (Pith), เนื้อไม้ (Wood), เยื่อเจริญ (Cambium) และเปลือกไม้ (Bark)

ใบ (Leaf) ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบ มี 3 แฉก ใบมีสีเขียวเป็นมัน สีอาจจะเข้มหรือจางมากน้อยจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ และใบยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร

ดอก (Flower) ดอกทำหน้าที่ขยายพันธุ์ ดอกมีลักษณะเป็นช่อยาวออกตามปลายกิ่ง ดอกมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในช่อเดียวกัน ปกติยางจะออกดอกปีละ 2 ครั้ง โดยจะออกในราวเดือน

กุมภาพันธ์-มิถุนายน ครั้งหนึ่งและจะออกในเดือนสิงหาคม-ตุลาคม อีกครั้งหนึ่ง การออกดอกครั้งแรกเป็นการออกดอกตามฤดูกาลซึ่งจะให้ผลและเมล็ดมากกว่าการออกดอกครั้งที่สอง

ผล (Fruit) เกิดจากการผสมระหว่างเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ยางพาราเป็นพืชที่มีการผสมเกสรแบบเปิด ดอกที่ผสมติดแล้วรังไข่จะขยายตัวออกช้า ๆ มีลักษณะเป็นพู่ 3 พู่ ในแต่ละพู่จะมีเมล็ดอยู่ข้างใน ผลอ่อนมีผิวสีเขียวแก่ เมื่อผลแก่ผิวมีสีน้ำตาลและแข็ง เมื่อโตเต็มที่ผลยางพาราจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 4.5-5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 4.5 เซนติเมตร

เมล็ด (Seed) มีสีน้ำตาลลายขาวคล้ายเมล็ดตะขุ เมล็ดของยางพารามีความยาวและกว้างประมาณ 2.00 – 2.25 เซนติเมตร \times 1.5 – 2.5 เซนติเมตร มีน้ำหนักประมาณ 3 – 6 กรัมต่อเมล็ด ความงอกของเมล็ดเมื่อเก็บใหม่ ๆ ในอุณหภูมิปกติเปอร์เซ็นต์ความงอกจะสูง โดยปกติเมล็ดยางพาราจะรักษาความงอกได้ประมาณ 20 วัน ดังนั้นผู้ที่เพาะเพื่อขยายพันธุ์ จึงต้องรีบนำไปเพาะโดยเร็ว

2.3 พื้นที่เหมาะสมสำหรับการปลูกยางพารา

ยางพาราจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและปลูกมากในแถบภาคใต้ และต่อมาได้มีการขยายพื้นที่ปลูกยางพาราไปยังแหล่งปลูกยางพาราใหม่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ซึ่งมีสภาพแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยต่อการปลูกยางพารา เช่น การขาดความชื้น อุณหภูมิสูง ลมแรง ประกอบกับในแหล่งปลูกยางพาราดังกล่าวมีสภาพพื้นที่เป็นที่สูงลาดชัน ความลึกของดิน โครงสร้างเนื้อดิน การระบายน้ำ และคุณสมบัติทางเคมีต่ำ แต่ยางพารามีคุณสมบัติสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เพราะฉะนั้นในการปลูกยางพารานอกจากพิจารณาเลือกพันธุ์ยางพารา และการจัดการสวนยางพาราที่ถูกต้องแล้ว การเลือกพื้นที่ให้มีความเหมาะสมต่อการปลูกยางพารานั้นนับว่าเป็นเรื่องสำคัญ เนื่องจากยางพาราเป็นพืชยืนต้นมีรากแก้วยังลึกลงไปใต้ดินเพื่อพวงลำต้น ดังนั้นพื้นที่ปลูกยางพาราควรต้องเป็นดินที่มีความลึกไม่น้อยกว่า 1 เมตร และควรมีระดับน้ำใต้ดินต่ำกว่า 1 เมตร ดินที่ปลูกยางพาราควรมีเนื้อดินเป็นดินเหนียวถึงดินร่วนปนทราย หรือดินร่วน ค่าความเป็นกรดต่างของดิน (pH) ระหว่าง 4.0-5.5 มีการระบายน้ำและอากาศถ่ายเทได้สะดวก และสามารถอุ้มน้ำได้ดี เพื่อให้รากยางพาราสามารถดูดใช้ธาตุอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และควรมีความลาดเอียงของพื้นที่ไม่เกิน 15 องศา มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 400-500 เมตร ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 2,000-3,000 มิลลิเมตร ต่อปี และมีวันเฉลี่ยฝนตกต่อปี 170-200 วัน (ภูวดล, 2549) การปลูกยางพาราในพื้นที่ภาคใต้มักประสบ

ปัญหาในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำหรือค่อนข้างต่ำ เนื่องจากภาคใต้เป็นภูมิภาคที่มีปริมาณฝนมาก ดินมีพัฒนาการสูง และดินส่วนใหญ่มีสภาพเป็นกรด ทำให้ธาตุอาหารในดินแปรสภาพหรือถูกตรึงไว้ในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ (ยงยุทธ และคณะ, 2551) อาจส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตลดลง อีกทั้งยังพบปัญหาและอุปสรรคของการปลูกยางพาราที่เกิดจากโรคระบาดตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงต้นโตเก็บเกี่ยวผลผลิตได้

2.4 ปัญหาการเกิดโรคในยางพารา

ยางพาราเป็นพืชยืนต้นที่เกษตรกรจำเป็นต้องดูแลรักษาให้มีอายุอย่างน้อย 25-30 ปี จึงเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่เกษตรกรจะต้องประสบปัญหาเรื่องโรคระบาดในระยะใดระยะหนึ่งของการทำสวนยางพารา โรครยางพาราที่พบในประเทศไทยเกิดขึ้นได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และทุกส่วนของต้นยางพารา ซึ่งสามารถจำแนกตามส่วนต่าง ๆ ของต้นยางพาราที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย ได้แก่ โรคใบ โรคกิ่งก้านและลำต้น และโรคราก แม้ว่ายางพาราจะมีโรคระบาดอยู่หลายชนิด และพันธุ์ยางพาราที่นิยมปลูกในปัจจุบันจะอ่อนแอต่อโรคที่สำคัญ โดยเฉพาะโรครากที่เกิดขึ้นจากเชื้อราเข้าทำลายระบบราก ส่งผลให้ต้นยางพาราชะงักการเจริญเติบโต แคระแกร็น และให้ผลผลิตลดลง ซึ่งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในยางพารามีด้วยกันหลายชนิด เช่น โรครากแดง (Red root rot disease) เกิดจากเชื้อรา *Ganoderma pseudoferreum* (Wakef) Over & Steinm โรครากน้ำตาล (Brown root rot disease) เกิดจากเชื้อรา *Phellinus noxius* (Couner) G.H. Cunn และโรครากขาว (White root rot disease) เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem เป็นต้น โรคในยางพาราที่ระบาดในพื้นที่ประเทศไทยสามารถพบได้ในสวนยางพาราที่มีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป และมีระดับความรุนแรงมากน้อยแตกต่างกันตามแหล่งที่ปลูก โดยเฉพาะโรครากขาวมีพื้นที่ระบาดและทำความเสียหายให้กับสวนยางพารามากที่สุด ทั้งในแปลงยางใหญ่และแปลงยางเล็ก

2.5 โรครากขาว (White root rot disease)

โรครากขาว (White root rot disease) จัดเป็นโรคทางรากชนิดหนึ่งที่เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (SW.) Overeem เป็นเชื้อราจำพวกเห็ดที่อาศัยอยู่ในดิน เชื้อราสามารถเข้าทำลายรากยางพาราได้ทุกระยะการเจริญเติบโต เมื่อส่วนรากถูกทำลายเสียหายจนไม่สามารถดูดน้ำ

และธาตุอาหารได้ จึงแสดงอาการผิดปกติคือ ขอบใบจะห่อลงเล็กน้อยและค่อนข้างหนาเป็นคลื่น ทรงพุ่ม มีขนาดเล็กและเปลี่ยนเป็นสีเหลืองในบางกิ่งหรือทั้งทรงพุ่ม และเมื่ออาการรุนแรงใบจะร่วงหมดทั้งต้น และยืนต้นตายหรือโค่นล้ม เมื่อขุดรากจะพบเห็นเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญปกคลุมทั่วผิวราก จึงเรียกโรครากขาวตามสีของเชื้อสาเหตุ (Kaewchai *et al.*, 2010) และเมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อราและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) และ Malt agar (MA) พบว่าเส้นใยเชื้อรามีสีขาว ค่อนข้างหยาบ เส้นใยเป็นแบบ monomitic ผนังบาง มี septa เส้นใยไม่มีสี สปอร์มีรูปร่างกึ่งกลมจนถึงกลม ผิวเรียบ มีขนาด 3.5-4.5*3.5-4 ไมโครเมตร เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นจะเจริญรวมกันเป็น rhizomorphs มีลักษณะกลม นูนและกลายเป็นสีเหลืองซีดหรือแดงซีด (Hood, 2006; อารมณ, 2541; สายทอง, 2556)

2.6 การเข้าทำลายของโรครากขาว

กลไกการเข้าทำลายโดยเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรครากขาวจะแทงเข้าทำลายรากไม้หรือย่อยสลายเนื้อไม้ให้ผง โดยเชื้อราพัฒนาเส้นใย rhizomorph เข้าทำหน้าที่แพร่กระจายเชื้อและเจริญยึดเกาะบริเวณผิวรากเพื่อเข้าทำลายเซลล์ราก ซึ่งการแทงเข้าทำลายเนื้อไม้ของเชื้อจะเกิดร่วมกันระหว่างวิธีกลและปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ของระบบท่อน้ำและท่ออาหาร ซึ่งเอนไซม์จะแพร่กระจายเข้าสู่เซลล์ โดยการแทงผ่านช่องว่างและท่อต่าง ๆ ของเซลล์ เอนไซม์ที่ผลิตเพื่อย่อยส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ เช่น cellulose hemicellulose และ lignin จากการตรวจสอบเนื้อไม้ที่เป็นโรคพบว่าโครงสร้างของเซลล์ถูกทำลายส่วนของ middle lamella และผนังเซลล์ถูกย่อยสลาย และในเนื้อไม้ที่เป็นโรคจะพบเอนไซม์ laccase ปริมาณมาก (สายทอง, 2556) เมื่อโครงสร้างของเซลล์ถูกทำลาย เชื้อจะสามารถกระจายและเข้าทำลายต้นได้ โดยเส้นใย rhizomorphs จะเข้าไปยึดเกาะและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และสามารถแผ่ปกคลุมเป็นบริเวณกว้างผ่านดินโดยไม่ต้องอาศัยชิ้นส่วนของรากพืช จึงทำให้ต้นยางปกติสามารถติดเชื้อโดยเส้นใย rhizomorphs จากตอไม้หรือเศษไม้ที่ติดเชื้อซึ่งฝังอยู่ในพื้นดิน (Nandris *et al.*, 1987; Omorusi, 2012) เชื้อราสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่ค่อนข้างเป็นด่าง และแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในช่วงฤดูฝน ซึ่งโรคจะแพร่ระบาดโดยการสัมผัสกันของรากที่เป็นโรคและรากปกติในพื้นที่สวนยางพาราปลูกใหม่หลังจากการโค่น หลังจากต้นยางที่ติดเชื้อยืนต้นตายหรือโค่นล้มจะพบดอกเห็ดเกิดขึ้นบริเวณโคนต้น ลักษณะของดอกเห็ด จะแบน และกว้าง บางครั้งมีลักษณะบาง ไม่มีก้านดอก

เป็นกลุ่มก้อน ด้านบนมีสีเหลืองแดงปนน้ำตาล มีรอยย่น เมื่อแก่จะเรียบ สีจะจางลง เหลียว ด้านล่างสีน้ำตาลส้มสด เมื่อแก่สีจะซีด มีรูขนาดเล็ก ประมาณ 6-9 รูต่อมิลลิเมตร และสร้างสปอร์จำนวนมากที่รูด้านล่างของดอกเห็ดเพื่อแพร่กระจาย ซึ่งสปอร์สามารถปลิวไปตามลมและฝน หรือติดไปกับขาแมลง เมื่อสปอร์ตกบนบาดแผลของตอย่างใหม่และมีความชื้นเพียงพอ เชื้อราจะเจริญลุกลามไปยังโคนต้น และรากต่อไป (อุไร, 2540; อารมณ, 2541; สายทอง, 2556)

2.7 การป้องกันและกำจัดราที่ก่อโรคในยางพารา

จากข้อมูลข้างต้นพบว่ายางพาราสามารถถูกเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าและสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชอาศัยได้หลายชนิด ดังนั้นผู้ปลูกยางพาราจึงจำเป็นต้องป้องกันไม่ให้เกิดการเข้าทำลายจากเชื้อรา โดยเบื้องต้นการป้องกันกำจัดโรครากขาวของยางพารา จะใช้วิธีเขตกรรมและสารเคมี โดยมีหลักการป้องกันกำจัดที่สำคัญ คือ การป้องกันการแพร่กระจายจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นปกติ โดยเริ่มทำในระยะแรก ๆ หรือเมื่อต้นยางพารามีอายุประมาณ 1 ปี และควรทำอย่างต่อเนื่อง ถ้าหากต้นยางพาราแสดงอาการเป็นโรคควรกำจัดต้นที่เป็นทั้ง เพื่อลดแหล่งเชื้อสาเหตุโรคในแหล่งที่มีการระบาด แต่การกำจัดต้นต่อของเชื้อสาเหตุโรคถือเป็นเรื่องที่ทำได้ยากสำหรับเกษตรกรรายย่อย เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง จึงทำให้ผู้ปลูกยางพาราส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีเพื่อกำจัด เพราะสามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลอย่างรวดเร็ว แต่หากใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากจะทำให้เชื้อสาเหตุโรคเกิดความต้านทานต่อสารเคมีแล้ว ยังทำให้สารเคมีเกิดการตกค้างในธรรมชาติ อีกทั้งยังก่อให้เกิดผลเสียกับพืชที่ปลูก และที่ร้ายแรงที่สุดคือ ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ปลูกเองด้วย (Basha and Ulaganathan, 2002; Singh *et al.*, 2011) ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการทางชีวภาพมาช่วยสำหรับการยับยั้งเชื้อรา เพื่อไม่ให้มีสารเคมีตกค้างในธรรมชาติ รวมถึงไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ปลูกยางพาราอีกด้วย

การใช้วิธีทางชีวภาพ คือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงและเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรค เพื่อควบคุมหรือลดความหนาแน่นของประชากรเชื้อสาเหตุโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถส่งผลเสียหายต่อพืชได้ โดยอาศัยหลักการทำงานของจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์หรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ และวิธีนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการจัดการกับโรคที่เกิดกับพืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในพืชจะช่วยทำลายและยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคพืช

และยังมีประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย เช่น ลดการใช้สารเคมีสำหรับการควบคุมโรคพืช, ช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร, ช่วยรักษาระบบนิเวศน์ และยังมีผลที่เป็นประโยชน์ต่อระบบเศรษฐกิจอีกด้วย (Pal and Gardener, 2006, Bardas *et al.*, 2009)

2.8 แบคทีเรียปฏิปักษ์ (Antagonistic Bacteria)

การป้องกันและกำจัดเชื้อสาเหตุโรคโดยแบคทีเรานั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) ที่มีประสิทธิภาพสูงในการต่อต้านหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค หรือชักนำให้พืชสามารถสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกจะต้องไม่ทำให้พืชเป็นโรคเสียเองและต้องไม่ทำให้สภาพแวดล้อมเสียหาย ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้ และพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่พบได้ทั่วไป คือ แบคทีเรียสกุล *Bacillus*

แบคทีเรียสกุล *Bacillus*

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ส่วนใหญ่จะต่อกันเป็นสายยาว มีผนังเซลล์แข็งแรงที่ประกอบด้วย peptidoglycan ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลและกรดอะมิโน (Schaechter, 2006) *Bacillus* spp. สามารถสร้างสปอร์ภายในเซลล์ โดยมี 1 สปอร์ต่อ 1 เซลล์ และสปอร์ส่วนใหญ่จะมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยสปอร์สามารถทนต่อภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างได้สูง ทนต่ออุณหภูมิสูง และภาวะออกซิเจนสูงได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (Kloepper *et al.*, 2004; Thomma and Sirithorn, 2012) ซึ่งทำให้ *Bacillus* spp. สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (El-Hassan and Gowen, 2006; Ashlee *et al.*, 2008; Basha and Ulaganathan, 2002, Caldeira *et al.*, 2006) โดยมักพบได้ทั่วไปในดิน และมีประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย และมีหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืชได้

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ทำหน้าที่เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ดี เนื่องจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์หลายชนิดที่ยับยั้งเชื้อราได้ เช่น bacillomycin, iturin A B C, mycosubtilin, subtilin, fengymycin, oxydiffidin และ cobacillin เป็นต้น ซึ่งเป็นสารจำพวกลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) (ภฤติกา, 2549; นิตยา, 2549) อีกทั้ง *Bacillus* สามารถสร้างเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ การ

ผลิตโคติเนส β -1, 3-glucanase และ pectinase เพื่อลดการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา (Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Turan *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008) *Bacillus amyloliquefaciens* (BLB369), *Bacillus subtilis* (BLB277) และ *Paenibacillus polymyxa* (BLB267) สามารถผลิต iturin, surfactin, fengycin, fusaricidin และ polymyxin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. graminearum* ในต้นข้าวสาลี (Kolsi *et al.*, 2016) นอกจากนี้จะผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้พืชมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย (Ongena and Jacques, 2008) *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 สามารถต้านทานต่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้หลายชนิด เช่น ส้ม แอปเปิ้ล องุ่น และพีช เป็นต้น เมื่อทดสอบประสิทธิภาพ *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด ได้แก่ *B. cinerea*, *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. expansum* และ *P. italicum* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *M. laxa* ได้ดีที่สุด และ *P. italicum* ได้น้อยที่สุด และเมื่อนำเซลล์ น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส และเอนโดสปอร์ของ *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 ทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคบนผลไม้ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. Digitatum* และ *P. italicum* ในส้ม ลดการเกิดโรคจาก *P. expansum* ในแอปเปิ้ล และสามารถควบคุมโรคเน่าในพีชได้เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้น *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 จึงเหมาะที่จะเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อที่จะนำไปใช้ในการเก็บรักษาผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวก่อนนำสู่ตลาดได้ (Calvo *et al.*, 2017) นอกจากนี้ *Bacillus* spp. ยังสามารถผลิตฮอร์โมนพืชหรือกระตุ้นให้พืชหาอาหาร และการดูดซึมจากดินผ่านกลไกต่าง ๆ มากขึ้น เช่น การตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศ (Lakshminarayana *et al.*, 1992) การกระตุ้นการละลายของฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ (Kundu and Gaur, 1980) การสังเคราะห์สารประกอบธาตุเหล็ก (Glick *et al.*, 2007) การผลิตกรดอินทรีย์ (IAA) ซึ่งช่วยเพิ่มการเจริญของรากและลำต้น จึงมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเพิ่มมากขึ้น และลดการเกิดโรคในพืช (Oteino *et al.*, 2015)

2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์

อัตราการเจริญหรือการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอาหารจะเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมหรือปัจจัยหลายประการ ดังนี้

1) สารอาหาร (Nutrient) สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากสารอาหารเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นต่อการสร้างเซลล์ใหม่ ซ่อมแซมเซลล์ที่สึกหรอ สังเคราะห์สารพันธุกรรม โดยสารอาหารจะแตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย และจะต้องมีธาตุที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารอาหารเหล่านั้น ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ไนโตรเจน (N) กำมะถัน (S) ฟอสฟอรัส (P) และ Growth factor จำพวกกรดอะมิโนกับเบสกลุ่มพิวรีน (Purine) และไพริมิดีน (Pyrimidine) ส่วนที่เหลือเป็นแหล่งแร่ธาตุอื่น ๆ อีกเล็กน้อยเพื่อให้แบคทีเรียนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างเซลล์ใหม่หรือซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ

แหล่งคาร์บอน (Carbon Source) เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้งสาทิ แป้งมัน น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาล เป็นต้น นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอน ปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นการเลือกชนิดและการใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาให้เหมาะสม โดยมีรายงานการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสูงเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กากน้ำตาล รำข้าว ฟางข้าว หางนม กากขานอ้อย เปลือกมะนาว เปลือกส้ม เปลือกกล้วย และเปลือกมันฝรั่ง เป็นต้น รวมทั้งเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย เพื่อมาทดแทนแหล่งคาร์บอนที่มีราคาสูง (Kumar *et al.*, 2016; Mabrouk *et al.*, 2014) สอดคล้องกับรายงานของ Patel และ Prajapati (2014) ที่พบว่า *Cladosporium sp.* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนสได้ในอาหารที่เตรียมจากรำข้าว เช่นเดียวกับ Ho (2015) ที่พบว่า *Bacillus subtilis* ATCC 6633 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนสได้ดีในอาหารที่เตรียมจากเปลือกข้าวบาร์เลย์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยง *B. megaterium* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเซลล์ได้ในปริมาณ 32.48 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ที่ได้เท่ากับ 2.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Kanjanchumpol *et al.*, 2013)

แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen Sources) ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน การสร้าง ATP และเอนไซม์ ตลอดจนกรดนิวคลีอิก แหล่งของไนโตรเจนมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ซึ่งวัตถุดิบที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้แบคทีเรีย เช่น แป้ง ถั่วเหลือง กากน้ำตาล ยูเรีย สารอินทรีย์ (กรดอะมิโน เพปไทด์และโปรตีน) สารอนินทรีย์ (เกลือไนเตรต ไนเตรตหรือแอมโมเนีย) เป็นต้น โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งอาหารได้แตกต่างกันออกไป บางชนิดสามารถ

เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ บางชนิดเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปอินทรีย์ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น การใช้ยีสต์สกัดส่งผลให้เชื้อ *Bacillus subtilis* LAMI008 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Rocha *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับ *Pseudomonas fluorescens* P-6 สามารถใช้สารสกัดจากยีสต์และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากมอลต์และยูเรียแหล่งไนโตรเจนได้ (Peigham *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า *Pediococcus* sp. R16 สามารถใช้กลูโคสและเพนโทปเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (ธิดา, 2557) ขณะที่การศึกษาของ Oliveira และคณะ (2014) รายงานว่า *Rhodopseudomonas palustris* และ *Rhodobacter capsulatus* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้จากหางนม และใช้แหล่งไนโตรเจนได้จาก กลูตามेट ซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ได้อีกด้วย

แหล่งธาตุอาหารต่าง ๆ เช่น P, K, Mg, Fe, Mn, Ca, Cu, Zn, Co เป็นต้น เป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญตามปกติของแบคทีเรีย และบางชนิดจัดเป็น Co factor ที่สำคัญของเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ ฟอสฟอรัส (P) ซึ่งเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาการสร้างและถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ ส่วนโพแทสเซียม (K) ช่วยการทำงานของเอนไซม์และสร้างโปรตีน ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ เช่น การใส่ *Rhizobium* ร่วมกับ *Bacillus* sp. ส่งผลให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้น 36.9% เมื่อเปรียบเทียบกับการใส่ *Bacillus* sp. เพียงอย่างเดียว (Akhtar *et al.*, 2013) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vikram และ Hamzeharghani (2008) พบว่าการเติมหินฟอสเฟตร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ส่งผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงกว่าการเติมหินฟอสเฟตหรือปุ๋ยฟอสฟอรัสเพียงอย่างเดียว ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเติมหินฟอสเฟตช่วยส่งเสริมกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถหลั่งกรดหรือเอนไซม์ออกมาเพื่อทำการละลายฟอสฟอรัสที่ละลายได้ง่ายก่อน ซึ่งหินฟอสเฟตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสที่ง่ายต่อการละลายและจุลินทรีย์สามารถนำฟอสฟอรัสที่ละลายได้ไปใช้ในการสร้างพลังงาน เจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaurand (2015) ที่ได้ศึกษาผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดและข้าวสาลี พบว่าการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับหินฟอสเฟตส่งผลให้จำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่สามารถละลายโพแทสเซียมจากแร่ที่มีโพแทสเซียมเป็นส่วนประกอบได้ เช่น แร่ไมกา มัสโคไวท์ ออร์โทเครส

และไบโอไทต์ เป็นต้น อาจเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก กรดฟอร์มิก เป็นต้น โดยกรดอินทรีย์ดังกล่าวสามารถช่วยส่งเสริมการสลายตัวของแร่ และช่วยเพิ่มการแตกตัวของสารประกอบอินทรีย์ โดยการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างกรดอินทรีย์และไอออน ได้แก่ Fe^{2+} , Al^{3+} และ Ca^{2+} (Styriakova *et al.*, 2003; Sheng *et al.*, 2003; Sheng and He, 2006) ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถละลายโพแทสเซียม ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Bacillus extroquens* และ *Clostridium pasteurianum* เป็นต้น (Archana *et al.*, 2013) จากงานวิจัยของกมลชนก และคณะ (2562) พบว่าการแช่เมล็ดข้าวด้วยแบคทีเรีย KSB (Broth) ส่งเสริมให้การงอกสูงสุดร้อยละ 96.75 ส่วนเมล็ดที่แช่ด้วย KSB (เซลล์) ทำให้ความเร็วในการงอกของเมล็ดข้าวสูงเฉลี่ย 30.66 ต้นต่อวัน จึงชี้ให้เห็นโพแทสเซียมช่วยกระตุ้นกลไกการงอกของเอมบริโอจึงส่งเสริมให้เมล็ดงอกเร็วขึ้น

2) ความชื้น (Moisture) ความชื้นจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการออสโมซิสของเซลล์ เช่น การแช่เมล็ดพันธุ์ร่วมกับจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสกุล *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* และ *Bacillus* เป็นต้น (Kangsopa *et al.*, 2018) ซึ่งการแช่เมล็ดพันธุ์เป็นการเพิ่มความชื้นให้กับเมล็ดพันธุ์ โดยการแช่เมล็ดในน้ำหรือสารละลายที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วงระยะเวลาที่นานเพียงพอที่จะทำให้เมล็ดมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางชีวเคมีและสรีรวิทยาต่างๆ (Bewley and Black, 1982) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจักรพงษ์ และคณะ (2564) ที่ศึกษาอัตราส่วนของ *B. subtilis* และระยะเวลาการไพรม์ที่เหมาะสมต่อเมล็ดพันธุ์ฝักกาดหอม พบว่าการไพรม์เมล็ดพันธุ์ด้วย *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 0.4% นาน 12 ชั่วโมง ทำให้เมล็ดมีความงอกและความเร็วในการงอกดี อีกทั้งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของลำต้นและมีผลรวมต้นกล้าดีขึ้น

3) อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิเป็นปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีในเซลล์เพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์หรือโปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพการทำงานได้ ดังนั้นแบคทีเรียแต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันไป เช่นเดียวกับ *B. licheniformis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 30 องศาเซลเซียส (Abarike *et al.*, 2018) และ *B. wiedmannii* MSM และ *B. subtilis* ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสเช่นกัน (Chen *et al.*, 2018) นอกจากนั้น *B. subtilis* BTK07 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 30

องศาเซลเซียส ขณะที่ *B. gottheilii* BTK10 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส (นฤมล และสุดาทิพย์, 2562) ในทำนองเดียวกัน *B. circulans* BL53 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ *B. circulans* BL53 สามารถผลิตไซลานเนสได้สูงสุด (Heck *et al.*, 2005) ดังนั้นปัจจัยเรื่องของอุณหภูมิจึงมีความสำคัญต่อกิจกรรมเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตและผลิตสารเมตาบอลิต์ต่าง ๆ ที่สำคัญในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้น

4) ความเป็นกรด-ด่าง (Acidity or alkalinity, pH) แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีที่พีเอช 6-8 ส่วนเชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างไปจากสภาวะเดิมอาจส่งผลต่อโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง และการดูดซึมสารอาหารผิดปกติ ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างอาจจะเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำให้สภาพอาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเมตาบอลิต์ (Elsayed *et al.*, 2014) เช่น *B. subtilis* MAN511 สามารถผลิตแมนนานเนสสูงที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0 (Utami *et al.*, 2016) เช่นเดียวกับ Siddiqui *et al.* (2016) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Paenibacillus* sp. พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตไซลานเนสที่มีพีเอชเท่ากับ 7.0 สามารถผลิตไซลานเนสได้สูงที่สุด ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Raja *et al.* (2018) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* อยู่ในช่วงพีเอชเท่ากับ 8.0 และสามารถผลิตไซลานเนสได้สูงที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 9.0

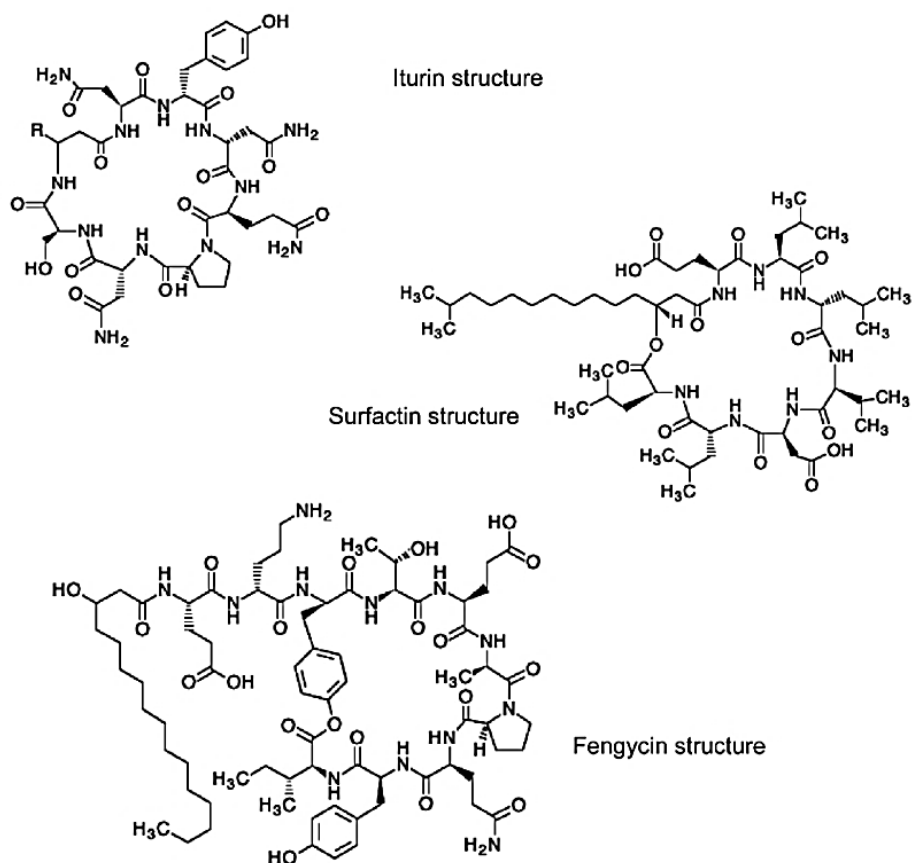
2.10 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp.

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะและออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะอาจจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ, การให้อากาศ, และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ปัจจัยดังกล่าวมีมากมายสามารถส่งผลต่อการผลิตสารชนิดต่าง ๆ ในแบคทีเรียชนิดเดียวกัน หรือแม้ว่าจะเป็นเชื้อในกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกันมากอีกด้วย (Keller *et al.*, 2005; Moita *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2002; Sumi *et al.*, 2014) เช่น *B. amyloliquefaciens* (QST 713) สามารถผลิต bacitracin

(Anastassiadou, 2011) และ *B. velezensis* สามารถผลิต surfactin, bacillomycin-D, fengycin และ bacillibactin (Rabbee *et al.*, 2019) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง และมีคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค โดยสารเหล่านี้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำและโครงสร้างที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 1) กล่าวคือ Surfactin มีกรดอะมิโนชนิดแอลฟา 7 โมเลกุล คือ L-Glu-L-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-leu และ β -hydroxy fatty acid คาร์บอน 13-15 อะตอม สำหรับ Fengycin มีกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นวงซึ่งมีคาร์บอน 14-18 อะตอม ขณะที่ Iturin A ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดเบต้า 7 โมเลกุลต่อกันเป็นวงและมีโมเลกุลของกรดไขมัน 14-17 คาร์บอนอะตอม สารในกลุ่ม Iturin A ประกอบด้วย bacillomycin D, bacillomycin F, bacillomycin L และ mycosubtilin ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้โดยเชื้อ *B. subtilis* (Besson and Michel, 1992) ทั้ง Fengycin และ Iturin A มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อรา และทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค (Rosenberg and Ron, 1997; 1999) เช่น *B. subtilis* CMB32 ที่คัดแยกได้จากดิน สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวจำพวก lipopeptide ได้แก่ Iturin A, fengycin, และ surfactin A ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในพืชได้ (Kim *et al.*, 2010) *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., และ *Bipolaris sorokiniana* หลังจากทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีน คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร และการสกัดด้วยตัวทำละลายพบว่า สารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้แก่ iturin และ surfactin (Benitez *et al.*, 2010) เช่นเดียวกับน้ำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* B29 มาทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสารและแบบอาศัยความแตกต่างของขนาดมวลและรูปร่างของโปรตีน พบว่า *B. subtilis* B29 สามารถผลิตสารที่เรียกว่า B29I ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด ได้แก่ *F. oxysporum*, *R. solani*, *F. moniliforme*, และ *S. sclerotiorum* เป็นต้น (Li *et al.*, 2009)

ดังนั้นบทบาทของสารปฏิชีวนะต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแบคทีเรียปฏิชีวนะสามารถปล่อยสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่สามารถละลายน้ำและแพร่ซึมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากสามารถเข้าครอบครองพื้นที่และแหล่งอาหารระหว่างเชื้อทั้งสองได้ดี ทำให้แบคทีเรียปฏิชีวนะเป็นแบคทีเรียที่สามารถ

ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในพืชได้หลากหลายชนิดและเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ จึงเหมาะสมที่จะนำไปศึกษากลไกการยับยั้งหรือการควบคุมโรคพืชต่อไป



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ iturin, surfactin และ fengycin

ที่มา : Mondol *et al.*, 2013

2.11 กลไกการป้องกันของแบคทีเรียปฏิปักษ์

กลไกการทำงานของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีกลไกการทำงาน 4 ลักษณะ ได้แก่ 1. การแข่งขัน (competition) 2. การเป็นปรสิต (parasitism) 3. การสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ (antibiosis and enzyme) 4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) โดยจะยกตัวอย่างกลไกการทำงานของแบคทีเรียที่สามารถไปทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ดังนี้

1) การแข่งขัน (Competition)

แบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคสามารถแข่งขันและครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า สามารถเข้าแย่งชิงแหล่งอาหาร และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ทำให้แบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์มีจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคขาดสารอาหาร เจริญเติบโตช้าลงหรือไม่สามารถเจริญเติบโต และยังช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Lugtenberg and Kamilova, 2009)

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคด้วยกลไกการแข่งขัน เช่น *Bacillus subtilis* สามารถเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโคนเน่าของมะเขือเทศได้ (นริศรา และคณะ, 2560) *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPT33.1.2 สามารถเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก (ปฏิมาพร, 2551) *Bacillus* sp. มีกลไกในการควบคุมโรคเหี่ยวหรือโรคใบเหลืองที่เกิดจาก *Fusarium* sp. ได้โดยมีการแย่งอาหารและสร้างไซเดอโรฟออร์เพื่อเข้าแย่งจับธาตุเหล็ก ทำให้ไปรบกวนการงอกและการเจริญของ *Fusarium* sp. ดังนั้นจึงช่วยลดการก่อโรคเหี่ยวหรือโรคใบเหลืองที่เกิดจาก *Fusarium* sp. ได้ (Gajera et al., 2016) ดังนั้นการแก่งแย่งแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

2) การสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ (Antibiosis and Enzyme)

แบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคจะสร้างสารพิษที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อก่อโรค หรือสร้างเอนไซม์เข้าทำลายเส้นใย ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรค เพื่อควบคุมไม่ให้เชื้อสาเหตุก่อให้เกิดโรคพืชได้ โดยพบว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ได้หลากหลายชนิด เช่น iturin, surfactin, fengycin, fusaricidin และ polymyxin ที่สร้างมาจาก *B. amyloliquefaciens* (BLB369), *B. subtilis* (BLB277) และ *Paenibacillus polymyxa* (BLB267) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. graminearum* ในต้นข้าวสาลี (Kolsi et al., 2016) นอกจากนี้ *B. velezensis* สายพันธุ์ NKG-2 ที่ผลิตเอนไซม์ chitinase, cellulase, β -glucanase และ amylase เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (Ei et al., 2019) เช่นเดียวกับ *B. circulans* WL-12 สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการย่อยสลายไคติน (Da et al., 2014; Watanabe et al., 1990) และ *B. subtilis* ที่แยกมาจากดินปลูกพริก สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase, glucanase และ cellulase ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C.*

gloeosporioides OCC1 ได้ (Ashwini and Srividya, 2014) ขณะที่ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 739 สามารถผลิตเอนไซม์ β -1,3- glucanase และ protease ได้ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่ผสมโคติน โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะมีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* (Aktuganov *et al.*, 2007) นอกจากนี้มีรายงานว่า Cyclo (d-Pro-L-Val) ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สร้างมาจาก *B. amyloliquefaciens* Y1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. graminearum* สาเหตุโรคเมล็ดเน่าในเมล็ดข้าวสาลีได้ สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า *F. graminearum* มีรูปร่างผิดปกติ เซลล์แตกสลาย และถูกทำลายหลังจากถูกยับยั้งด้วย Cyclo (d-Pro-L-Val) และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ความเข้มข้นของ Cyclo (d-Pro-L-Val) เท่ากับ 1000 ppm เป็นเวลา 10 วัน (Jamal *et al.*, 2017)

3) การเป็นปรสิต (Parasitism)

แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีสมบัติเป็นปรสิตสามารถควบคุมโรคพืชได้ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์จะเข้าไปเจริญและทำลายเชื้อสาเหตุโรค เพื่อแย่งชิงอาหารและสารอาหารที่มีประโยชน์จากเชื้อสาเหตุโรค ทำให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถแพร่กระจายต่อไปได้ เช่น *B. Thuringiensis* สามารถสร้างเอนไซม์บางชนิดที่มีผลต่อการเจริญของไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne* spp.) ในระยะแรก ส่งผลให้ประชากรของไส้เดือนฝอยลดลง (Kotze *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับ *B. thuringiensis* (CR-371) สามารถลดการสร้างไข่ของไส้เดือนฝอยบริเวณรากของต้นรากมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Elsharkawy *et al.*, 2015) นอกจากนี้มีรายงานว่า *Pasteuria penetrans* เป็นปรสิตกับไส้เดือนฝอย และสามารถยับยั้งการเกิดโรคจากไส้เดือนฝอยได้ (Davies, 2009) ขณะที่ *Trichoderma virens* NBAll Tvs 12 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุของโรคลำต้นเน่าในถั่วลิสง หลังจากสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยของ *T. virens* NBAll Tvs 12 สามารถเจริญเข้าไปใน *S. rolfsii* ได้ ทำให้ *S. rolfsii* ถูกยับยั้งและไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (Hirpara *et al.*, 2016)

4) การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced Disease Resistance)

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการกระตุ้นให้พืชป้องกันตัวเองจากเชื้อสาเหตุโรค โดยระบบภูมิคุ้มกันของพืชที่เกิดขึ้นจะสามารถทำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้ดี และยังส่งผลให้พืชมีการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Salomon *et al.*, 2017) เช่น *B. velezensis* NKG-2 สามารถผลิต indole-3-acetic acid (IAA) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต และสามารถเข้าทำลาย

ของเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ (Ei et al., 2019) เช่นเดียวกับการใช้ *B. cereus* N55314 และ *Serratia* sp. N43203 ส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยการคลุกเมล็ด ทำให้เมล็ดข้าวเจริญได้ดีที่ 98.89 และ 91.11 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวราก 6.42 และ 4.77 เซนติเมตร มีความสูงต้น 4.91 และ 3.19 เซนติเมตร (อนุสรฯ และสุพจน์, 2561) นอกจากนี้ *Bacillus* sp. CHEP5 และ *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 สามารถทำให้ต้นถั่วสร้างปมราก ส่งผลให้ต้นถั่วมีระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถสร้างความต้านทานต่อการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* สาเหตุโรคลำต้นเน่าในต้นถั่วลิสงได้ และส่งเสริมให้เมล็ดถั่วลิสงมีขนาดใหญ่ขึ้น (Figueredo et al., 2017)

3. วัตถุประสงค์

3.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิบัคซ์ *Bacillus subtilis* และเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา

3.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัคซ์ *Bacillus subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพาราในห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 2.1.1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ งานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ฟลาสก์ ปีกเกอร์ กระจกบอกรวม แผ่นสไลด์ และ cover slip
- 2.1.2. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูบ มีดผ่าตัด แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปากคืบ cork borer
- 2.1.3. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 100 1000 และ 5000 ไมโครลิตร
- 2.1.4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- 2.1.5. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 2.1.6. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air-flow cabinet)
- 2.1.7. ตู้อบเชื้อ (hot air oven)
- 2.1.8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 2.1.9. เครื่องเขย่าผสม (vortex mixture)
- 2.1.10. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)
- 2.1.11. กล้องจุลทรรศน์
- 2.1.12. ตู้เย็น (refrigerator)
- 2.1.13. ไมโครเวฟ (microwave)
- 2.1.14. กล้องถ่ายรูป (camera)
- 2.1.15. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 2.1.16. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (duran)
- 2.1.17. พลาสติก
- 2.1.18. จอบ
- 2.1.19. ซ้อนปลูก

- 2.1.20. สายยางสำหรับรดน้ำ
- 2.1.21. ถังพลาสติก/กระถาง
- 2.1.22. ไร่ข้าวละเอียด
- 2.1.23. ปลายข้าว

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 2.2.1. Nutrient agar (NA)
- 2.2.2. Nutrient Broth (NB)
- 2.2.3. Potato dextrose agar (PDA)
- 2.2.4. Potato dextrose (PDB)
- 2.2.5. สูตรดัดแปลง PDA เสริมไร่ข้าวและปลายข้าว
- 2.2.6. สูตรดัดแปลง PDB เสริมไร่ข้าวและปลายข้าว

2.3 เคมีภัณฑ์

- 2.3.1. Agar
- 2.3.2. Glucose
- 2.3.3. Guaiacol
- 2.3.4. Ethyl alcohol 70 และ 95 %
- 2.3.5. Ammonium nitrate (NH_4NO_3)
- 2.3.6. Ammonium sulfate [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]
- 2.3.7. Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)
- 2.3.8. di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)
- 2.3.9. Potassium nitrate (KNO_3)
- 2.3.10. Potassium sulfate (K_2SO_4)
- 2.3.11. Dichloromethane
- 2.3.12. Ethyl Acetate

- 2.3.13. Hexane
- 2.3.14. Acetone
- 2.3.15. Chloroform-d (CDCl₃)
- 2.3.16. Deuterium oxide (D₂O)

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษาจุลินทรีย์

2.4.1. แบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยของการจัดการดินและแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรครากขาวของยางพารา และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ถูกเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2. เชื้อสาเหตุโรค

เชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยของการจัดการดินและแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรครากขาวของยางพารา และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ถูกเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.5 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทดสอบ

2.5.1. การเตรียมเซลล์ของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ 3 ลูป ถ่ายลงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 96 ชั่วโมง เพื่อใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในการทดสอบ

2.5.2. การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยง *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.6 ชนิดของแหล่งอาหารสำหรับทดสอบ

2.6.1. แหล่งคาร์บอน ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน 2 แหล่ง คือ รำข้าว โดยแปรผันความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และปลายข้าว โดยแปรผันความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

2.6.2. แหล่งไนโตรเจน ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่ง คือ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และแอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] โดยแปรผันความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1, 2 และ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร

2.6.3. แหล่งฟอสฟอรัส ศึกษาผลของแหล่งฟอสฟอรัส 2 แหล่ง คือ โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) และไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) โดยแปรผันความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 5, 15, 25 และ 35 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร

2.6.4. แหล่งโพแทสเซียม ศึกษาผลของแหล่งโพแทสเซียม 2 แหล่ง คือ โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) โดยแปรผันความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร

2.7 ศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

2.7.1. การเจริญของแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *Bacillus subtilis*

นำแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 จากข้อ 2.5.1 ทดสอบด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหารแข็ง PDA เสริมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส และแหล่งโพแทสเซียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามข้อ 2.6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น บันทึกผลโดยตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เจริญบนอาหารดังกล่าว

2.7.2. การเจริญของเชื้อรา *R. microporus*

ตัดโคโลนีของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง PDA อายุ 7 วัน นำมาวางห่างจากขอบจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารแข็ง PDA เสริมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส และแหล่งโพแทสเซียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามข้อ 2.6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น บันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 และตัดปลายเส้นใยเชื้อราเพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา

2.8 คัดเลือกแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture (Torres *et al.*, 2017)

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส และแหล่งโพแทสเซียม ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามข้อ 2.6 โดยวางเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 7 วัน ซึ่งเจาะด้วย steel cork borer เบอร์ 3 ที่ปราศจากเชื้อ ไว้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ฝั่งตรงข้าม ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น บันทึกผลการทดลองโดยวัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ระหว่างโคโลนีของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 และแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการลงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา จากนั้นเลือกแหล่งอาหารที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.9 การแปรผันอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* กับการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6

นำแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture บนอาหารแข็ง PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าว (ภาคผนวก ก) โดยปมเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ทำการวางเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 7 วัน ซึ่งเจาะด้วย steel cork borer เบอร์ 3 ที่ปราศจากเชื้อ ไว้บนอาหารแข็ง PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าว ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ฝั่งตรงข้าม ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร นำไปปมที่อุณหภูมิข้างต้น เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น บันทึกรูปผลโดยวัดการเจริญของเชื้อรา และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการลงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth: PIRG) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{PIRG} = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 = ความยาวของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = ความยาวของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

2.10 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี Pour plate technique และวิธี Volatile extracellular metabolite

2.10.1. การเตรียมเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 จากข้อ 2.5.1 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าว (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปมเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเตรียมเซลล์แบคทีเรียไว้ใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถเตรียมได้จากการนำเซลล์เพาะเลี้ยง ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ด้วยชุดกรอง Millipore filter ที่ปราศจากเชื้อ และแบ่งส่วนใสเป็น 2 ส่วน ประกอบด้วยส่วนที่ 1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และส่วนที่ 2 ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.10.2. วิธี Pour plate technique

หัดเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 จากข้อ 2.11.1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ใส่ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมกับเทอาหาร PDA ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง จากนั้นวางเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 7 วัน ซึ่งเจาะด้วย steel cork borer เบอร์ 3 ที่ปราศจากเชื้อ ไว้ตรงกลางงานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการลงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนงานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น บันทึกผลโดยวัดความยาวของเส้นใยเชื้อรา และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth: PIRG)

2.10.3. วิธี Volatile extracellular metabolite

ทดสอบการสร้างสารระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite (Dennis and Webster, 1991) โดยงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 1 ประกอบด้วยอาหารแข็ง PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าว (ภาคผนวก ก) นำเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 2.11.1. หยดลงในงานเพาะเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยเชื้อให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร ส่วนงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 2 ประกอบด้วยอาหารแข็ง PDA ที่ไม่มีการลงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนงานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ไว้ตรงกลางบนงานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 1 และ 2 ปะกบกันโดยให้งานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 1 อยู่ด้านล่างและปิดด้วยพาราฟิล์ม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เพียงน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บันทึกผลโดยวัดความยาวของเส้นใยเชื้อรา และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth: PIRG)

2.11 ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*

2.11.1. การสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 จากข้อ 2.5.1. เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าว (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองแยกน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปสกัดด้วย ethyl acetate โดยใช้กรวยแยก นำชั้นของตัวทำละลายกำจัดน้ำ โดยการเติม anhydrous Na_2SO_4 แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย rotary evaporator เพื่อเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ

2.11.2. การวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 2.10.1 ละลายโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ Dichloromethane และ Ethyl Acetate เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบอย่างคร่าว ๆ ของสารสกัดหยาบ ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) ที่มี silica gel 60 F254 เป็น stationary phase นำไปแช่ใน mobile phase คือ Hexane : Acetone (1:1) โดยปริมาตร และวิเคราะห์ผลภายใต้แสงยูวี

2.11.3. การวิเคราะห์โครงสร้างของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

ซึ่งสารสกัดหยาบตามปริมาณที่เหมาะสม (ถ้าสามารถชั่งได้) ละลายด้วย CDCl_3 ปริมาตร 0.6-1 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR (300 MHz)

2.12 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยงพารา

2.12.1 ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA)

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 จากข้อ 2.11.1 นำมาวิเคราะห์การสร้าง IAA บนอาหารแข็ง PDA ที่ผสม L-tryptophan 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5

มิลลิลิตร โดยเจาะชั้นวุ้นด้วย steel cork borer เบอร์ 3 ที่ปราศจากเชื้อ และหยดเซลล์แบคทีเรียปฏิบัคษ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย Salkowski's reagent (50 ml of 35% perchloric acid and 1 ml 0.5 M FeCl₃ solution) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มต่อในที่มีด 1 ชั่วโมง หลังจากครบ 1 ชั่วโมง จะเห็น Halo Zone สีชมพู ส้ม รอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียที่สร้าง IAA (Shrivastava and Kumar, 2011)

2.12.2 ทดสอบปริมาณการผลิต IAA ของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis*

นำแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 จากข้อ 2.11.1 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่ผสม L-tryptophan 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื่อมบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Salkowski's reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เพื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA (Ghevariya and Desai, 2014)

2.12.3 ทดสอบเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* ต่อการเจริญของรากยางพาราในสภาพห้องปฏิบัติการ

1) การเตรียมกล้ายางพารา

เริ่มจากกะเทาะเปลือกแข็งและทำความสะอาดเมล็ดยางพารา โดยฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 5 ครั้ง แต่ละครั้งของการแช่เมล็ดยางพาราให้เขย่าเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นคัดเลือกเมล็ดที่มีขนาดสม่ำเสมอเพื่อใช้ในการทดสอบ

2) การเตรียมเซลล์แบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis*

นำแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 จากข้อ 2.5.1 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื่อมบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ

25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเตรียมเซลล์แขวนลอยให้ได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเท่ากับ 10^{10} CFU/ml เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3) การทดสอบเซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* ต่อการเจริญของรากยางพารา

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการกระตุ้นการงอกรากของยางพารา เริ่มจากแช่เมล็ดยางพาราในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเป็นเวลาที่เพียงพอต่อการทำให้เมล็ดยางพาราชุ่มไปด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย จากนั้นจึงนำเมล็ดยางพาราที่ผ่านการแช่มาเพาะลงในกระดาดที่ชุบน้ำซึ่งปราศจากเชื้อทันทีโดยไม่ต้องล้างทำความสะอาด จากนั้นปิดทับด้วยกระดาดที่ชุบน้ำอีกครั้ง รักษาความชื้นของกระดาดให้คงที่ โดยสังเกตการระเหยของน้ำแล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปเพิ่มเติมเพื่อให้ความชื้นอยู่ในระดับเดียวกับวันแรกของการทดลอง ส่วนการทดลองในชุดควบคุมทำโดยแช่เมล็ดยางพาราในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและอาหารเหลว PDB บันทึกผลการทดลองวันที่ 3, 7 และ 14 ของการทดลอง โดยวัดความยาวรากที่งอกออกมาโดยใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 6 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 2 PDB เพียงอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 3 PDB ร่วมกับ *B. subtilis* SM1 จากร้าข้าว 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 4 PDB ร่วมกับ *B. subtilis* LPDD3-2 จากร้าข้าว 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 5 PDB ร่วมกับ *B. subtilis* SM1 จากปลายข้าว 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 6 PDB ร่วมกับ *B. subtilis* LPDD3-2 จากปลายข้าว 3 เปอร์เซ็นต์

2.12.4 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* ต่อการเจริญของยางพาราในสภาพโรงเรือน

1) การเตรียมกล้ายางพารา

เริ่มจากกะเทาะเปลือกแข็ง และทำความสะอาดเมล็ดยางพารา และทำความสะอาดเมล็ดยางพารา โดยฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 5 ครั้ง แต่ครั้งของการแช่เมล็ดยางพาราให้เขย่าเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นคัดเลือก

เมล็ดที่มีขนาดสม่ำเสมอมาเพาะลงในกระตาดยทชชชที่ชุ่มน้ำซึ่งปราศจากเชื้อทันที จากนั้นปิดทับด้วยกระตาดยทชชชที่ชุ่มน้ำอีกครั้ง รักษาความชื้นของกระตาดยให้คงที่โดยสังเกตการระเหยของน้ำแล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปเพิ่มเติมเพื่อให้ความชื้นอยู่ในระดับเดียวกับวันแรก จนเมล็ดงอกได้อายุประมาณ 7 - 14 วัน และนำเมล็ดคยงพาราลงถุเพาะชำ เมื่อกล้ายงพารอายุประมาณ 1 เดือน ทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์และขนาดสม่ำเสมอ เพื่อใช้ในการทดสอบ

2) การเตรียมเซลล์แบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis*

นำแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 จากข้อ 2.5.1 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เสริมแหล่งคาร์บอนจากร้าข้าวและปลายข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเตรียมเซลล์แขวนลอยให้ได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเท่ากับ 10^{10} CFU/ml เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3) การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ต่อการเจริญของยงพารา

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อกระถาง ราวบริเวณรอบโคนต้น เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมบันทึกผลโดยการวัดความสูง ความยาวราก จำนวนใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง เป็นเวลา 1, 2 และ 3 เดือน หลังการเติมเชื้อแบคทีเรียปฏิบัคษ์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 5 กรรมวิธี ๆ ละ 6 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่เติม *B. subtilis*)

กรรมวิธีที่ 2 เติม *B. subtilis* SM1 เลี้ยงร่วมกับร้าข้าว 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 3 เติม *B. subtilis* LPDD3-2 เลี้ยงร่วมกับร้าข้าว 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 4 เติม *B. subtilis* SM1 เลี้ยงร่วมกับปลายข้าว 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 5 เติม *B. subtilis* LPDD3-2 เลี้ยงร่วมกับปลายข้าว 3 เปอร์เซ็นต์

3. การวิเคราะห์สถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลของแหล่งอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*

3.1.1. ผลของแหล่งคาร์บอน

การเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าว (1 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และปลายข้าว (3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) สามารถเจริญได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบว่าปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 12.00-12.20 log CFU/ml โดยเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงบนแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถนับปริมาณการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้สูงสุด เท่ากับ 12.20 log CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 2A)

3.1.2. ผลของแหล่งไนโตรเจน

การเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรต สามารถเจริญได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบว่า ปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 11.15-11.40 log CFU/ml โดยเฉพาะแหล่งอาหารเสริมไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร สามารถนับปริมาณการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุด 11.35 log CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 2B)

3.1.3. ผลของแหล่งฟอสฟอรัส

การเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตและไดโพแทสเซียมฟอสเฟตสามารถเจริญได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบว่า ปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 11.15-11.40 log CFU/ml โดยเฉพาะ

แหล่งอาหารเสริมฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร สามารถนับปริมาณการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุด 11.40 log CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 2C)

3.1.4. ผลของแหล่งโพแทสเซียม

การเจริญของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรตและโพแทสเซียมซัลเฟต สามารถเจริญได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบว่า ปริมาณของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 11.00-11.40 log CFU/ml โดยเฉพาะแหล่งอาหารเสริมโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร สามารถนับปริมาณการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุด 11.36 log CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 2D)

3.2 ผลของแหล่งอาหารต่อการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

3.2.1. ผลของแหล่งคาร์บอน

การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าว (1 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และปลายข้าว (3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญบนแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น สามารถเจริญได้ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ขณะที่การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น สามารถวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 4.30 และ 3.66 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 3A) เมื่อศึกษาด้วยตาเปล่าลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 พบว่าเส้นใยเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่ออยู่บนอาหาร PDA ที่เสริมแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น โดยเส้นใยมีลักษณะฟู หนา และอัดตัวแน่น ขณะที่การเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหาร PDA ที่เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวมีลักษณะบางลง และการเจริญเติบโตช้า (ภาพที่ 4A) และนำเส้นใย

เชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา มีความผิดปกติ เส้นใยมีลักษณะเล็ก และบิดเบี้ยว เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีลักษณะปลายเส้นใยมน เจริญงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 5A)

3.2.2. ผลของแหล่งไนโตรเจน

การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งไนโตรเจน จากแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรดที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1, 2 และ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนแหล่งไนโตรเจนจาก แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรดมีแนวโน้มเจริญลดลง โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจนจาก แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรดที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่งผลให้เส้นใย เจริญได้น้อยที่สุด เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญได้ 1.60 และ 1.90 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 3B) เมื่อศึกษาด้วยตาเปล่า ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งไนโตรเจนจาก แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรดทุกระดับความเข้มข้น เส้นใยมีลักษณะฟูฟ่อง บางลง และ การเจริญเติบโตช้า (ภาพที่ 4B) และเมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา มีความผิดปกติ เส้นใยมีลักษณะเล็ก สั้นหยาบ และบิดเบี้ยว เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีลักษณะปลายเส้นใยมน เจริญงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 5B)

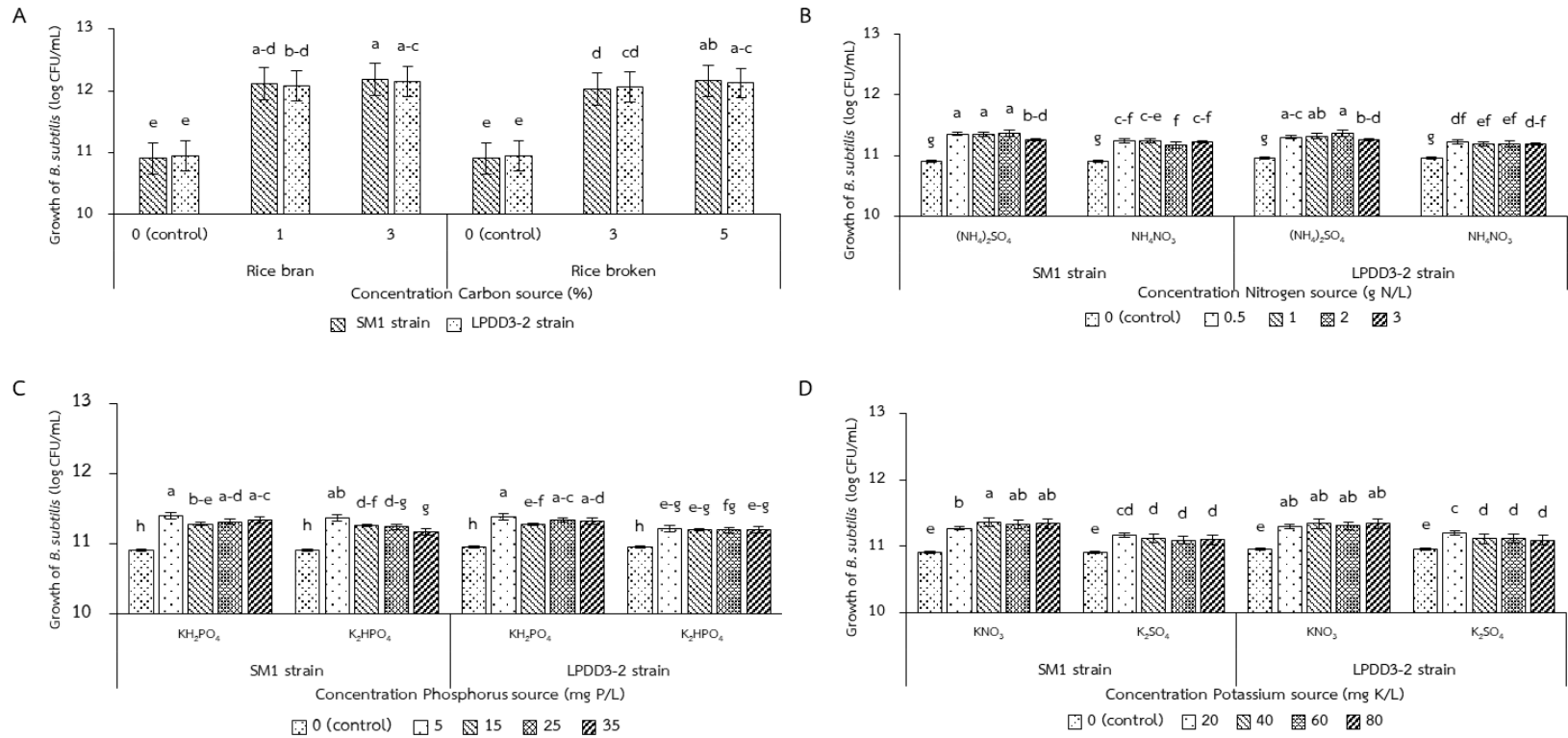
3.2.3. ผลของแหล่งฟอสฟอรัส

การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่ง ฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตและไดโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุด ควบคุม), 5, 15, 25 และ 35 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร พบว่าการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนแหล่งฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตและไดโพแทสเซียมฟอสเฟตมีแนวโน้ม เจริญลดลง โดยเฉพาะแหล่งฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ทำให้เส้นใยมีแนวโน้มเจริญได้น้อยที่สุด เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญได้ 5.50 และ 5.60 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 3C) จากการศึกษาด้วยตาเปล่าลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สาย พันธุ์ NK6 พบว่าเส้นใยมีลักษณะบางลง และการเจริญของเส้นใยลดลงตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น

ของแหล่งฟอสฟอรัสทุกชนิด (ภาพที่ 4C) เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรามีความผิดปกติ เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยว เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีลักษณะปลายเส้นใยมน เจริญงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 5C)

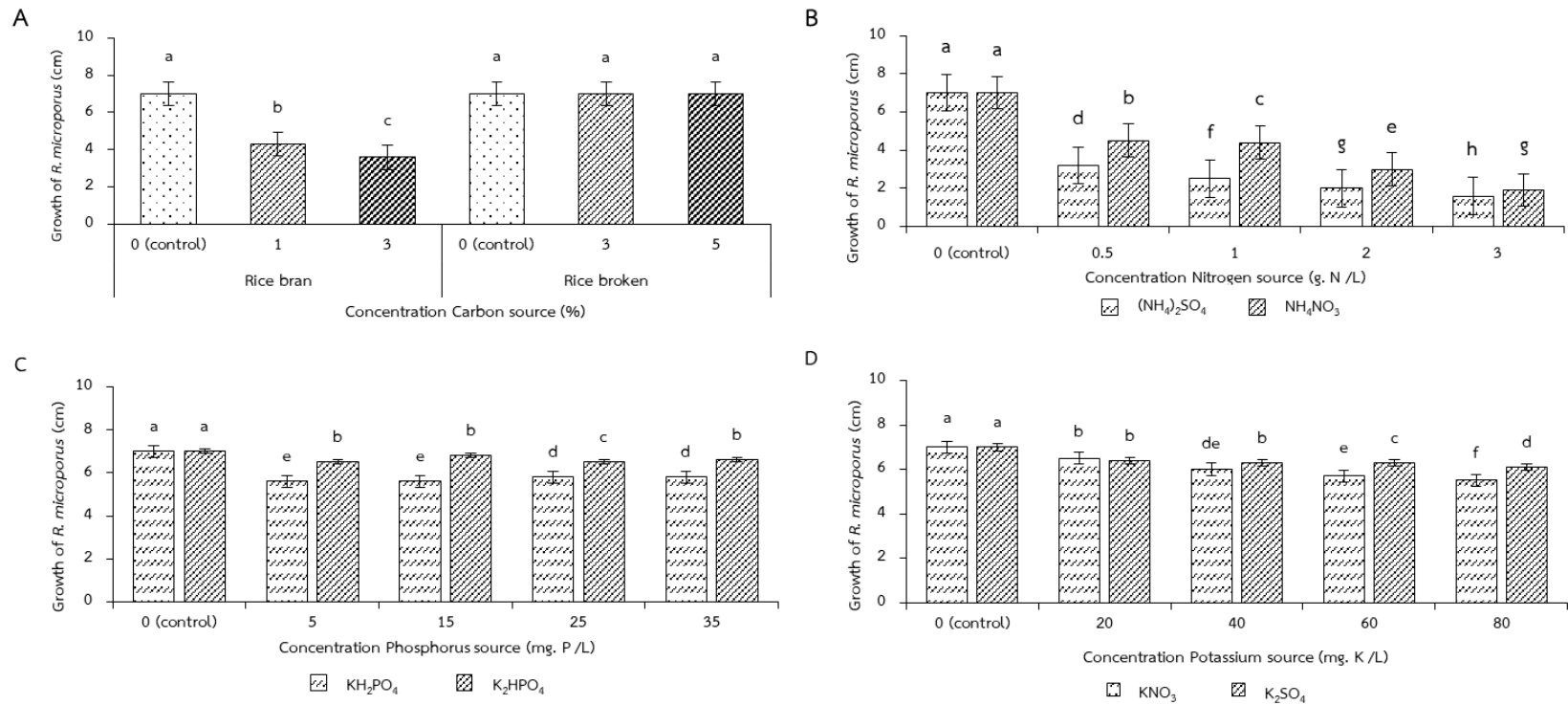
3.2.4. ผลของแหล่งโพแทสเซียม

การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA ที่เสริมแหล่งโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรตและโพแทสเซียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร พบว่าการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนแหล่งโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรตและโพแทสเซียมซัลเฟตมีแนวโน้มลดลง โดยเฉพาะแหล่งโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรตและโพแทสเซียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร พบว่าเส้นใยมีแนวโน้มการเจริญได้น้อยที่สุด เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญได้ 5.50 และ 6.10 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 3D) เมื่อศึกษาด้วยตาเปล่าลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 พบว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อรามีแนวโน้มลดลง โดยเส้นใยเชื้อรามีลักษณะบางลง และการเจริญลดลงตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นของแหล่งโพแทสเซียมทุกชนิด (ภาพที่ 4D) เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรามีความผิดปกติ เส้นใยมีลักษณะบิดงอ และลีบแบน เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีลักษณะปลายเส้นใยมน เจริญงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 5D)



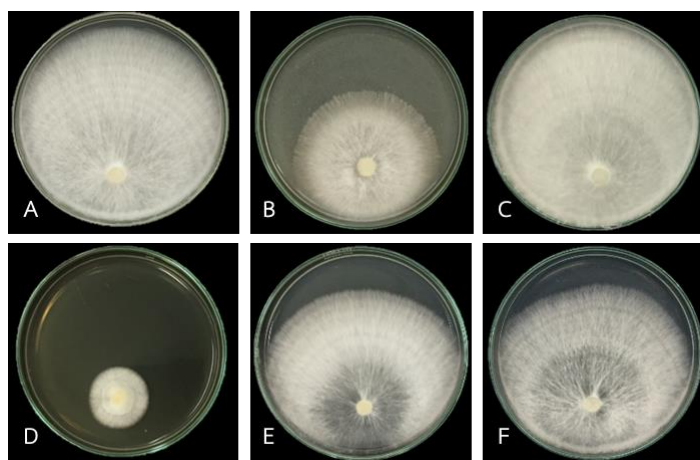
ภาพที่ 2 การเจริญของแบคทีเรียปฏิบัิย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริม A) แหล่งคาร์บอน, B) แหล่งไนโตรเจน, C) แหล่งฟอสฟอรัส และ D) แหล่งโพแทสเซียม

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

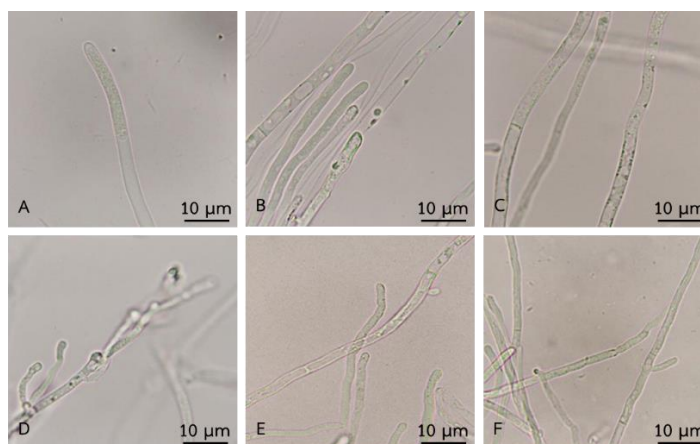


ภาพที่ 3 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหารเสริม A) แหล่งคาร์บอน, B) แหล่งไนโตรเจน, C) แหล่งฟอสฟอรัส และ D) แหล่งโพแทสเซียม

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 4 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งอาหารต่างชนิด ที่อายุ 7 วัน A) ชุดควบคุม, B) เสริมรำข้าว 3 เปอร์เซ็นต์, C) เสริมปลายข้าว 3 เปอร์เซ็นต์, D) เสริมไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร, E) เสริมฟอสฟอรัสจากไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 35 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และ F) เสริมโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรต 80 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร



ภาพที่ 5 ลักษณะทางจุลทรรศน์วิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เพิ่มแหล่งอาหารต่างชนิด ที่อายุ 7 วัน ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาจากกล้องขยาย 100 เท่า A) ชุดควบคุม, B) รำข้าว 3 เปอร์เซ็นต์, C) ปลายข้าว 3 เปอร์เซ็นต์, D) ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร, E) ฟอสฟอรัสจากไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 35 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร, F) โพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรต 80 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร

3.3 ผลของแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate

3.3.1. ผลของแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าว (1 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และปลายข้าว (3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดี เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวทุกระดับความเข้มข้น สามารถสร้างบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้กว้างที่สุด คือ 27.25 และ 26 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่เลี้ยงร่วมกับอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 23.50-25.00 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 6A)

3.3.2. ผลของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA เสริมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรตและแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดี โดยสร้างบริเวณยับยั้งได้ในช่วง 16.25-34 มิลลิเมตร โดยเฉพาะการเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับแหล่งอาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร สามารถสร้างบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้กว้างที่สุด คือ 34 และ 32.75 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่เลี้ยงร่วมกับแหล่งอาหารที่เสริมแอมโมเนียมไนเตรต สามารถวัดความกว้างบริเวณการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

สายพันธุ์ NK6 ได้ 29 และ 29.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 6B)

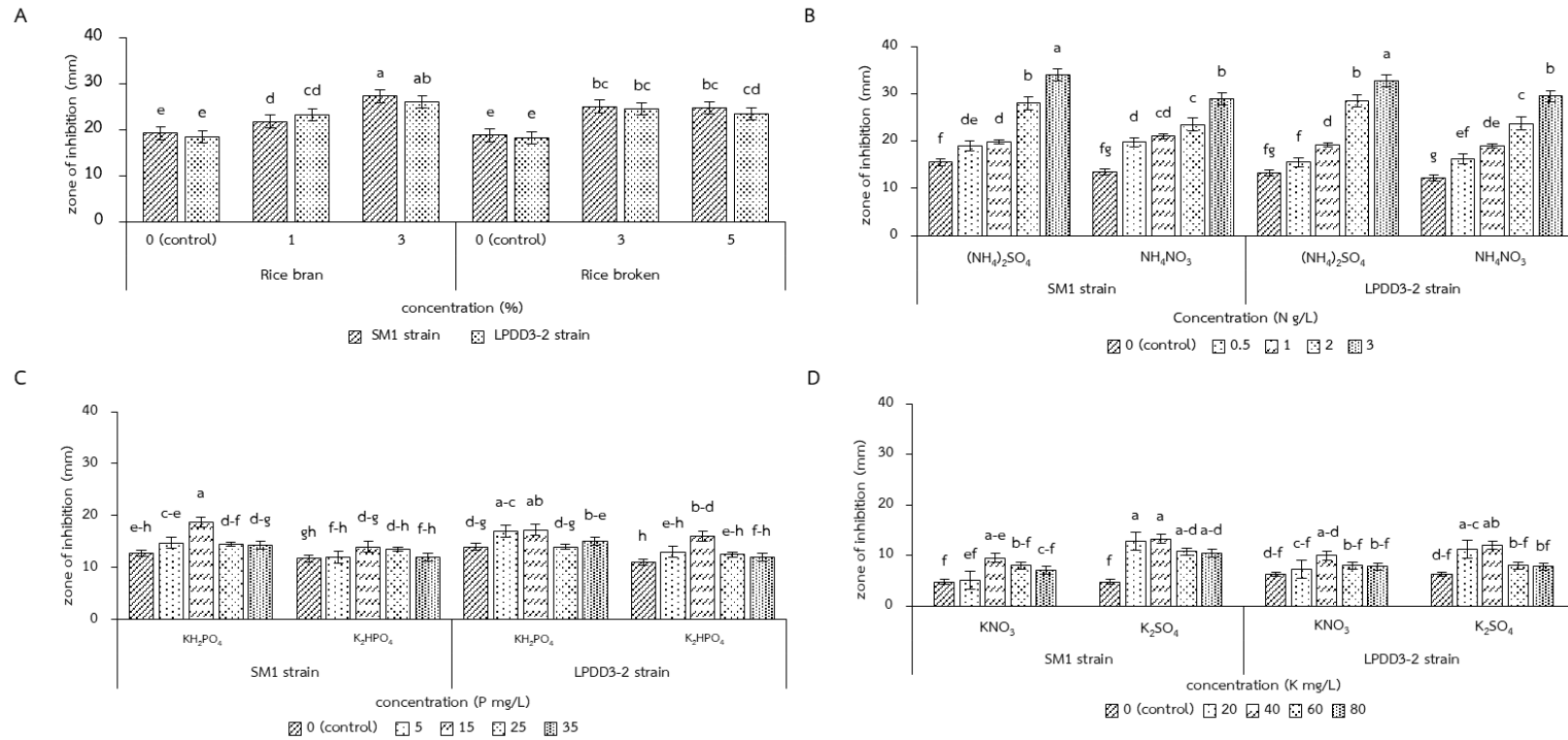
3.3.3. ผลของแหล่งฟอสฟอรัส

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA เสริมแหล่งฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตและไดโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 15, 25 และ 35 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ โดยสร้างบริเวณยับยั้งได้อยู่ในช่วง 12.00-18.75 มิลลิเมตร โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สายพันธุ์ LPDD3-2 ร่วมกับแหล่งอาหารที่เสริมจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 5 และ 15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร สามารถสร้างบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้กว้างที่สุด คือ 18.75, 17.00 และ 17.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่เลี้ยงร่วมกับแหล่งอาหารเสริมไดโพแทสเซียมฟอสเฟต สามารถสร้างบริเวณการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ในช่วง 12-16 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 6C)

3.3.4. ผลของแหล่งโพแทสเซียม

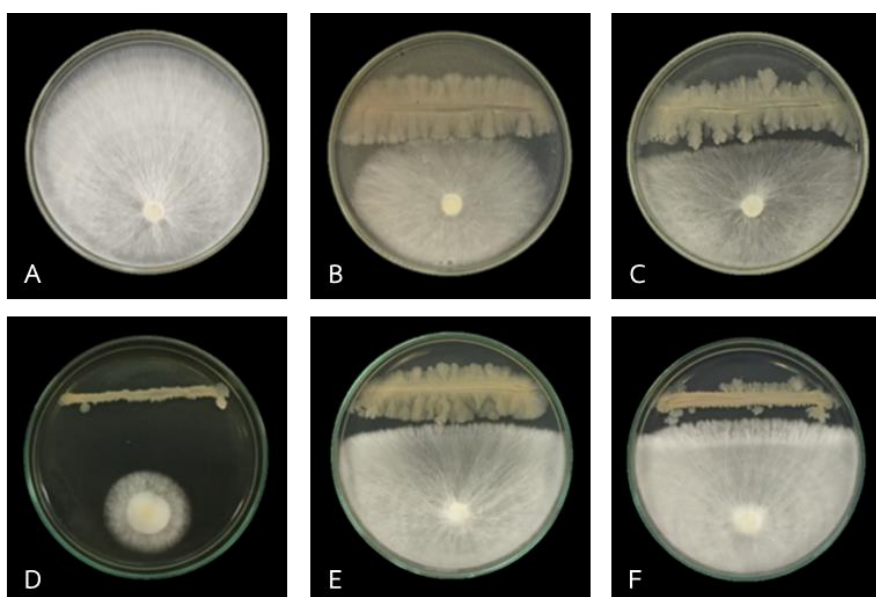
เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA เสริมแหล่งโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรตและโพแทสเซียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ โดยสร้างบริเวณยับยั้งได้อยู่ในช่วง 5.00-13.25 มิลลิเมตร โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ร่วมกับแหล่งอาหารที่เสริมจากโพแทสเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร สามารถสร้างบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้กว้างที่สุด คือ 12.75 และ 13.25

มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่เลี้ยงร่วมกับแหล่งอาหารเสริมโพแทสเซียมไนเตรต สามารถสร้างบริเวณการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ในช่วง 5.00-10.00 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 6D)

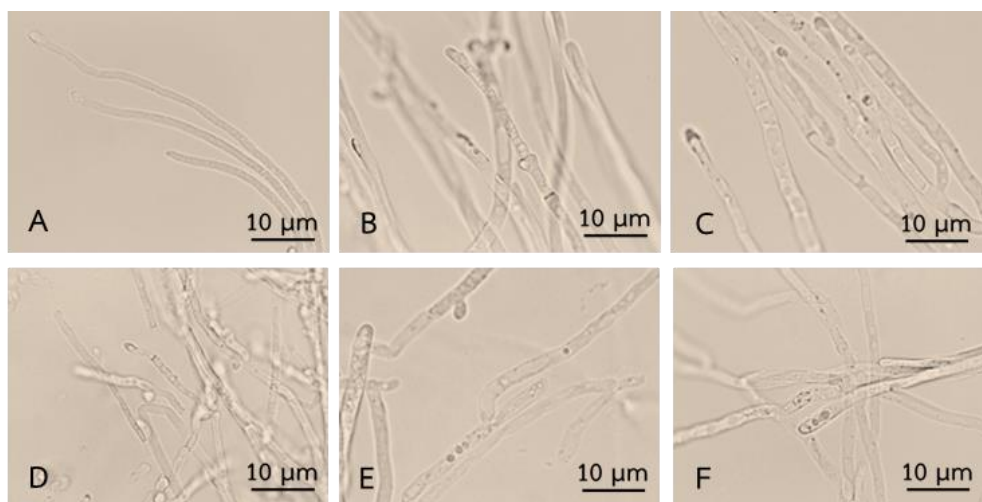


ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหารเสริม A) แหล่งคาร์บอน, B) แหล่งไนโตรเจน, C) แหล่งฟอสฟอรัส และ D) แหล่งโพแทสเซียม ด้วยวิธี dual culture
 หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

เมื่อนำเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่บริเวณแนวยับยังมีการเปลี่ยนแปลงได้หลายลักษณะ โดยพบเป็นเส้นใยที่สับสน มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยในชุดควบคุม หรือมีองค์ประกอบภายในเส้นใยลดน้อยลง ขนาดของเส้นใยไม่สม่ำเสมอ การเจริญเส้นใยบดงอผิดรูป สั้นหยิก และบริเวณปลายเส้นใยโป่งพอง ขณะที่เส้นใยของชุดควบคุมมีลักษณะปลายเส้นใยมน เจริญงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 7 และ 8)



ภาพที่ 7 ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่ทดสอบร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* บนแหล่งอาหารต่างชนิด ที่อายุ 7 วัน A) เชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6, B) *B. subtilis* (SM1) + Rice Bran 3%, C) *B. subtilis* (SM1) + Broken Rice 3%, D) *B. subtilis* (SM1) + ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร, E) *B. subtilis* (SM1) + ฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต 15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และ F) *B. subtilis* (SM1) + โพแทสเซียมจากโพแทสเซียมซัลเฟต 40 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร

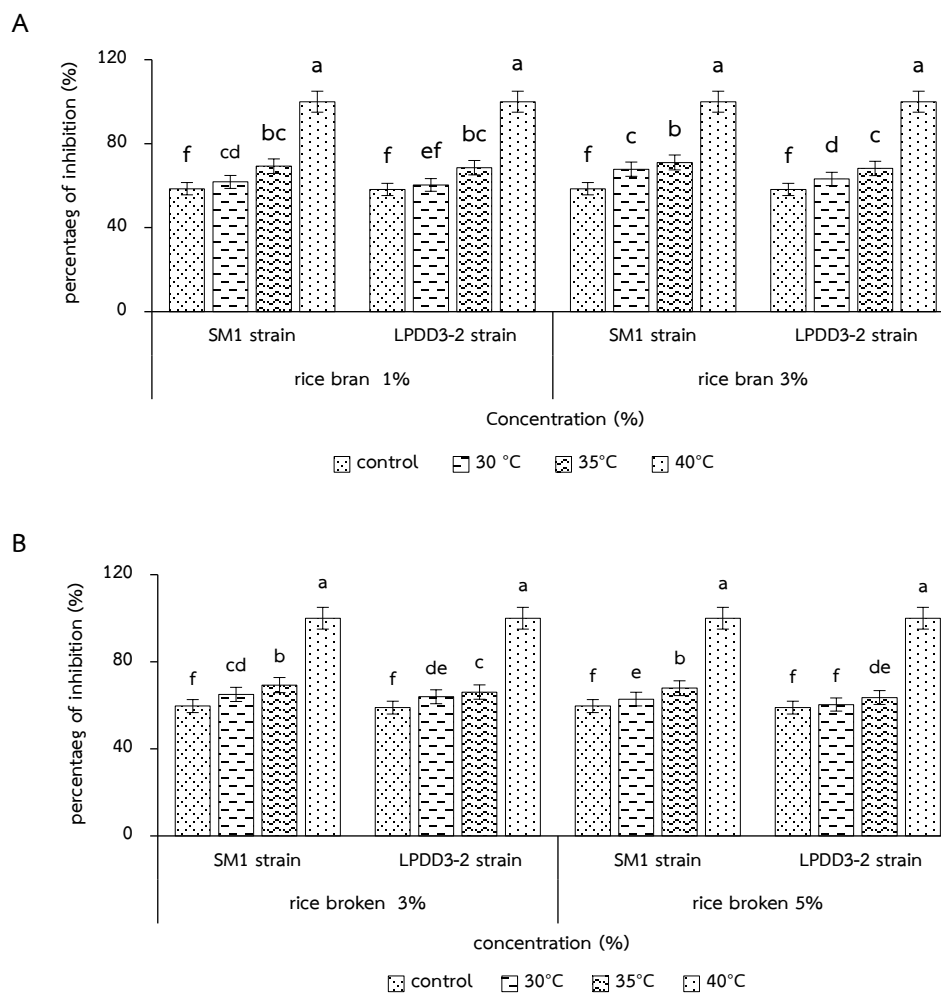


ภาพที่ 8 ลักษณะทางจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA ที่เพิ่มแหล่งต่างชนิดกัน ที่อายุ 7 วัน ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดากาลังขยาย 100 เท่า A) เชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6, B) *B. subtilis* (SM1) + Rice Bran 3%, C) *B. subtilis* (SM1) + Broken Rice 3%, D) *B. subtilis* (SM1) + ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร, E) *B. subtilis* (SM1) + ฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต 15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และ F) *B. subtilis* (SM1) + โพแทสเซียมจากโพแทสเซียมซัลเฟต 40 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร

3.4 ผลการแปรผันอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* ร่วมกับการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

การแปรผันอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 เพื่อให้ผลผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าว (1 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และปลายข้าว (3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) โดยมีการแปรผันอุณหภูมิต่อการบ่มที่ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 71.07 และ 69.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมา คือ อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใย

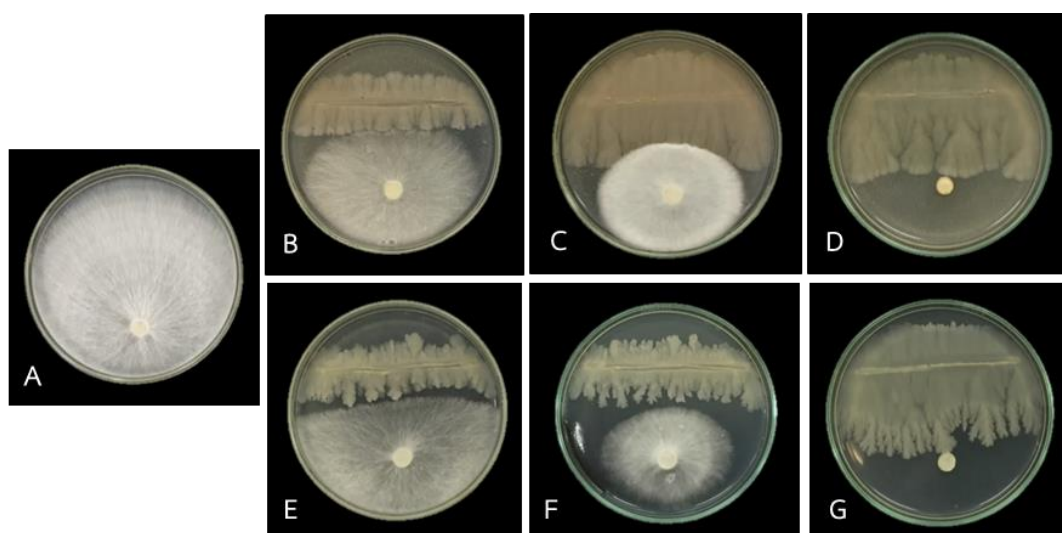
เชื้อราได้อยู่ในช่วง 60-67 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถวัดการยับยั้งได้ เนื่องจากเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การแปรผันอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* ร่วมกับการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* บนอาหารเสริม A) แหล่งคาร์บอนจากรำข้าว และ B) แหล่งคาร์บอนจากปลายข้าว

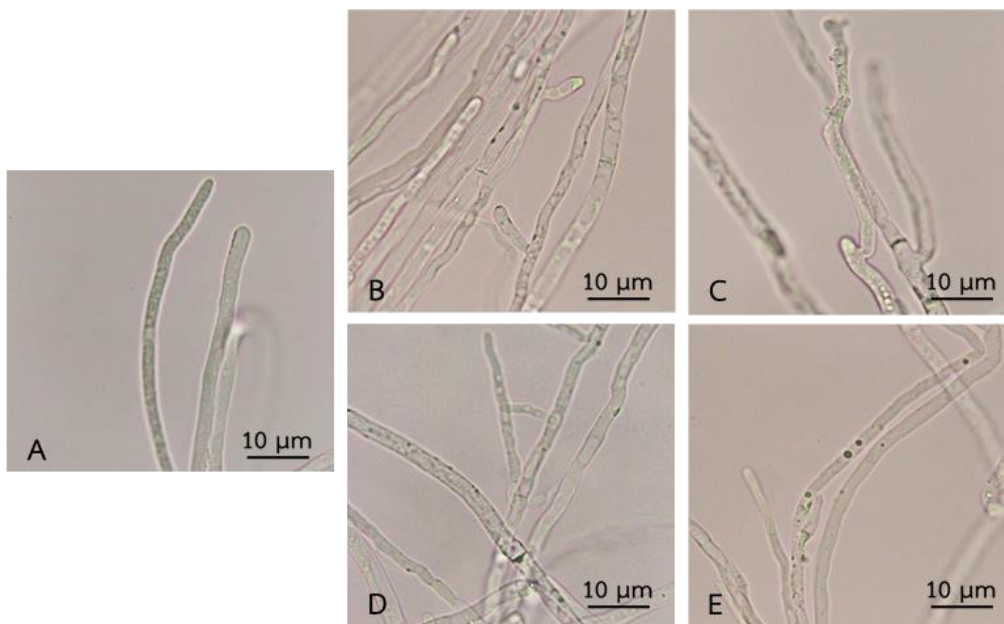
หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยตาเปล่าจะเห็นได้ว่าเส้นใยเชื้อราสามารถเจริญได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเจริญลดลงที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยเส้นใยเชื้อราค่อนข้างหนาบาง เส้นใยบางและการเจริญไม่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 10B 10C 10E และ 10F) ขณะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ (ภาพที่ 10D และ 10G) เมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 10A) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บริเวณแนวยับยั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเส้นใยเชื้อรามีการเจริญบิดเบี้ยวผิดปกติ มีลักษณะโค้งงอ สิบแบนและขนาดเล็กกว่าเส้นใยในชุดควบคุม หรือมีองค์ประกอบภายในเส้นใยลดน้อยลง อีกทั้งเส้นใยยังมีการแตกแขนง ขณะที่เส้นใยของชุดควบคุมมีลักษณะปลายเส้นใยมนเจริญงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ทดสอบร่วมกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 7 วัน A) Control, B) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Rice Bran 3% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, C) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Rice Bran 3% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, D) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Rice Bran 3% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส, E) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, F) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3% ที่อุณหภูมิ

35 องศาเซลเซียส และ G) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

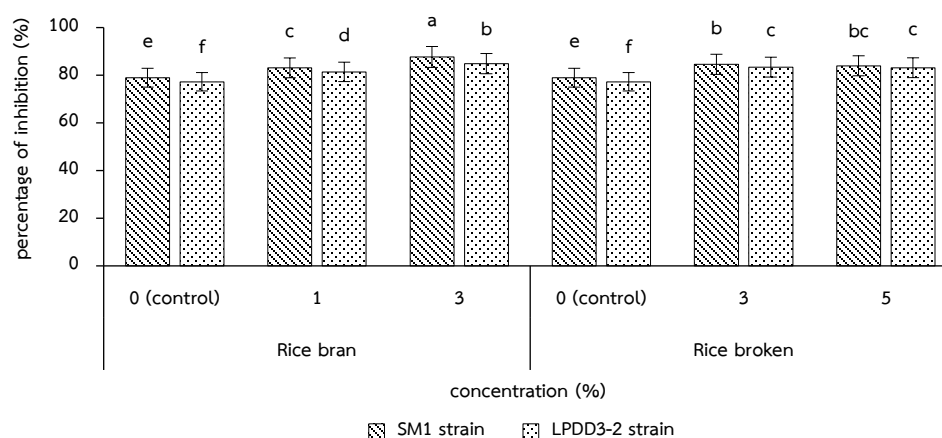


ภาพที่ 11 ลักษณะทางจุลทรรศน์วิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 7 วัน ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 100 เท่า A) Control, B) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Rice Bran 3% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, C) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Rice Bran 3% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, D) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ E) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี pour plate

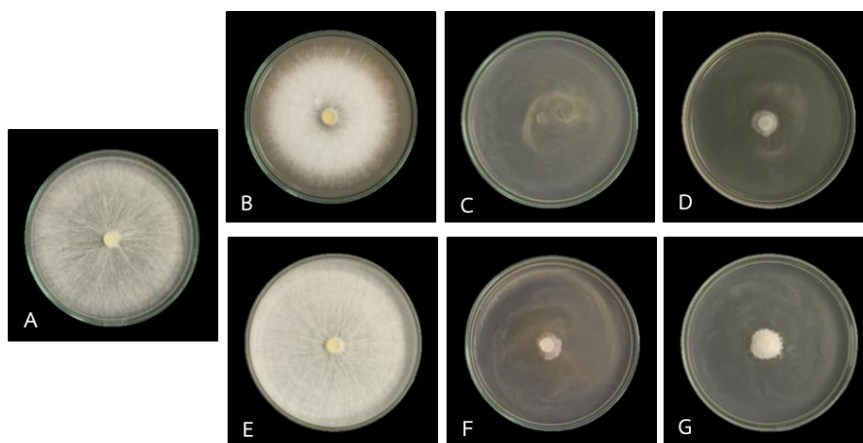
ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าว สามารถผลิตสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ร่วมกับแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 3

เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดีที่สุด เท่ากับ 87.67 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่แบคทีเรียปฏิชีวนะทดสอบร่วมกับแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าว สามารถวัดการยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ 84.57 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 12) เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยตาเปล่า พบว่าเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบบนแหล่งอาหารเสริมรำข้าวร่วมกับเซลล์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 มีลักษณะเส้นใยบางและการเจริญไม่สม่ำเสมอ เมื่อเปรียบเทียบกับทดสอบร่วมกับแหล่งอาหารเสริมปลายข้าว ที่ทำให้เส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่น (ภาพที่ 13) และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรามีความผิดปกติ ปลายเส้นใยโป่งพอง บิดเบี้ยว และกุดตัวลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีลักษณะปลายเส้นใยมน เจริญงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 14)

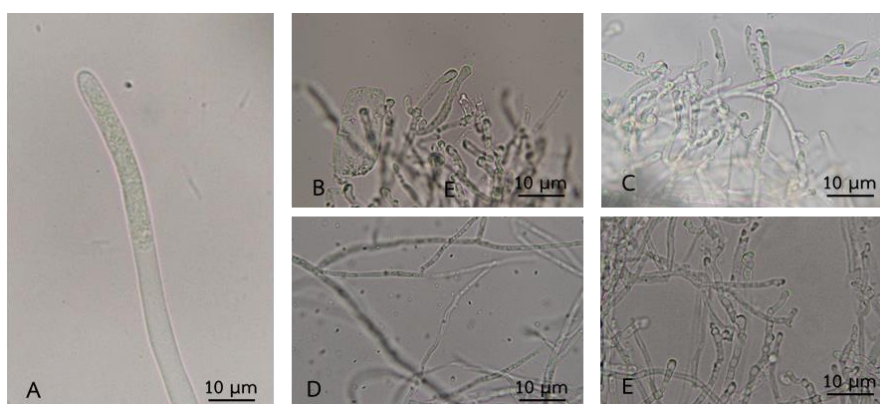


ภาพที่ 12 ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน (รำข้าวและปลายข้าว) ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี pour plate

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 13 ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน (รำข้าวและปลายข้าว) ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี pour plate A) Control, B) *R. microporus* + Rice Bran 3%, C) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Rice Bran 3%, D) *B. subtilis* (LPDD3-2) + *R. microporus* + Rice Bran 3%, E) *R. microporus* + Broken Rice 3%, F) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3% และ G) *B. subtilis* (LPDD3-2) + *R. microporus* + Broken Rice 3%



ภาพที่ 14 ลักษณะทางจุลทรรศน์วิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน (รำข้าวและปลายข้าว) ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี pour plate A) Control, B) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Rice Bran 3%, C) *B. subtilis* (LPDD3-2) + *R. microporus* + Rice Bran 3%, D) *R. microporus* + Broken Rice 3%, E) *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3%

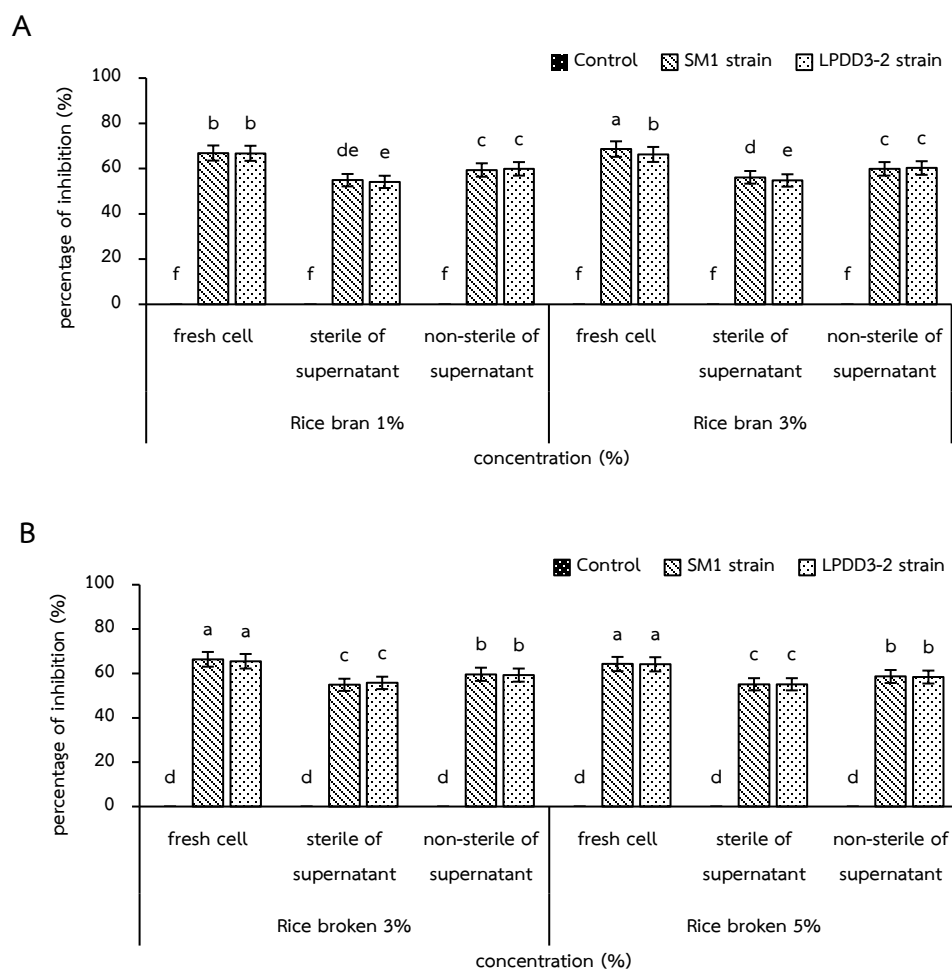
B. subtilis (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3% และ E) *B. subtilis* (LPDD3-2) + *R. microporus* + Broken Rice 3%

3.6 ประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite

ประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และเสริมแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าวที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารระเหยจากเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่นิ่งและไม่นิ่งฆ่าเชื้อของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถผลิตสารระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดี แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าวิธี pour plate โดยสารระเหยจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 เลี้ยงร่วมกับแหล่งอาหารเสริมรำข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้สูงสุด เท่ากับ 68.63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ขณะที่สารระเหยจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 เลี้ยงร่วมกับแหล่งอาหารเสริมรำข้าวทุกระดับความเข้มข้น แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 66.25 และ 66.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารปฏิปักษ์ที่นิ่งฆ่าเชื้อจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้น้อยที่สุด อยู่ในช่วง 54.13-60.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 15A)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารระเหยบนแหล่งอาหารเสริมปลายข้าว พบว่าสารระเหยจากเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถผลิตสารระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดี โดยสารระเหยจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้สูงสุด คือ 66.38, 66.75, 64.25 และ 64.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สารปฏิปักษ์ที่นิ่งฆ่าเชื้อจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้น้อยที่สุด อยู่ในช่วง 54.88-55.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 15B) เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R.*

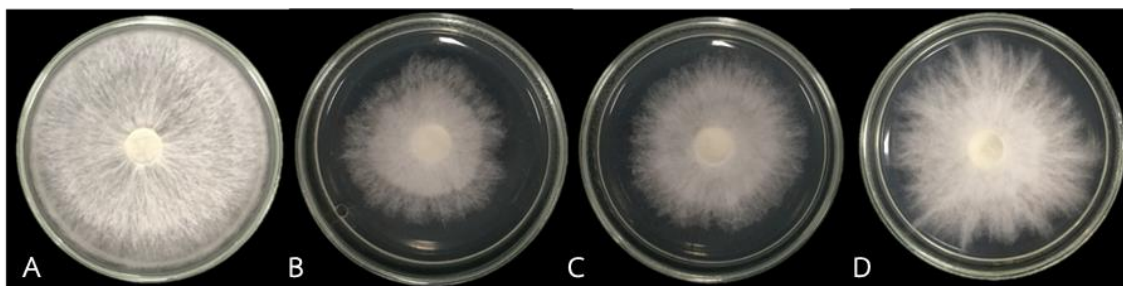
microporus สายพันธุ์ NK6 ด้วยตาเปล่า พบว่าประสิทธิภาพสารระเหยของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีผลทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะบางปลายเส้นใยอัดตัวกันแน่น ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 16 และ 17) เมื่อนำเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์และสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่า เส้นใยที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองสายพันธุ์ มีลักษณะบิดเบี้ยว และกุดตัวลงในขณะที่เส้นใยที่เลี้ยงร่วมกับสารปฏิปักษ์ไม่เน่าเชื้อของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ปลายเส้นใยมีลักษณะโป่งพอง และมีลักษณะกุดตัวลงเล็กน้อย (ภาพที่ 18)



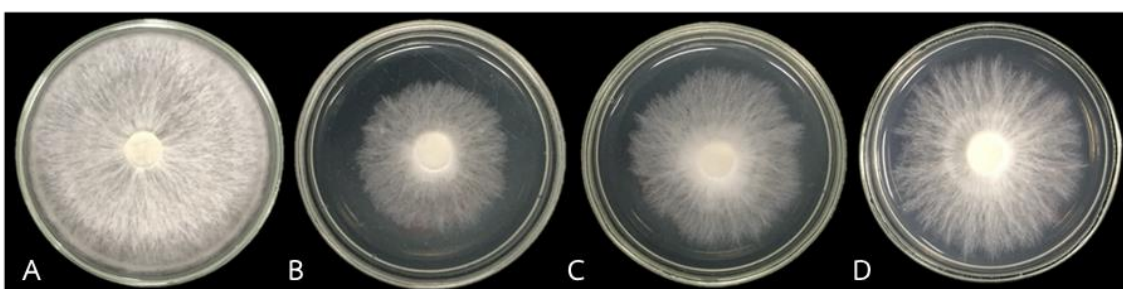
ภาพที่ 15 ประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหารเสริมแหล่งคาร์บอน (รำ

ข้าวและปลายข้าว) ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite A) แหล่งคาร์บอนจากรำข้าว และ B) แหล่งคาร์บอนจากปลายข้าว

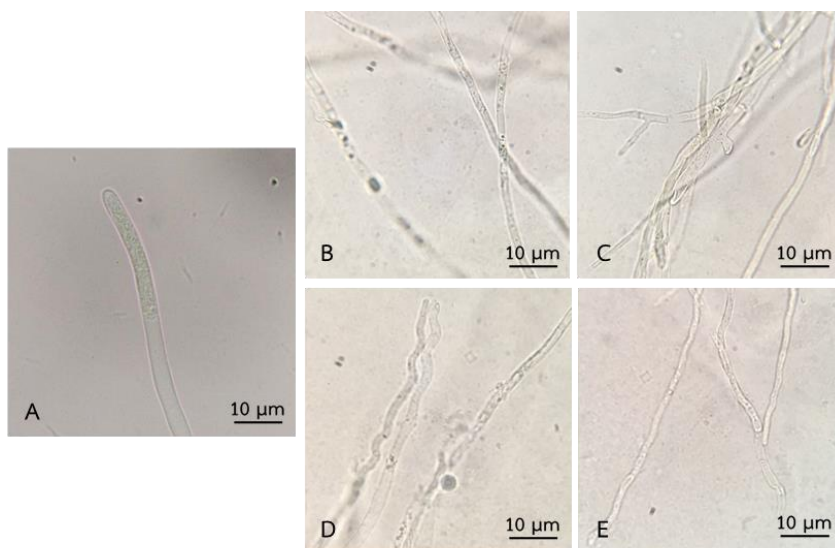
หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 16 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 เลี้ยงร่วมกับสารระเหยจากเซลล์ สารปฏิชีวนะที่หนึ่งและไม่มีของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite A) Control, B) fresh cell + *R. microporus* + Rice Bran 3%, C) non-sterile of supernatant + *R. microporus* + Rice Bran 3% และ D) sterile of supernatant + *R. microporus* + Rice Bran 3%



ภาพที่ 17 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 เลี้ยงร่วมกับสารระเหยจากเซลล์ สารปฏิชีวนะที่หนึ่งและไม่มีของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite A) Control, B) fresh cell + *R. microporus* + Broken Rice 3%, C) non-sterile of supernatant + *R. microporus* + Broken Rice 3% และ D) sterile of supernatant + *R. microporus* + Broken Rice 3%



ภาพที่ 18 ลักษณะทางจุลทรรศน์วิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงร่วมกับ สารระเหยจากเซลล์แบคทีเรียปฏิบัณช์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหาร เสริมแหล่งคาร์บอน (รำข้าวและปลายข้าว) ที่อายุ 7 วัน ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite A) ชุดควบคุม, B) fresh cell (SM1) + *R. microporus* + Rice Bran 3%, C) fresh cell (LPDD3-2) + *R. microporus* + Rice Bran 3%, D) fresh cell (SM1) + *R. microporus* + Broken Rice 3% และ E) fresh cell (LPDD3-2) + *R. microporus* + Broken Rice 3%

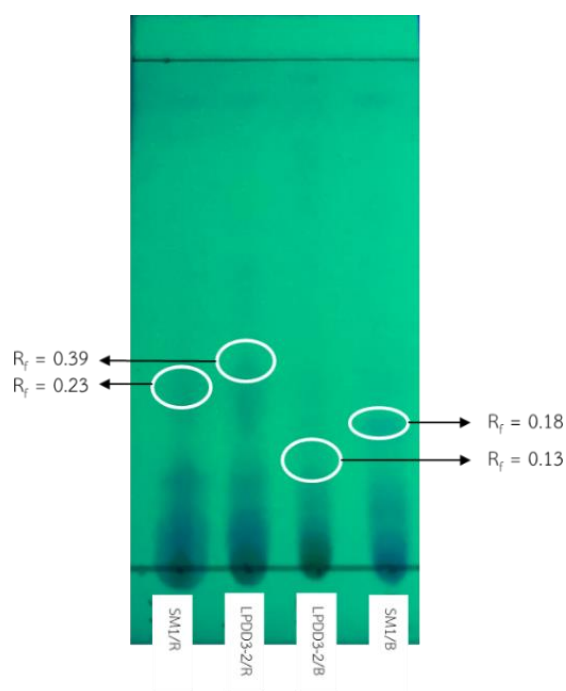
3.7 องค์ประกอบบางส่วนของสารสกัดจากแบคทีเรียปฏิบัณช์ *Bacillus subtilis*

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ Dichloromethane และ Ethyl acetate นั้น มาแยกองค์ประกอบด้วยวิธี TLC ที่มี silica gel 60 F254 เป็น stationary phase นำไปแช่ใน mobile phase คือ Hexane : Acetone (3:2) โดยปริมาตร พบว่า สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่ สกัดด้วย Dichloromethane สามารถแยกสารสกัดหยาบออกได้มากที่สุด โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.13, 0.18, 0.23 และ 0.39 เซนติเมตร (ภาพที่ 19) และจากการสกัดสารสำคัญพบว่าน้ำหนักของสารสกัดน้ำ เลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 503.6, 457.5, 392.9 และ 244 มิลลิกรัม/ ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สำหรับการวิเคราะห์ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณของโปรตอน

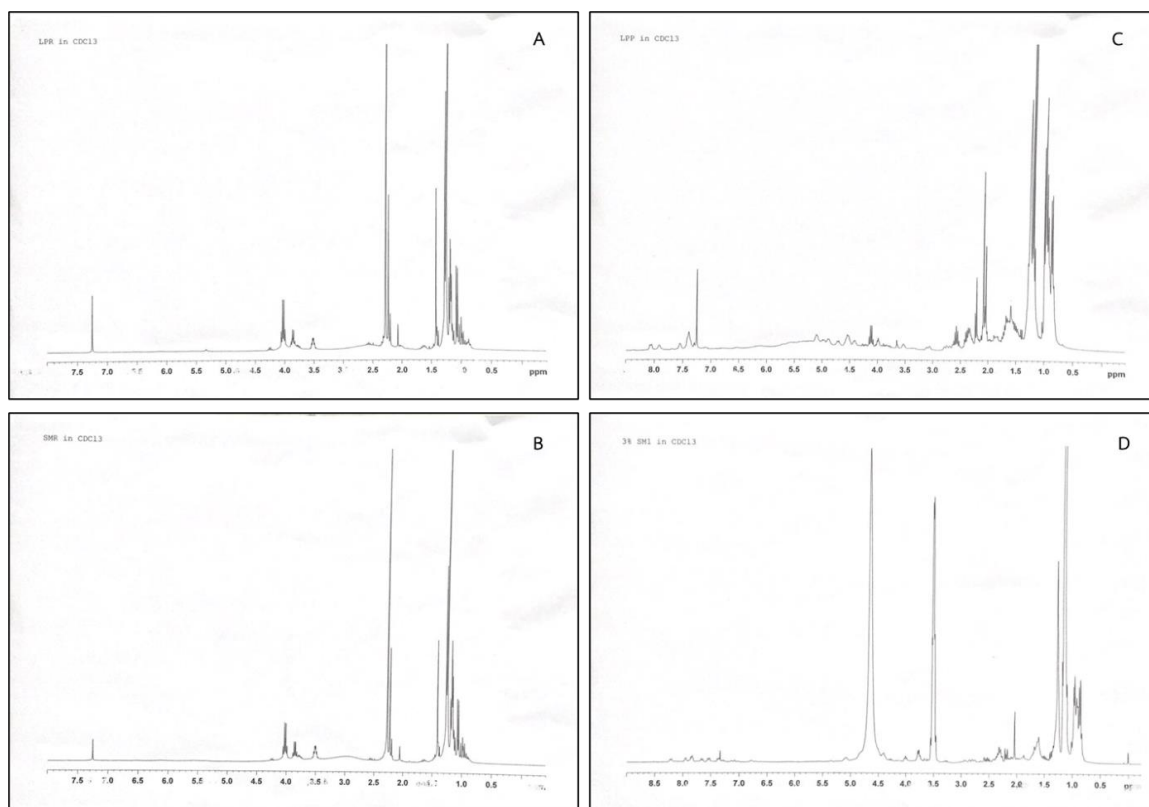
โอลิฟินิกและโปรตอนอะลิฟาติก ที่ได้จากสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งอาหารเสริมรำข้าว 3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากแหล่งอาหารเสริมปลายข้าว 3 เปอร์เซ็นต์ พบสัญญาณของโปรตอนอะโรมาติกและโปรตอนโอลิฟินิก (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 1 ผลการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

Treatment	Food source	Extract weight (mg/L)	
		SM1	LPDD3-2
Dichloromethane	Rice Bran 3%	457.5	503.6
	Broken Rice 3%	244.0	392.9
Ethyl acetate	Rice Bran 3%	164.9	175.5
	Broken Rice 3%	167.8	215.9



ภาพที่ 19 การวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC จากการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*



ภาพที่ 20 กราฟแสดงสเปกตรัม NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*

3.8 ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา

3.8.1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผลิต IAA

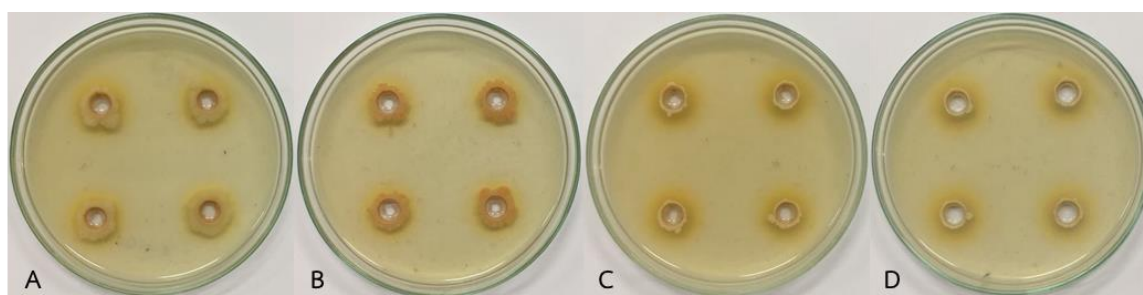
ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารคาร์บอนเสริมรำข้าวที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และเสริมปลายข้าวที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบบนอาหารแข็ง PDA ที่เติม L-tryptophan 50 ต่อมิลลิกรัม พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถสร้าง Halo Zone รอบ ๆ โคลนีส แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถสังเคราะห์ปริมาณ IAA ได้อย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 21) เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่สามารถผลิต IAA ได้ เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่เติม L-

tryptophan 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถสังเคราะห์ปริมาณ IAA ได้อยู่ในช่วง 155–280 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมรำข้าวและปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถสังเคราะห์ปริมาณ IAA ได้สูงสุด เท่ากับ 276.857 และ 263.659 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมปลายข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถสังเคราะห์ปริมาณ IAA ได้น้อยสุด คือ 157.912 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณ IAA ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*

Treatment	IAA ($\mu\text{g/ml}$)	
	Rice Bran 3%	Broken Rice 3%
<i>B. subtilis</i> SM1	169.50 \pm 0.65c	158.02 \pm 0.67d
<i>B. subtilis</i> LPDD3-2	277.04 \pm 2.16a	263.84 \pm 0.38b

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 21 ลักษณะ Halo Zone ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่สามารถผลิต IAA บนอาหารแข็ง PDA ที่เติม L-tryptophan 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร A) *B. subtilis* (SM1) + Rice Bran 3%, B) *B. subtilis* (LPDD3-2) + Rice Bran 3%, C) *B. subtilis* (SM1) + Broken Rice 3% และ D) *B. subtilis* (LPDD3-2) + Broken Rice 3%

3.8.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัักษณ์ *B. subtilis* ต่อการเจริญของกล้ายางพาราในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบการงอกของยางพารา โดยการแช่เมล็ดยางพาราในเซลล์แบคทีเรียปฏิบัักษณ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมการงอกของยางพาราได้ดี พบว่าการเจริญของรากยางพาราที่อายุ 3, 7 และ 14 วัน ปริมาณรากฝอยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกกรรมวิธีทดลอง และรากแก้วมีความยาวเพิ่มขึ้นได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 22) โดยเมื่อแช่เมล็ดยางพาราในเซลล์แบคทีเรียปฏิบัักษณ์ทั้งสองสายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าว รากของยางพาราสามารถเจริญได้ดีที่สุด สามารถวัดความยาวของรากได้ 1.95, 2.43 และ 4.72 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมา คือ การใช้แบคทีเรียปฏิบัักษณ์ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าว สามารถวัดความยาวรากแก้วได้ 0.35 - 3.40 เซนติเมตร และรากแก้วเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อแช่เมล็ดยางพาราในแหล่งอาหารเหลว (PDB) และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ มีความยาวรากเพียง 0.18 - 2.60 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 22 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัักษณ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ต่อการเจริญของรากยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 14 วัน A) Control, B) PDB, C) *B. subtilis* (SM1) + Broken Rice 3%, D) *B. subtilis* (LPDD3-2) + Broken Rice 3%, E) *B. subtilis* (SM1) + Rice Bran 3% และ F) *B. subtilis* (LPDD3-2) + Rice Bran 3%

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ต่อการเจริญเติบโตของรากยางพารา

Treatment	Growth of Roots (cm)					
	3 day		7 day		14 day	
	SM1	LPDD3-2	SM1	LPDD3-2	SM1	LPDD3-2
Rice Bran 1%	1.05±0.04b	0.85±0.04c	2.43±0.03a	2.01±0.12b	4.72±0.08a	3.92±0.16b
Rice Bran 3%	0.94±0.04c	1.95±0.04a	1.95±0.04b	1.42±0.04cd	3.79±0.05b	2.86±0.07ef
Broken Rice 3%	0.44±0.04e	0.35±0.04e-g	1.46±0.04c	1.31±0.03d	3.09±0.06d	2.49±0.05gh
Broken Rice 5%	0.85±0.03c	0.58±0.02d	1.55±0.04c	1.45±0.03c	3.39±0.06c	3.00±0.07de
PDB	0.38±0.01ef	0.29±0.01fg	0.78±0.05e	0.58±0.02f	2.65±0.07fg	2.36±0.08h
Control	0.26±0.01gh	0.18±0.02h	0.47±0.03fg	0.38±0.01g	1.84±0.06j	1.61±0.02k
F-test	*	*	*	*	*	*

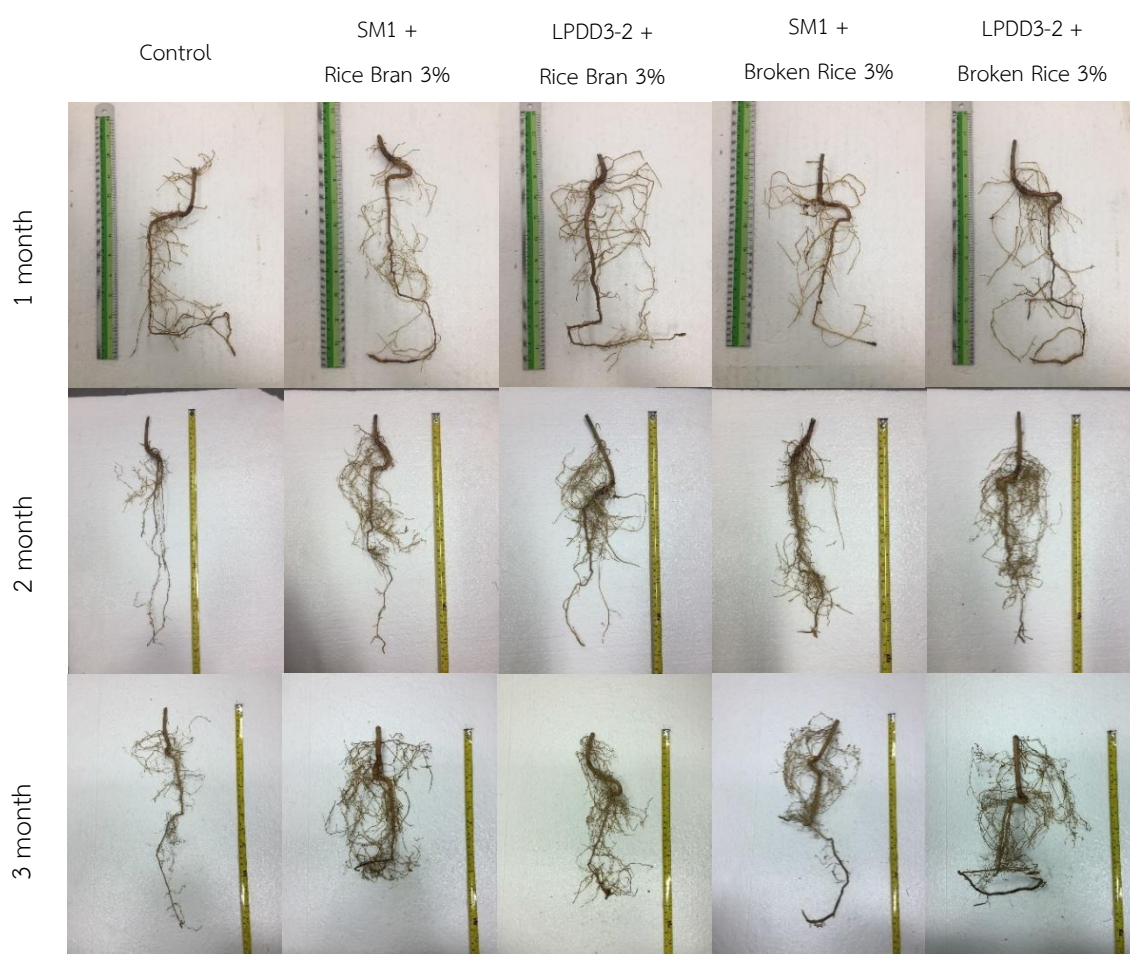
หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ และ NS = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.8.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* ต่อการเจริญของกล้ายางพาราในสภาพโรงเรือน

จากการทดสอบการเจริญของกล้ายางพาราในสภาพเรือนทดลองที่ระยะเวลา 1, 2 และ 3 เดือน โดยใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 เลี้ยงในอาหารที่เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา แบคทีเรียปฏิชีวนะทั้งสองสายพันธุ์ทำให้การเจริญเติบโตส่วนเหนือดินด้านความสูง จำนวนใบ และความยาวรากเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 23 และ 24) โดยการเจริญเติบโตของยางพาราที่อายุ 1 และ 2 เดือน พบว่าความสูงของต้นเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับการเจริญเติบโตของยางพาราที่อายุ 3 เดือน พบว่าเมื่อใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมปลายข้าว มีแนวโน้มทำให้ความสูงของต้นเพิ่มขึ้นได้แตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) สามารถวัดความสูงของต้นได้ 102.55 เซนติเมตร รองลงมา คือ การใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ SM1 และ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมรำข้าวและปลายข้าว สามารถวัดความสูงของต้นได้ 99.83 และ 96.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่การเจริญเติบโตทางด้านใบของยางพาราที่อายุ 1, 2 และ 3 เดือน พบว่าจำนวนใบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับความยาวรากมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และความยาวรากสูงสุดเมื่อใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมรำข้าว สามารถวัดความยาวรากได้ 26.67, 46.33 และ 50.42 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 4)

น้ำหนักสดของลำต้น ใบ และรากของต้นยางพาราเพิ่มขึ้น เมื่อมีการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 เลี้ยงในอาหารที่เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักสดของลำต้นยางพาราที่อายุ 1 และ 2 เดือน พบว่าน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ยางพาราอายุ 3 เดือน พบว่าการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าว ทำให้น้ำหนักสดของลำต้นเพิ่มสูงสุด เท่ากับ 13.44 กรัม แต่ในส่วนน้ำหนักสดของใบและรากยางพาราไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5) ในขณะที่น้ำหนักแห้งของลำต้น ใบ และรากของต้นยางพารา เมื่อมีการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 เลี้ยงในอาหารที่เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำหนักแห้งของใบยางพาราที่

อายุ 1 และ 2 เดือน มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ยางพาราอายุ 3 เดือน พบว่าการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าว ทำให้น้ำหนักแห้งของใบเพิ่มสูงสุด เท่ากับ 3.47 กรัม รองลงมา คือ การใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ SM1 และ LPDD3-2 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมปลายข้าว ทำให้น้ำหนักของใบเท่ากับ 3.39 และ 2.96 กรัม ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองอื่น ๆ แต่ในส่วนของน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากยางพาราไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 23 ลักษณะรากยางพาราหลังเติมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* ที่อายุ 1, 2 และ 3 เดือน

ตารางที่ 4 ความสูงส่วนเหนือดิน จำนวนใบ และความยาวรากของยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลองที่ต้นยางพาราอายุ 1, 2 และ 3 เดือน

Treatment		Shoot height (cm/month)			Number of rubber leaves (leaves/plant)			Root length (cm)		
		1 month	2 month	3 month	1 month	2 month	3 month	1 month	2 month	3 month
Rice Bran 3%	SM1	60.17±5.04a	74.50±2.75a	89.35±2.68bc	19.33±1.11a	21.00±1.45a	20.33±2.77a	26.67±0.50a	46.33±2.92a	50.42±3.54a
	LPDD3-2	60.82±3.55a	75.62±3.12a	96.20±3.86a-c	18.83±1.17a	21.17±1.65a	23.17±0.93a	24.28±0.99ab	34.50±2.41b	42.50±1.87b
Broken Rice 3%	SM1	55.87±4.34a	82.68±4.30a	99.83±2.63ab	17.67±1.13a	20.00±1.97a	23.67±1.05a	25.08±1.66ab	32.33±2.68b	39.33±1.80b
	LPDD3-2	55.87±2.14a	77.20±5.17a	102.55±3.84a	17.67±0.79a	19.50±1.49a	24.83±1.71a	25.08±0.49ab	32.17±2.25b	42.17±2.00b
Control		58.77±2.97a	71.78±4.03a	88.37±4.53c	18.33±0.75a	17.67±1.87a	19.83±2.22a	22.25±0.55b	33.67±2.4b	37.83±2.00b
F-test		ns	ns	*	ns	ns	ns	*	*	*

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 6 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ และ NS = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 5 น้ำหนักสดของส่วนลำต้น ใบ และรากของต้นยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลองที่ต้นยางพาราอายุ 1, 2 และ 3 เดือน

Treatment		Fresh weight (g/plant)								
		stem			leaves			root		
		1 month	2 month	3 month	1 month	2 month	3 month	1 month	2 month	3 month
Rice Bran 3%	SMR	4.70± 0.57a	7.89± 0.47a	10.05± 0.43b	3.99± 0.37a	6.10± 0.35a	11.27± 1.25a	3.46± 0.54a	7.07± 0.57a	7.58± 1.33a
	LPR	4.27± 0.35a	7.60± 0.63a	11.43± 0.69b	4.00± 0.41a	5.95± 0.71a	12.42± 1.14a	3.07± 0.34a	6.76± 0.76a	9.80± 1.23a
Broken Rice 3%	SMP	4.02± 0.41a	7.35± 0.92a	10.29± 0.76b	4.52± 0.29a	5.68± 0.53a	13.50± 1.08a	3.31± 0.42a	5.82± 0.58a	10.22± 1.61a
	LPP	4.45± 0.49a	8.57± 0.77a	13.44± 0.87a	4.60± 0.66a	4.86± 0.75a	12.90± 0.85a	2.93± 0.28a	6.98± 0.81a	9.99± 1.29a
Control		4.72± 0.37a	6.63± 0.67a	7.94± 0.51c	4.94± 0.72a	4.70± 0.72a	10.21± 1.13a	3.31± 0.33a	6.01± 0.93a	7.96± 1.27a
F-test		ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 6 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ และ NS = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 6 น้ำหนักแห้งของส่วนลำต้น ใบ และรากของต้นยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลองที่ต้นยางพาราอายุ 1, 2 และ 3 เดือน

Treatment		Dry weights (g/plant)								
		stem			leaves			root		
		1 month	2 month	3 month	1 month	2 month	3 month	1 month	2 month	3 month
Rice Bran 3%	SMR	1.72±0.17a	3.13±0.18a	4.56±0.62a	1.46±0.10a	2.51± 0.26a	2.39±0.45c	1.068±0.156a	2.77±0.22a	2.89±0.55a
	LPR	1.60±0.35a	3.03±0.18a	11.43±0.57a	1.54±0.13a	2.24± 0.20a	3.47±0.30a	0.972±0.102a	2.39±0.18a	3.71±0.48a
Broken Rice 3%	SMP	1.46±0.41a	2.99±0.27a	5.85±0.49a	1.61±0.09a	2.02± 0.27a	3.39±0.15ab	0.952±0.131a	2.20±0.22a	4.00±0.52a
	LPP	1.54±0.49a	3.13±0.36a	5.50±0.38a	1.60±0.20a	2.06± 0.10a	2.96±0.17a-c	0.870±0.084a	2.67±0.26a	3.89±0.38a
Control		1.73±0.16a	2.64±0.31a	4.32±0.41a	1.79±0.22a	1.84±0.33a	2.49±0.35bc	0.975±0.108a	2.32±0.40a	3.32±0.37a
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 6 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ และ NS = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของแหล่งอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *Bacillus subtilis*

4.1.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญและการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้งสาลี แป้งมัน น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโคส และกากน้ำตาล เป็นต้น การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 12.20 และ 12.16 log CFU/ml (ภาพที่ 2A) การเพิ่มและปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าว สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดี ส่งผลให้ปริมาณแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์เพิ่มมากขึ้น และลักษณะของเซลล์มีขนาดใหญ่ โดยที่ระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของรำข้าวและปลายข้าวมีแนวโน้มทำให้ปริมาณ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์สูงกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ และการตอบสนองต่อรำข้าวมีแนวโน้มดีกว่าปลายข้าว จึงชี้ให้เห็นว่าปริมาณแหล่งอาหารแต่ละชนิดมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ *B. subtilis* ทั้งนี้นอกจากปริมาณของแหล่งคาร์บอนแล้วชนิดของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ho (2015) ที่พบว่า *B. subtilis* ATCC 6633 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ดีในอาหารที่เตรียมจากเปลือกข้าวบาร์เลย์ เช่นเดียวกับ *Cladosporium* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ในอาหารที่เตรียมจากรำข้าว (Patel and Prajapati, 2014) จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่ารำข้าวและปลายข้าวมีคุณสมบัติส่งเสริมและเพิ่มความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ได้ดี เนื่องจากรำข้าวและปลายข้าวมีองค์ประกอบทางเคมี เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Demirci *et al.*, 2017; Demissie *et al.*, 2020; Moon and Chang, 2021) การส่งเสริมการเจริญที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการนำอาหารแข็ง PDA ที่เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่ง

ที่สภาวะดังกล่าวอาจส่งผลให้องค์ประกอบทางเคมีในรำข้าวและปลายข้าวเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของน้ำตาลที่ไม่ละลายน้ำไปเป็นน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ เช่น Arabinose, Galactose, Glucose, Inositol และ Xylose เป็นต้น (Daou and Zhang, 2012) ส่งผลให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เจริญเติบโตได้ดีกว่าการเลี้ยงด้วย PDA เพียงอย่างเดียว

4.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งการผลิตสารเมทาบอลิท์ด้วยเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตสารเมทาบอลิท์จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารเมทาบอลิท์และชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้แหล่งอาหารได้แตกต่างกันออกไป จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหาร PDA เสริมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรดที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าแหล่งอาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญมากที่สุด โดยส่งเสริมให้แบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญสูงถึง 11.37 log CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนการใช้แอมโมเนียมไนเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นพบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตได้เช่นกัน โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญได้เท่ากับ 11.25 log CFU/ml (ภาพที่ 2B) เช่นเดียวกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ยูเรีย, เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน, beef extract, ยีสต์สกัด หรือเคซีนไฮโดรไลเซท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก และใช้กลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ghribi and Ellouze-Chaabouni, 2011) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Oliveira และคณะ (2014) รายงานว่า *Rhodopseudomonas palustris* และ *Rhodobacter capsulatus* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้จากหางนม และใช้แหล่งไนโตรเจนได้จาก กลูตาเมต ซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Peigham และคณะ (2007) ที่พบว่า *Pseudomonas fluorescens* P-6 สามารถใช้สารสกัดจากยีสต์และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากมอลต์และยูเรียแหล่งไนโตรเจนได้ และการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้เชื้อ *B. subtilis* LAMI008 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด

เช่นกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Rocha *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า *Pediococcus* sp. R16 สามารถใช้กลูโคสและเพนโทปเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (ธิดา, 2557)

4.1.3 แหล่งฟอสฟอรัส

แหล่งฟอสฟอรัสในดินส่วนมากเป็นฟอสฟอรัสในรูปอินทรีย์□และอนินทรีย์□ซึ่งอยู่□ในรูปที่ละลายยากหรือไม่ละลายและเป็นฟอสฟอรัสที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์□ได้□ซึ่งมีอยู่ประมาณ 95-99 เปอร์เซ็นต์ □(Pradhan and Sukla, 2005) ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ช่วยทำให้การแบ่งเซลล์และการพัฒนาของส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืชได้ดี นอกจากนี้ฟอสฟอรัสยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และฟอสโฟลิพิด (phospholipids) (Nell *et al.*, 2009) อีกทั้งฟอสฟอรัสยังทำหน้าที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาการสร้างและถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์อีกด้วย ฟอสฟอรัสจะมีประโยชน์ได้□ก็ต่อเมื่อฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยออกมาอยู่□ในรูปฟอสฟอรัสที่ละลายในดินเท่านั้น (Brady and Weil, 2002) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตมีอยู่□หลายกลุ่มทั้งแอคติโนมัยซีท แบคทีเรีย และเชื้อรา เช่น *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., และ *Xanthomonas* spp. จุลินทรีย์จะทำหน้าที่เป็นตัวช่วยดูดซับธาตุฟอสฟอรัสในดิน โดยการสร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดมีทั้งเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดอินทรีย์ เช่น กรดไนตริก และกรดซัลฟูริก เพื่อย่อยละลายฟอสฟอรัสรูปที่ไม่□ละลายให้ละลายออกมา เมื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหาร PDA เสริมแหล่งฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตและไดโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0, 5, 15, 25 และ 35 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองสายพันธุ์ตอบสนองต่อแหล่งฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ได้ดี ส่งเสริมให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เจริญสูงถึง 11.40 log CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนการใช้ฟอสฟอรัสจากไดโพแทสเซียมฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสนั้นพบว่าสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตได้เช่นกัน โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เจริญได้เท่ากับ 11.37 log CFU/ml (ภาพที่ 2C) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vikram และ Hamzeharghani (2008) พบว่าการเติมหินฟอสเฟตร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ส่งผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงกว่าการเติมหินฟอสเฟตหรือปุ๋ยฟอสฟอรัสเพียงอย่างเดียว ซึ่งให้เห็นว่าการเติมหินฟอสเฟตช่วยส่งเสริมกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถ

หลังกรดหรือเอนไซม์ออกมาเพื่อทำการละลายฟอสฟอรัสที่ละลายได้ง่ายก่อน ซึ่งหินฟอสเฟตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสที่ง่ายต่อการละลายและจุลินทรีย์สามารถนำฟอสฟอรัสที่ละลายได้ไปใช้ในการสร้างพลังงาน เจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaurand (2015) ที่ได้ศึกษาผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดและข้าวสาลี พบว่าการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับหินฟอสเฟตส่งผลให้จำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้น

4.1.4 แหล่งโพแทสเซียม

จุลินทรีย์ดินมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารพืชในดินรวมถึงธาตุโพแทสเซียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ละลายธาตุอาหารพืชโดยกิจกรรมการย่อยสลาย จุลินทรีย์ที่สามารถละลายโพแทสเซียมจากแร่ที่มีโพแทสเซียมเป็นส่วนประกอบได้ เช่น แร่ไมกา มัสโคไวท์ ออร์โทเครส และไบโอไทต์ เป็นต้น อาจเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก กรดฟอร์มิก เป็นต้น โดยกรดอินทรีย์ดังกล่าวสามารถช่วยส่งเสริมการสลายตัวของแร่ และช่วยเพิ่มการแตกตัวของสารประกอบอินทรีย์ (Styriakova *et al.*, 2003; Sheng *et al.*, 2003; Sheng and He, 2006) ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถละลายโพแทสเซียม ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Bacillus extroquens* และ *Clostridium pasteurianum* เป็นต้น (Archana *et al.*, 2013) จากงานวิจัยของกมลชนก และคณะ (2562) ที่ได้ศึกษาแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม (Potassium-solubilizing bacteria; KSB) ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 พบว่าการแช่เมล็ดข้าวด้วยแบคทีเรีย KSB (Broth) ส่งเสริมให้การงอกสูงสุดร้อยละ 96.75 ส่วนเมล็ดที่แช่ด้วย KSB (เซลล์) ทำให้ความเร็วในการงอกของเมล็ดข้าวสูงเฉลี่ย 30.66 ต้นต่อวัน จึงชี้ให้เห็นโพแทสเซียมช่วยกระตุ้นกลไกการงอกของเอมบริโอจึงส่งเสริมให้เมล็ดงอกเร็วขึ้น ในทำนองเดียวกันเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหาร PDA เสริมแหล่งโพแทสเซียม พบว่าการใช้โพแทสเซียมไนเตรดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตรเป็นแหล่งโพแทสเซียมที่เหมาะสมต่อการเจริญมากที่สุด โดยส่งเสริมให้แบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญสูงถึง 11.36 log CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนการใช้โพแทสเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งโพแทสเซียมนั้นพบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตได้เช่นกัน โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญได้ 11.19 log CFU/ml (ภาพที่ 2D) สอดคล้องกับ *B. circulans* และ *Pseudomonas fluorescens* ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครส สารสกัดจากยีสต์ แร่เฟลด์สปาร์ 0.175 กรัมต่ออาหารเหลว 50 มิลลิลิตร และใส่ $ZnCl_2$ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงที่

ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 10 เท่า (ศิริลักษณ์ และจิตราภม, 2564)

4.2 ผลของแหล่งอาหารต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

4.2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ โดยพบว่าการใช้รำข้าวที่ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ปลายข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้เส้นใยเชื้อราเจริญได้ดีไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ในขณะที่การใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อรามีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้รำข้าวที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เส้นใยเชื้อราเจริญได้เท่ากับ 4.30 และ 3.66 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3A) การที่เส้นใยเชื้อราเจริญได้ลดลงอาจเกิดจากองค์ประกอบทางเคมีในรำข้าว โดยรำข้าวจัดเป็นวัสดุที่เป็นแหล่งพลังงานและมีเยื่อใยสูง ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนเมอร์ ทำการใช้รำข้าวที่ความเข้มข้นสูงเกินไปอาจจะเร่งกระบวนการเมแทบอลิซึม ทำให้เชื้อรามีการเจริญและหยุดชะงัก (Frank, 2010) ในขณะที่เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Pleurotus dryinus* IB 903 โดยใช้เปลือกส้ม (ร้อยละ 8) เป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 48.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 33.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Elisashvili et al., 2006) ในทำนองเดียวกันการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus flavus* KUB2 พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 118.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Namnuch et al., 2021) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ketsakhon และคณะ (2022) ได้รายงานการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Bacillus altitudinis* RS3025 เช่นกัน

4.2.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนคือปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากไนโตรเจนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโน โปรตีน และวิตามิน (Mohamad et al., 2011) ซึ่งโปรตีนหลายชนิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ การเสริม

ไนโตรเจนจึงทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นและเป็นเสมือนตัวกระตุ้นให้ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ เช่น การสังเคราะห์กลูตามีน (Mhatre *et al.*, 2016) ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (Kim *et al.*, 2005) ผลิต 2,3-butanediol (Tian *et al.*, 2016) จากการใช้ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราบนอาหาร PDA เสริมแหล่งไนโตรเจนทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ลดลง โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ส่งผลให้เส้นใยเชื้อราเจริญน้อยที่สุด เท่ากับ 1.60 และ 1.90 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3B) เช่นเดียวกับ เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนมากกว่า 16.20 กรัมต่อกิโลกรัม ทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pleurotus ostreatus* (U6/ 8), *Lentinula edodes* (U6/ 12) และ *Agaricus blazei* (U2/2) ลดลง (Agostini *et al.*, 2011) ขณะที่เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน (France and Reid, 1982; Ek *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากเชื้อรา *A. niger* เมื่อเสริมแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ได้แก่ yeast extract, bacteriological peptone, meat peptone, แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) และ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] พบว่า bacteriological peptone และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ส่งผลให้เชื้อรา *A. niger* ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้สูงสุด โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 1,744 และ 235.7 nkat/mL เนื่องจากไนโตรเจนคือสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโน โปรตีน และวิตามิน ซึ่งโปรตีนหลายชนิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ดังนั้นการเสริมไนโตรเจนจึงเสมือนเป็นตัวกระตุ้นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ (Mohamad *et al.*, 2011) จึงชี้ให้เห็นว่าชนิดของแหล่งอาหารและระดับความเข้มข้นของแหล่งอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา โดยปริมาณแหล่งอาหารที่มากหรือน้อยเกินไปอาจเป็นปัจจัยที่จำกัดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้ (Mantovani *et al.*, 2007)

4.2.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตโดยเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นในทุกกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช ฟอสฟอรัสส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิก เอนไซม์ โคเอนไซม์ นิวคลีโอไทด์ และฟอสโฟลิปิด (Satyaprakash *et al.*, 2017; Kalayu, 2019) ซึ่งเอนไซม์ที่มีบทบาทย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ เอนไซม์ไฟเทส (Phytase) ทำหน้าที่ย่อยสลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปของกรดไฟติก (Phytic acid) เอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ เอนไซม์ฟอสโฟนา

เทส (Phosphonate) และคาร์บอน-ฟอสฟอรัสไลเอส (Carbon-phosphorus lyase) จะทำหน้าที่ทำลายพันธะระหว่างคาร์บอนและฟอสฟอรัสในสารอินทรีย์ที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ (Ingle and Padole, 2017) เช่น เชื้อราไมคอร์ไรซา *Oidiodendron* sp. และ *Humicola* sp. สามารถเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสได้โดยการสร้างเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) (นิพาพรรณ, 2554) จากการศึกษาแหล่งฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดยพบว่าการใช้โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต และไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 0, 5, 15, 25 และ 35 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสฟอรัสของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 พบว่าการใช้โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 5 และ 15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ทำให้เส้นใยเชื้อรามีแนวโน้มการเจริญลดลง เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญได้ 5.50 และ 5.60 เซนติเมตรตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 3C) จึงชี้ให้เห็นว่าเชื้อรา *R. microporus* สามารถนำฟอสฟอรัสที่ละลายได้ไปใช้ในการสร้างพลังงาน และการเจริญเติบโต โดยกลไกต่าง ๆ เช่น การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับเฟอริกฟอสเฟต (Ferric phosphate) ได้เป็นเฟอรัสซัลเฟต (Ferrous sulfate) แล้วจึงปลดปล่อยฟอสเฟตอิสระออกมา (Ingle and Padole, 2017) ปฏิกิริยาการขับโปรตอนออกจากเซลล์จากระบวนการนำแอมโมเนียมเข้าสู่เซลล์ จุลินทรีย์ (Ammonium assimilation) และกระบวนการหายใจระดับเซลล์เป็นอีกกลไกหนึ่งที่มีบทบาทของจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสฟอรัสออกมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ (Sharma et al., 2013)

4.2.4 แหล่งโพแทสเซียม

โพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อส่วนสำคัญสำหรับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ ช่วยในการสังเคราะห์น้ำตาลและแป้ง การเคลื่อนย้ายแป้งและน้ำตาล และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในไซโทพลาซึม (cytoplasm) (Leigh and Jones, 1984; Oosterhuist et al., 2013) เมื่อศึกษาแหล่งโพแทสเซียมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดยใช้โพแทสเซียมไนเตรต และโพแทสเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร เป็นแหล่งโพแทสเซียม พบว่าการใช้โพแทสเซียมไนเตรตและโพแทสเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร ทำให้เส้นใยเชื้อรามีแนวโน้มการเจริญน้อยที่สุด สามารถวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้อยู่ในช่วง 5.50 และ 6.10 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3D) จึงชี้ให้เห็นว่าชนิดของแหล่งอาหารและระดับความเข้มข้นของแหล่งอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ในทำนองเดียวกัน จิระเดชและคณะ (2559) ได้ศึกษาอิทธิพลของเชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ชนิดเชื้อสดและ

ปริมาณปุ๋ย KH_2PO_4 ในสารละลายธาตุอาหาร เพื่อลดการเกิดโรครากเน่าของผักกาดหอม พบว่าการเพิ่มปุ๋ย KH_2PO_4 15 เปอร์เซ็นต์ และใช้เชื้อรา *T. asperellum* ร่วมด้วย (KP-15+Ta+Pa) สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่า 18.33 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ใบเพิ่มขึ้น 30.33 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่หน้าตัดโคนต้นเพิ่มขึ้น 54.32 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรรากเพิ่มขึ้น 76.98 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดทั้งต้น และรากเพิ่มขึ้นสูงที่สุด 62.28 เปอร์เซ็นต์

4.3 ผลของแหล่งอาหารต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

การที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สาเหตุโรครากขาวในยางพาราได้ เนื่องจาก *B. subtilis* มีคุณสมบัติการยับยั้งโดยกลไกการแข่งขัน (competition) และครอบครองพื้นที่ได้ดี ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งระหว่างเชื้อรากับแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งการเกิดบริเวณยับยั้งอาจเนื่องจาก *B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดที่ยับยั้งเชื้อราได้ เช่น iturin, fengycin, surfactin, bacylomycin, macrolactin, bacillaene และ bacilysin (Rabbee *et al.*, 2019; Khedherab *et al.*, 2021; Ongena and Jacques, 2008) ซึ่งสารแต่ละชนิดจะออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย โดยเฉพาะแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถส่งผลต่อการผลิตสารชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ทดสอบด้วยวิธี dual culture plate บนแหล่งอาหารต่างชนิด โดยเฉพาะการทดสอบร่วมกับแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น สามารถสร้างบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* กับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้กว้างที่สุด คือ 27.25 และ 26 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 6A) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จะเห็นได้ว่ารำข้าวและปลายข้าวเป็นแหล่งอาหารที่ดีที่สุดที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต หรือการสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ทำให้กิจกรรมการเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง (Kilian *et al.*, 2004) สำหรับการทดสอบร่วมกับแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร สามารถสร้างบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้กว้างที่สุด คือ 34 และ 32.75 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่ทดสอบร่วมกับแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรต สามารถสร้างบริเวณการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ 29 และ 29.50 มิลลิเมตร

ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 6B) และเมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ทดสอบร่วมกับแหล่งฟอสฟอรัส พบว่าแหล่งฟอสฟอรัสจากโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส สามารถสร้างบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้กว้างที่สุด คือ 18.75 และ 17.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ทดสอบร่วมกับแหล่งฟอสฟอรัสจากไดโพแทสเซียมฟอสเฟต สามารถวัดความกว้างบริเวณการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ในช่วง 12-16 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 6C) ในขณะที่ทดสอบร่วมกับแหล่งโพแทสเซียม พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อทดสอบแหล่งโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร สามารถสร้างบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้กว้างที่สุด คือ 12.75 และ 13.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่ทดสอบร่วมกับแหล่งโพแทสเซียมจากโพแทสเซียมไนเตรต สามารถสร้างบริเวณการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ในช่วง 5.00-10.00 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 6D) ถึงแม้ว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ในระดับต่ำ แต่ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ ส่งผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราทำให้เส้นใยเชื้อรามีลักษณะอัดแน่น ลีบแบน และขนาดเล็กกว่าเส้นใยในชุดควบคุม หรือมีองค์ประกอบภายในเส้นใยลดน้อยลง ทำให้เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ (ภาพที่ 7 และ 8) ซึ่งอาจเป็นผลจากเอนไซม์หรือสารทุติยภูมิของแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น เอนไซม์ chitinase และ β -1,3 glucanase สามารถย่อยสลาย chitin และ glucan ที่เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อราได้ (Parker, 2000) ดังนั้นจึงคัดเลือกแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป เนื่องจากรำข้าวและปลายข้าวมีองค์ประกอบทางเคมีที่จุลินทรีย์ต้องการในการเจริญ และเป็นเศษเหลือทางการเกษตรที่สามารถหาได้ง่ายและราคาถูก

4.4 ผลการแปรผันอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *Bacillus subtilis* ร่วมกับการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

อุณหภูมิเป็นปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดกิจกรรมของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน จากการแปรผันอุณหภูมิสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 เพื่อให้ผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 พบว่าอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 71.07 และ 69.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมา คือ อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราได้ อยู่ในช่วง 60-67 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถวัดการยับยั้งได้ เนื่องจากเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 9) เนื่องจากอุณหภูมิจะมีผลต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีในเซลล์เพิ่มขึ้น และเมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์ หรือโปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพการทำงาน จึงทำให้เชื้อรา *R. microporus* ไม่สามารถเจริญได้ แต่ในขณะที่แบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สามารถเจริญเติบโตได้ดี แม้อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* มีคุณสมบัติที่ทนต่ออุณหภูมิช่วงกว้างตั้งแต่ -5 ถึง 80 องศาเซลเซียส และสามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่อความร้อน สารเคมี รังสียูวี และความแห้งแล้งได้ดี (Ashlee *et al.*, 2008)

4.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ด้วยวิธี Pour plate

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัคษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี pour plate เป็นวิธีที่แบคทีเรียมีการปลดปล่อยสารปฏิบัคษ์ออกมาสัมผัสกับเชื้อราโดยตรง ซึ่งแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ทดสอบร่วมกับแหล่งอาหารเสริมรำข้าวและปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดีที่สุด คือ 87.67 และ 84.57 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) ซึ่งใกล้เคียงกับ

แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium graminearum* ได้ 81.3 เปอร์เซ็นต์ (Zhao *et al.*, 2014) เมื่อศึกษาด้วยตาเปล่าลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* สายพันธุ์ NK6 พบว่าลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* ที่ทดสอบบนแหล่งอาหารที่เสริมรำข้าว ร่วมกับเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองสายพันธุ์ มีลักษณะบางและการเจริญไม่สม่ำเสมอ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบร่วมกับแหล่งอาหารที่เสริมปลายข้าว เส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่น (ภาพที่ 12) และเมื่อตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. microsporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาพบว่าบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรามีความผิดปกติ ปลายเส้นใยโป่งพอง บิดเบี้ยว และกุดตัวลง เนื่องจากแบคทีเรียอาจปลดปล่อยสารออกมาที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *R. microsporus* ได้ ทำให้เส้นใยฝ่อ และมีลักษณะผิดปกติอย่างชัดเจน (ภาพที่ 13 และ 14) เช่นเดียวกับ *B. subtilis* ที่ทำให้เส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Macrophomina sp.*, *Sclerotium rolfsii*, และ *F. oxysporum* เกิดอาการบวม เยื่อหุ้มเซลล์แตก เส้นใยเล็กลงและบิดเบี้ยว (Ashwini and Srividya, 2014; Abdelmoteleb *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2018) และ *B. amyloliquefaciens* ที่ทำให้เส้นใยเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* โค้งงอ เยื่อหุ้มเซลล์แตก (Rahman *et al.*, 2016) เช่นเดียวกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สามารถทำให้เส้นใยเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ และเมื่อศึกษาลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เกาะบริเวณผิวเส้นใยของเชื้อรา ทำให้เส้นใยฝ่อ เป็นรู และเกิดรอยย่นบนพื้นผิวที่ผนังเซลล์เส้นใยเชื้อรา (Sungdong *et al.*, 2021)

4.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* ด้วยวิธี Volatile extracellular metabolite

แบคทีเรียปฏิปักษ์มีกลไกในการยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* โดยการเข้าทำลายและสามารถปลดปล่อยสารปฏิปักษ์ออกมาสัมผัสกับเชื้อราได้โดยตรงและสามารถแก่งแย่งพื้นที่ได้ดีกว่าเชื้อรา นอกจากนี้แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถผลิตสารระเหยได้ (Vespermann 2007; Leelasuphakul *et al.*, 2008) ซึ่งการผลิตสารระเหยของแบคทีเรียปฏิปักษ์จะถูกสร้างในระยะ stationary phase เป็นระยะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์มีการสร้างสปอร์ เช่น สารในกลุ่มของ pyrazines, aldehydes, ketones และ alcohols (Azokpota *et al.*, 2009) โดยสารระเหยที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตและปลดปล่อยออกมาจะประกอบด้วยไนโตรเจนและกำมะถันเป็นองค์ประกอบหลัก (Fink *et al.*, 2020; Kai, 2020) ทั้งนี้

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถผลิตสารระเหยยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ (ภาพที่ 15 และ 16) โดยเฉพาะการทดสอบร่วมกับแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถผลิตสารระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ สูงสุด 68.63 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 62.25 และ 66.75 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15A) ขณะที่มีการเสริมแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้สูงสุด 66.68 และ 66.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 15B) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถปลดปล่อยสารระเหยออกมาควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สาเหตุโรครากขาวของยางพาราได้ ส่งผลทำให้เส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 มีลักษณะบางและเจริญได้น้อย อีกทั้งทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะบิดเบี้ยว โป่งพองบริเวณปลายเส้นใย และกุดตัวลงเช่นกัน เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (ภาพที่ 16 และ 17) แสดงให้เห็นว่าสารระเหยดังกล่าวอาจเข้าไปสะสมภายในเซลล์ ส่งผลกระทบและขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ทำให้ความสามารถในการสร้างสปอร์และเส้นใยของเชื้อราลดลง (Mckeen *et al.*, 1986)

4.7 ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารสกัดจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*

การสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ Dichloromethane และ Ethyl Acetate นั้น เป็นการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเรียงลำดับความมีขั้วจากตัวทำละลายไม่มีขั้ว ไปจนถึงตัวทำละลายมีขั้ว ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้สารสกัดที่มีขั้วตามขั้วของตัวทำละลายซึ่งมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย (อุไรวรรณ และคณะ, 2549) โดยผลจากการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* พบว่า น้ำหนักของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD3-2 เลี้ยงด้วยรำข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นำมาสกัดด้วย Dichloromethane มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 503.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SM1 เลี้ยงด้วยรำข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 164.9 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสกัดด้วย Ethyl acetate (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถ

ละลายในตัวทำละลาย Dichloromethane ได้ดีที่สุด โดย Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง มีคุณสมบัติในการทำละลายได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (ภาวนา และคณะ, 2554) โดยมีค่า R_f อยู่ที่ 0.13, 0.18, 0.23 และ 0.39 เซนติเมตร ซึ่งค่า R_f จะเป็นค่าเฉพาะตัวของสารและจะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายและตัวดูดซับ (ภาพที่ 19) เมื่อนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์ด้วย NMR (300 MHz, $CDCl_3$) พบว่าสเปกตรัมของ NMR แสดงลักษณะของพีคที่ชัดเจน จากความชัดเจนของพีคที่ปรากฏในสเปกตรัมทั้ง 4 การวิเคราะห์สามารถบอกอย่างคร่าว ๆ ถึงการมีสารทางชีวภาพ ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงถึงโปรตอนชนิด olefinic proton, aliphatic proton และ aromatic proton โดยพบชนิดของโปรตอนเหล่านี้บนฝั่งสนามสูงของสเปกตรัม NMR (ภาพที่ 20) จากการศึกษาของนฤมล และอทิพันธ์ (2562) ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 พบว่าการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2 : 1) ได้สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.45 กรัมต่อลิตร มีค่า critical micelle concentration (CMC) 0.044 กรัมต่อลิตร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* AS6 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,032 m/z

4.8 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั๊ักษ์ *Bacillus subtilis* ต่อการเจริญเติบโตของต้นยางพารา

การศึกษาศสมบัติการเป็นเชื้อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ของแบคทีเรียปฏิบั๊ักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม L-tryptophan 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร สามารถสร้าง IAA ได้ โดยสร้าง Halo Zone รอบ ๆ โคลินี่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิบั๊ักษ์สามารถสังเคราะห์ปริมาณ IAA ได้อย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 21) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่า แบคทีเรียในสกุล *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Methylophaga*, *Pseudomonas*, *Agromyces* และ *Azospirillum* สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ (Bal et al., 2013; Lavakush et al., 2014) ขณะที่ Shahab และคณะ (2009) ได้ศึกษาการผลิตสาร IAA ของแบคทีเรีย *B. thuringiensis* และ *P. aeruginosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ tryptophan พบว่าแบคทีเรียผลิตปริมาณ IAA อยู่ในช่วง 57-288 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดลองของธนากร (2557) ที่ศึกษาการสังเคราะห์ IAA จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากดินและเปลือกของต้นยางพารา ในอาหารที่มี L-tryptophan เช่นกัน พบว่าไอโซเลท NRRU-L11 สามารถสร้าง IAA ได้สูงถึง 608 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *B. megaterium*, *Lactobacillus casei*, *B. subtilis*, *B. cereus*

และ *Lactobacillus acidophilus* บริเวณรอบรากข้าวโพด ข้าวสาลี ต้นกล้วย และฝ้าย มีความผันแปรของปริมาณการผลิต IAA ตั้งแต่ 15-65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Mohite, 2013) เมื่อทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต IAA ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 และมีการเติม L-tryptophan 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สามารถผลิต IAA ได้อยู่ในช่วง 155–280 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด เท่ากับ 276.857 และ 263.659 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าวที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิต IAA ได้น้อยสุด เท่ากับ 157.912 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้การผลิต IAA ได้ในปริมาณที่ต่างกัน โดยเฉพาะองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเป็นตัวแปรที่สำคัญในการผลิต IAA ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของจันทรแรม และคณะ (2560) ที่ได้ศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของแบคทีเรีย *B. endophyticus* P12-12 พบว่าการใช้ yeast extract 10 กรัมต่อลิตร, mannitol 10 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร, NaCl 1 กรัมต่อลิตร, L-tryptophan 10 กรัมต่อลิตร และ pH 9 สามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 113.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจากเดิมสามารถผลิต IAA ได้เท่ากับ 11.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้เห็นว่าองค์ประกอบของแหล่งอาหารที่ใช้เลี้ยงมีผลต่อการผลิต IAA อย่างเห็นได้ชัด อีกทั้งกรดอินโดลอะซิติก (IAA) สามารถช่วยเพิ่มการเจริญของรากและลำต้น (Oteino *et al.*, 2015)

การใช้แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เป็นวิธีการหนึ่งซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเมื่อพืชต้องเผชิญความเครียดจากเชื้อก่อโรค ภัยแล้ง และการขาดสารอาหาร โดยแบคทีเรียช่วยสร้างธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืชเพื่อส่งเสริมการงอก การยึดของราก และการยึดของลำต้น (Vacheron *et al.*, 2013) เช่น การเติมเชื้อ *B. subtilis* และ *P. fluorescens* ที่สามารถสร้าง IAA และละลายฟอสเฟตได้ให้กับผักกาดหัวที่ปลูกในดินและรดด้วยสารละลาย NaCl 75 – 150 mM พบว่าการเติมเชื้อดังกล่าวช่วยเพิ่มน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง และลดระดับกรดแอบไซซิกในพืช ทำให้ผักกาดหัวเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Mohamed and Gomaa, 2012) ในทำนองเดียวกันได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่มีความสามารถในการผลิตสาร IAA ต่อการงอกของราก ยางพาราที่อายุ 3, 7 และ 14 วัน ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการแช่เมล็ดยางพาราด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากรำ

ข้าวและปลายข้าว สามารถส่งเสริมการงอกของยางพาราได้ดี ปริมาณรากฝอยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกกรรมวิธีทดลอง และรากแก้วมีความยาวเพิ่มขึ้นได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 22) โดยในวันที่ 3 พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD3-2 เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ยางพาราสามารถงอกได้สูงสุด สามารถวัดความยาวของรากได้ 1.95 เซนติเมตร และในวันที่ 7 และ 14 วัน พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมการงอกของรากยางพาราได้สูงสุด เท่ากับ 2.43 และ 4.72 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดังกล่าวที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าวที่ความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถวัดความยาวรากได้ 0.35 - 3.40 เซนติเมตร และความยาวรากที่เจริญได้น้อยที่สุดเมื่อแช่เมล็ดยางพาราในแหล่งอาหารเหลว (PDB) และน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ มีความยาวรากเพียง 0.18 - 2.60 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 3) เช่นเดียวกับรายงานของ Palupi และคณะ (2017) ได้เคลือบเมล็ดข้าวร่วมกับ *Pseudomonas diminuta* A6 plus *Bacillus subtilis* 5/B สามารถทำให้มีความแข็งแรงของเมล็ด และอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าสูงที่สุด และการใช้ *B. firmus* เคลือบเมล็ดถั่วลิสงเพื่อควบคุมโรคใบไหม้ (*Rhizoctonia solani*) พบว่าการเคลือบเมล็ดไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่เคลือบด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความผิดปกติของต้นกล้าน้อยกว่าเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบ (Pengnoo *et al.*, 2006) เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถส่งเสริมให้พืชมีพัฒนาการที่ดีและเป็นต้นกล้าที่มีความแข็งแรงสูง

นอกจากนี้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์กลุ่มของ phytohormones ได้ เช่น indoleacetic acid, abscisic acid, gibberellins และ cytokinins ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อกระบวนการการงอกและการเจริญเติบโตของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Glick, 2012; Rakshit *et al.*, 2015; Singh, 2016) จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ต่อการเจริญของยางพาราที่อายุ 1, 2 และ 3 เดือน ในสภาพเรือนทดลอง โดยการเติมแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าว พบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์ มีผลทำให้ความสูงของต้นยางพาราสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมตั้งแต่เดือนที่ 1 จนถึงเดือนที่ 3 โดยในเดือนที่ 1 และ 2 แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากรำข้าว และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในอาหารเสริมแหล่งคาร์บอนจากปลายข้าว ทำให้ความสูงของต้นยางพารา

สูงที่สุดคือ 60.82 และ 82.68 เซนติเมตร แต่ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีอื่น ๆ สำหรับความสูงของต้นยางพาราในเดือนที่ 3 พบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ดังกล่าวส่งผลให้ความสูงของต้นยางพาราสูงที่สุดคือ 102.55, 99.83, 96.20 และ 89.35 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งมีความแตกต่างในทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีทดลองอื่น ๆ ในทำนองเดียวกันการใช้ *Bacillus pumilus* BETL13 ที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูง ส่งผลให้ต้นกล้าพริกมีความสูงกว่าในกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้ต่ำ (Amaresan *et al.*, 2012) เช่นเดียวกับการแช่ต้นกล้าพริกในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต IAA ก่อนย้ายปลูกลงในดินละเอียดร่วมกับทราย พบว่าต้นกล้าพริกมีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 35.8-45.5 เซนติเมตร (Datta *et al.*, 2011)

สำหรับจำนวนใบของต้นยางพาราในแต่ละเดือน พบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะทุกสายพันธุ์พบว่าในเดือนที่ 1, 2 และ 3 การใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีทดลอง โดยการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากรำข้าว มีผลต่อการเพิ่มจำนวนใบของต้นยางพาราสูงที่สุดในเดือนที่ 1 และ 2 มีจำนวนใบเฉลี่ยอยู่ที่ 19 และ 21 ใบ/ต้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีทดลอง ในขณะที่เดือนที่ 3 การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากปลายข้าว มีผลต่อการเพิ่มจำนวนใบของต้นยางพาราสูงที่สุดเฉลี่ยอยู่ที่ 24 ใบ/ต้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีทดลอง ทั้งนี้กรรมวิธีควบคุมยังคงเป็นกรรมวิธีที่มีจำนวนใบต่อต้นยางพاران้อยที่สุดในทุกเดือน โดยในเดือนที่ 2 มีจำนวนใบน้อยที่สุดเฉลี่ยอยู่ที่ 17 ใบ/ต้น (ตารางที่ 4) ซึ่งจากการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถส่งผลให้จำนวนใบเพิ่มขึ้นได้ดี เนื่องจากแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการผลิต IAA และอาจจะเป็นไปได้ที่แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถช่วยเสริมสร้างความสมบูรณ์ของต้น ใบ และการพัฒนาของรากได้มากขึ้น ส่งผลให้การเจริญเติบโตของพืชมากขึ้นด้วย (จิระเดช, 2559) เช่นเดียวกับการศึกษาผลของปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมต่อความสูงและจำนวนใบของพริกชี้หนู พบว่าจำนวนใบมีค่าอยู่ในช่วง 201-294 ใบ/ต้น โดยกรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ยพบจำนวนใบเพียง 201 ใบ/ต้น เท่านั้น (Khan *et al.*, 2014)

สำหรับความยาวรากของต้นยางพาราในแต่ละเดือนพบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะทุกสายพันธุ์ มีผลทำให้ความยาวรากของต้นยางพาราสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมตั้งแต่เดือนที่ 1 จนถึงเดือนที่ 3 โดยการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากรำข้าว ทำให้ความยาวรากของ

ต้นยางพาราสูงที่สุดคือ 26.67, 46.33 และ 50.42 เซนติเมตร ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4) ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SM1 สามารถผลิต IAA ได้น้อยกว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD3-2 จึงพิสูจน์ให้เห็นว่า ผลกระทบจากการผลิต IAA ในกล้าพืชขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ถ้าความเข้มข้นต่ำอาจกระตุ้นการเจริญเติบโต ในขณะที่ความเข้มข้นของ IAA สูงอาจจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ อีกทั้งพืชที่ต่างชนิดกันอาจตอบสนองต่อชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของ IAA ที่แตกต่างกัน (Solano *et al.*, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Etesami และคณะ (2015) พบว่าความยาวของรากข้าวมีสหสัมพันธ์กับปริมาณ IAA โดยเมื่อปริมาณ IAA สูงขึ้นความยาวของรากก็จะเพิ่มขึ้น ขณะที่ Bhandari และคณะ (2009) พบว่าปริมาณ IAA ในอัตราต่าง ๆ มีผลต่อความยาวราก ความสูงของต้นมันฝรั่ง (*Verbascum Thapsus*) โดยที่ความเข้มข้น 50 ppm IAA ช่วยให้พืชมีความยาวราก ความสูง จำนวนใบ จำนวนข้อ จำนวนกิ่งสูงกว่าความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ขณะที่ความเข้มข้นที่ 200 ppm ส่งเสริมในด้านของพื้นที่ใบ จำนวนดอกและผล

สำหรับอัตราส่วนของน้ำหนักราก น้ำหนักแห้ง ในระยะ 1, 2 และ 3 เดือน พบว่าเดือนที่ 1 และ 2 การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากปลายข้าว ส่งผลให้น้ำหนักรากของต้นยางพาราสูงที่สุดเฉลี่ย 4.45 และ 8.57 กรัม/ต้น แต่ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติกับกรรมวิธีทดลองอื่น ในขณะที่เดือนที่ 3 พบน้ำหนักรากของต้นยางพาราสูงที่สุดเฉลี่ย 13.44 กรัม/ต้น เมื่อใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดังกล่าว ($P < 0.05$) สำหรับน้ำหนักรากของใบ ไม่พบความแตกต่างในทางสถิติกับการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดังกล่าว โดยกรรมวิธีควบคุมทำให้น้ำหนักรากของใบน้อยที่สุดคือ 4 กรัม/ต้น และการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากปลายข้าว ส่งผลให้น้ำหนักรากของใบสูงที่สุดคือ 13.50 กรัม/ต้น ขณะที่น้ำหนักรากของราก ไม่พบความแตกต่างในทางสถิติกับการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดังกล่าว โดยกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากปลายข้าว ส่งผลให้น้ำหนักรากของรากน้อยที่สุดคือ 2.93 กรัม/ต้น และการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากปลายข้าว ส่งผลให้น้ำหนักรากของรากสูงที่สุดคือ 10.22 กรัม/ต้น (ตารางที่ 5) ในส่วนของน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินของต้นยางพาราเป็นไปในทิศทางเช่นเดียวกันกับน้ำหนักสดคือการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากรำข้าว ส่งผลทำให้น้ำหนักแห้งของต้นยางพาราสูงที่สุดคือ 11.43 กรัม/ต้น แต่ไม่มีความแตกต่างกับกรรมวิธีทดลองอื่น สำหรับน้ำหนักแห้งของใบพบว่าในเดือนที่ 1 และ 2 การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างในทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม

ขณะที่การใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารเสริมคาร์บอนจากรำข้าวในเดือนที่ 3 ส่งผลทำให้น้ำหนักแห้งของใบสูงที่สุดคือ 3.47 กรัม/ต้น ($P < 0.05$) ในส่วนของน้ำหนักแห้งของรากพบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม โดยการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ดังกล่าว มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งของราก อยู่ในช่วง 0.87 - 4 กรัม/ต้น (ตารางที่ 6) จากงานทดลองในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต IAA คือ *Pseudomonas alcaligenes* (PsA15), *Bacillus polymyxa* (BcP26) และ *M. phlei* (MbP18) สามารถส่งผลให้น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินของข้าวโพดเพิ่มขึ้น 17-30 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักแห้งของรากเพิ่มขึ้น 19-52 เปอร์เซ็นต์ ในดิน Calcisol เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Egamberdiyeva, 2007) รวมทั้งการเติม *Bacillus aquimaris* DY-3 ให้กับต้นกล้าข้าวโพดที่เจริญในสารละลายฮอกแลนด์ ที่มี NaCl 1% ทำให้ข้าวโพดมีน้ำหนักแห้ง ปริมาณโพรลีน น้ำตาลที่ละลายได้ และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมีปริมาณโซเดียมไอออนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระลดลง (Li and Jiang, 2017)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ด้วยแหล่งอาหารแตกต่าง 4 ชนิด พบว่า แหล่งคาร์บอนจากรำข้าวและปลายข้าวเป็นแหล่งอาหารที่ดีที่สุด ให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 สูงสุด อีกทั้งแหล่งอาหารเสริมรำข้าวยังช่วยยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. microporus* นอกจากนี้แหล่งอาหารเสริมรำข้าวทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มขึ้น และการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณเซลล์ เพื่อเป็นเชื้อส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพาราในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือน ทำให้การงอกของราก ความสูงส่วนเหนือดิน จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น ดังนั้นควรพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microporus* โดยใช้รำข้าวเป็นแหล่งอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* และเป็นส่วนผสมในชีวภัณฑ์ จึงเป็นแนวทางที่ควรศึกษาต่อไปเพื่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิตเหลือใช้ทางการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

- กมลชนก ห่วงมี, พิษณุพันธ์ กังแฮ, วันวิสาข์ ปั่นศักดิ์ และวิภา หอมหวาน. 2562. ความสามารถของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ในห้องปฏิบัติการ. วารสารดินและปุ๋ย 41(1): 48-58.
- จักรพงษ์ กางโสภา, เพชรรัตน์ จีเพชร และสุริมาศ จันตะอินทร์. 2564. การไพร้อมเมล็ดด้วย *Bacillus subtilis* ต่อความงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม. วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 13(2) : 393-407.
- จันทร์แรม รูปขำ, สาวิตร ตระกูลนำเลื่อมใส, ธนภูมิ มณีบุญ และศิริวัลย์ สร้อยกล่อม. 2560. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ของ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินต่าง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. (184-191). สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2559. ไตรโคเดอร์มา. เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช. นครปฐม: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิระเดช แจ่มสว่าง, วรณวิไล อินทนู และ วิราพร ชีวะพานิช. 2559. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการลดโรครากเน่าของผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 47(3): 363 – 374.
- ธนากร แสงสง่า. 2557. พีจีพีอาร์: บทบาทในการส่งเสริมและป้องกันพืชภายใต้สภาวะเครียด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(4): 553-570.
- ธิดา ไชวังศรี. 2557. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากอาหารหมักดอง. วารสารนเรศวรพะเยา. 7: 29-41.
- นริศรา จำปา, ธงชัย มาลา, ศุภชัย อำคา และกนกกร สีนมา. 2560. ผลของปุ๋ยไนโตรเจนละลายช้าร่วมกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งการเกิดโรคทางดินในกล้ามะเขือเทศ. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 20: 90-101.
- นิภาพรรณ อุ้นตะ. 2554. การทดสอบการละลายฟอสเฟตของเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ดินสกุลว่านจุงนาง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรีภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 23 หน้า

- นฤมล มีบุญ และอทิพันธ์ เสียมไหม. 2562. คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* AS6 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 11(1) : 67-83.
- นฤมล เอกวัฒน์ชัย และ สุดาทิพย์ จันทร. 2562. ผลของสภาวะการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวอินทรีย์ จ.กาญจนบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 24(2): 768-781.
- ปฎิมาพร ปลอดภัย, เสมอใจ ชื่นจิตต์ และวสันต์ เพชรรัตน์. 2551. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร 39: 185-188.
- พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคใบจุด. หน้า 93-94. ใน: คู่มือโรคผัก. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- ภูวดล วิริยะพันธ์. 2549. การปลูกยางพารา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : เกษตรสยามบุ๊คส์.
- ภาวนา พนมเขต, สุรศักดิ์ แวนรัมย์, และธัญญการย์ ศรีวรมาศ. 2554. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของส่วนสกัดของพืชไทยต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด, 23(2), 151-158.
- ยงยุทธ โอสดสภา, อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์ และชวลิต ฮงประยูร. 2551. ปุ๋ยเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วันเพ็ญ วิริยะกิจนทีกุล. 2559. ศักยภาพของดินทรายในการปลูกยางพาราในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน: กรมพัฒนาที่ดิน.
- ศิริลักษณ์ จิตรอักษร และจิตรา เกาะแก้ว. 2564. การพัฒนาสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม. กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.
- สายทอง แก้วฉาย. 2556. ศึกษาแบบการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดโรครากขาวของยางพารา. รายงานงานวิจัยทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา.
- อุไร จันทรประทีน. 2548. โรคแมลงศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ชุมนุม สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอิตตะ, สุภนิดา บัวบาน, ประภัสสร รักถาวร และณิชากรม-เจริญกุล. 2549. การสกัดแยกสารและน้ำมันหอมระเหยจากพืชชั้นพื้นฐาน. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร.
- อนุสรรา จันทรแสง และสุพจน์ กาเข็ม. 2561. กลไกที่หลากหลายของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่

จากดินบริเวณรากข้าวต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว.
วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 36(2): 33-42.

อารมณฺ์ โรจน์สุจิตฺร. 2541. โรครากขาว (*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki) ของยางพารา
และแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกชัย พลฤกษ์อำไพ. 2547. คู่มือยางพารา. กรุงเทพฯ : เพ็ท-แพลน พับลิชชิง โรงพิมพ์เทพพิทักษ์
ศิริลักษณ์ จิตรอักษร และจิตรา เกาะแก้ว. 2564. การพัฒนาสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับการตรวจนับ
จำนวนแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม. กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.

Abarike, E.D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J., Jun, L. and Kuebutornye,
F.K.A. 2018. Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and
Bacillus licheniformis on growth, immune response and disease resistance
in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology Journal, 82,
229-238.

Abdelmoteleb, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T. and González-Mendoza, D. 2017.
Antifungal activity of autochthonous *Bacillus subtilis* isolated from *Prosopis*
juliflora against phytopathogenic fungi. Mycobiology 45: 385–391.

Agostini, E.C.D., Mantovani, T.R.D., Valle, J.S.D., Meirelles, L.D.P., Colauto, N.B. and Linde,
G.A. 2011. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from
basidiomycetes in solid substrate cultivation. Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)
68: 295-300.

Akhtar, N.I., Arshad, M.A., Shakir, M.A., Qureshi, J. and Sehrish, A.L. 2013. Co-inoculation
with *Rhizobium* and *Bacillus* sp. to improve the phosphorus availability and yield
of wheat (*Triticum aestivum*L.). Journal of Animal and Plant Sciences 23: 190-197.

Aktuganov, G., Galimzyanova, N., Melent'ev, A. and Kuz'mina, L. 2007. Extracellular
hydrolases of strain *Bacillus* sp. 739 and their involvement in the lysis of
micromycete cell walls. Microbiology 76: 413-420.

Amaresan, N., V. Jayakumar, K. Kumar and N. Thajuddin. 2012. Isolation and
characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect

- on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Annals of Microbiology* 62:805-810.
- Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D. and Brancato, A. 2021. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus amyloliquefaciens* strain QST 713 (formerly *Bacillus subtilis* strain QST 713). *European Food Safety Authority Journal*. 19(1): 6381.
- Archana, D.S., Nandish, M.S., Savalagi, V.P. and Alagawadi, A.R. 2013. Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. *Bioinfolet*. 10: 248-257.
- Ashlee, M., Losick, E.R. and Kolter, R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. 16: 269-275.
- Ashwini, N. and Srividya, S. 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *Biotechnology* 4: 127–136.
- Azokpota, P., Hounhouigan, D.J., Annan, N.T., Nago, M.C. and Jakobsen, M. 2008. Diversity of volatile compounds of afitin, iru and sonru three fermented food condiments from benin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 879-885.
- Bal, H.B., Das, S., Dangar, T.K. and Adhya, T.K. 2013. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of Basic Microbiology* 6 (4): 42-50.
- Basha S. and Ulaganathan K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science* 82: 1457-1463.
- Bardas G. A., Lagopodi A. L., Kadoglidou K. and Tzavella-Klonari K. 2009. Biological control of three *Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Biological Control* 49: 139-145.
- Benitez L. B., Velho R. V., Lisboa M. P., Da Costa Medina L. F. and Brandelli A. 2010. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *The Journal of Microbiology* 48: 791-797.

- Bewley, J.D. and Black, M. 1982. Physiology and Biochemistry of Seed in Relation to Germination. Vol. II. Dormancy and Environmental Control, Springer-Verlay, New York.
- Bhandari, S., M. Sajwan and N.S. Bisht. 2009. Physiological effect of auxins on growth characteristics and productive potential of *Verbascum thapsus* - a medicinal plant. *Researcher* 1(5): 47-51.
- Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.F.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 343-350.
- Brady, N.C. and Weil, R.R. 2002. The Nature and Properties of soils. New Jersey: Prentice Hall.
- Bubici, G., M. Kaushal, I.M. Prigigallo, L.G.C. Cabanas and M.J. Blanco. 2019. Biological control agents against *fusarium wilt* of banana. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1-33.
- Caldeira A. T., Feio S. S., Arteiro J. M. S. and Roseiro J. C. 2006. Antimicrobial activity of steady-state cultures of *Bacillus* sp. CCMI 1051 against wood contaminant fungi. *Biochemical Engineering Journal* 30: 231-236.
- Calvo H., Marco P., Blanco D., Oria R. and Venturini M. E. 2017. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology* 63: 101-110.
- Chen, Y., Chen, Y., Wu, J., and Zhang, J. 2018. The effect of biotic and abiotic environmental factors on Pd (II) adsorption and reduction by *Bacillus wiedmannii* MSM. *Ecotoxicology and Environmental Safety Journal*, 162, 546-553.
- Chumthong, A., Wiwattanapatapee, R., Viernstein, H., Pengnoo A. and Kanjanamaneesathian, M. 2016. Spray-dried powder of *Bacillus megaterium* for control of rice sheath blight disease: formulation protocol and efficacy testing in laboratory and greenhouse. *Cereal Research Communications*. 44(1): 131-140.
- Da, C., Xin, L., Chunyu, L., Wei, T., Qirong S. and Biao S. 2014. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacteria wilt. *Journal of Environmental Management* 137: 120-127.

- Datta, M., Palit, R., Sengupta, C., Pandit M.K. and Banerjee, S. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annuum* L.) under field conditions. *Australian Journal of Crop Science* 5(5): 531-536.
- Davies K. G. 2009. Understanding the interaction between an obligate hyperparasitic bacterium, *Pasteuria penetrans* and its obligate plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne* spp. *Advances in parasitology* 68: 211-245.
- Daou, C. and Zhang, H. 2012. Effect of high pressure, autoclaving and extrusion treatments on insoluble, soluble and total dietary fiber contents of defatted rice bran. *Academic Food Journal* 10: 6-13.
- Demirci, T., Aktaş, K., Sozeri, D., Ozturk, H.I. and Akin, N. 2017. Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. *Journal of Functional Foods* 36: 396-403.
- Demissie, Y., Humblot, C., Baxter, B., Nealon, N.J. and Ryan, E. 2020. Probiotic fermentation of rice bran with six genetically diverse strains effects nutrient and phytochemical composition; a non-targeted metabolomics approach. *Current Developments in Nutrition* 4: 1553. https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa062_010
- Djaenuddin, N., Suriani S. and Muis, A. 2020. Effectiveness of *Bacillus subtilis* TM4 biopesticide formulation as biocontrol agent against maydis leaf blight disease on corn. *Earth and Environmental Science*. 484: 1-10.
- Ei, M.M., Binghua, L., Jinjin, M., Liming, S., Mingguo, J., Kecheng, Z., and Beibei G. 2019. Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control* 134: 23-31.
- Elsayed, A. E., Othman, N. Z., Malek, R., Tang, T. and Enshasy, H. A. 2014. Improvement of cell mass production of *Lactobacillus delbrueckii* sp. bulgaricus WICC-B-02: a newly isolated probiotic strain from mother's milk. *JAPS*. 4(11): 8-14.
- Elsharkawy, M.M., Nakatani, M., Nishimura, M. and Arakawa, T. 2015. Control of tomato bacterial wilt and root-knot diseases by *Bacillus thuringiensis* CR-371 and *Streptomyces avermectinius* NBRC14893. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section - Soil and Plant Science*. 65(6): 1-6.

- El-Hassan, S.A. and Gowen, S.R. 2006. Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. lentis. *Journal Phytopathol* 154: 148-155.
- Egamberdiyeva, D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36(2-3): 184-189
- Etesami, H., Alikhani, H.A. and Hosseini, H.M. 2015. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX* 2: 72-78.
- Figueredo M. S., Tonelli M. L., Ibanez F., Morla F., Cerioni G., Del Carmen Tordable M. and Fabra A. 2017. Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6 144. *Microbiological research* 197: 65-73.
- Fink, P. 2007. Ecological functions of volatile organic compounds in aquatic systems. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 40(3): 155-168.
- Frank, S.A. 2010. The trade-off between rate and yield in the design of microbial metabolism. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 609-613.
- Gajera H. P., Savaliya D. D., Hirapara D. G., Patel S. V. and Golakiya B. A. 2016. Biocontrol mechanism of *Bacillus* for *Fusarium Wilt* management in cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices*, (Kumar P, Gupta VK, Tiwari AK and Kamle M, eds.), p. 29-47. Springer International Publishing, Cham
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119(3): 329-339.
- Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: 1-15.

- Ghevariya, K.K. and P.B. Desai. 2014. Rhizobacteria of sugarcane: In vitro screening for their plant growth promoting potentials. *Res. J. Recent. Sci.* 3: 52-58.
- Heck, J.X., Soares, L.H.D.B. and Ayub, M.A.Z. 2005. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, 37(4), 417-423.
- Hirpara D. G., Gajera H. P., Bhimani R. D. and Golakiya B. A. 2016. The SRAP based molecular diversity related to antifungal and antioxidant bioactive constituents for biocontrol potentials of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Scc. *Current Genetics* 62: 619-641.
- Ho, H.L. 2015. Xylanase production by *Bacillus subtilis* using carbon source of inexpensive agricultural wastes in two different approaches of submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SsF). *Journal of Food Processing and Technology* 6(4): 1-9.
- Hood, A.I. 2006. The mycology of the basidiomycetes. Proceeding of Heart Rot and Root Rot in Tropical Acacia Plantation, Yogyakarta, Indonesia. 7–9 February 2006, pp. 34-59.
- Huang X. Q., Zhang N., Yong X. Y., Yang X. M. and Shen Q. R. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQRN43. *Microbiological research* 167: 135-143.
- Jamal Q., Cho J. Y., Moon J. H. and Kim K. Y. 2017. Purification and antifungal characterization of cyclo (d-Pro-l-Val) from *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against *Fusarium graminearum* to control head blight in wheat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 10: 141-147.
- Kalayu, G. 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*. 2019: 7. [Online]. Available <https://doi.org/10.1155/2019/4917256> (25 October 2020).
- Kaewchai, S. and Soyong, K. 2010. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 6: 349-363.

- Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V. and Thongchul, N. 2013. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36(10): 1463-1474.
- Kangsopa, J., Hynes, R.K. and Siri, B. 2018. Effects of seed treatment with plant growth promoting bacteria on germination and growth of lettuce. *Journal of Agriculture* 34(3): 385-397. (in Thai)
- Kaur, G., and Reddy, M. S. 2015. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere* 25: 428-437.
- Khan, A., Shah, S.N.M., Rab, A., Sajid, M., Ahmed, A. K. Ali. and Faisal, S. 2014. Influence of nitrogen and potassium levels on growth and yield of chillies (*Capsium annuum* L.). *International Journal of Farming and Allied Sciences* 3(3): 260-264.
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T.A., Maymon, M., Humm, E.A., Nejat, N., Sanders, E.R., Kaplan, D. and Hirsch, A.M. 2018. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology* 9: 1-12.
- Khedherab, S.B., Trabelsib, B.M. and Tounsia, S. 2021. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium wilt* and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control* 152: 104444. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104444>
- Kim P. I., Ryu J., Kim Y. H. and Chi Y. T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 138-145.
- Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G. and Hain, R. 2004. FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 100: 72-193.

- Kim, J.K., Mulrooney, S.B. and Hausinger, R.P. 2005. Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins. *Journal of Bacteriology* 187: 7150-7154.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M. and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94:1259-1266
- Kolsi, I.Z., Mahmoud, A.B., Ali, H., Sellami, S., Nasfi, Z., Tounsi, S. and Jamoussi, K. 2016. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). *Microbiological Research*. 192: 148-158.
- Kotze, A.C., Grady, J.O., Pearson, R. and Gough, J.M. 2005. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*. 35(9): 1013-22.
- Kumar, A.P., Janardhan, A., Viswanath, B., Monika, K., Jung, J-Y. and Narasimha, G. 2016. Evaluation of orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. *Journal of Biotechnology* 6 (43): 1-10.
- Kundu, B.S. and Gaur, A.C. 1980. Establishment of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant and Soil* 57(2-3): 223-230.
- Law, L. 2009. *Hevea brasiliensis*, the rubber tree. Available: <http://www.ethnoleaflets.com//leaflets/rubber2.htm> [27 June 2561]
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P. and Chuenchitt, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 48: 113-121.
- Li J., Yang Q., Zhao L. H., Zhang S. M., Wang Y. X. and Zhao X. Y. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 10: 264-272.

- Lugtenberg B. and Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual review of microbiology 63: 541-556.
- Lavakush, Yadav, J., Verma, J.P., Jaiswal, D.K. and Kumar, A. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). Ecol. Eng. 62: 123-128.
- Lakshminarayana, K., Narula, N., Hooda, I.S. and Faroda, A.S. 1992. Nitrogen economy in wheat (*Triticum aestivum*) through use of *Azotobacter chroococcum*. Indian Journal of Agricultural Sciences 62(1): 75-76.
- Ingle, K.P. and D.A. Padole. 2017. Phosphate solubilizing microbes: an overview. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6(1): 844-852.
- Mantovani, T.R.D., Linde, G.A. and Colauto, N.B. 2007. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. Canadian Journal of Microbiology. 53: 139-143.
- 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*. Ecology and Epidermiology. 76: 136-139.
- Mead, D.J. 2001. Forest plantation thematic papers. Rome: Forestry Department.
- Mhatre, E., Troszok, A., Monterrosa, R.G., Lindsteadt, S., Holscher, T., Kuipers, O.P. and Kovacs Á.T. 2016. The impact of manganese on biofilm development of *Bacillus subtilis*. Microbiology 162: 1468-1478.
- Mohamad, S.N., Ramanan, R.N., Mohamad, R. and Ariff, A.B. 2011. Improved mannandegrading enzymes' production by *Aspergillus niger* through medium optimization, N. Biotechnol. 28: 146-152.
- Mohamed, H.I. and Gomaa, E.Z. 2012. Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. Photosynthetica 50(2): 263-272.
- Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 13(3): 638-649.

- Mondol, M.A.M., Shin, H.J. and Islam, M.T. 2013. Diversity of Secondary Metabolites from Marine *Bacillus* Species: Chemistry and Biological Activity. *Journals of Marine Drugs* 11: 2846-2872.
- Moon, S.H. and Chang, H.C. 2021. Rice bran fermentation using *Lactiplantibacillus plantarum* EM as a starter and the potential of the fermented rice bran as a functional food. *Foods* 10: 978. <https://doi.org/10.3390/foods10050978>
- Moita C., Feio S. S., Nunes L., Curto M. J. M. and Roseiro J. C. 2005. Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55: 261-269.
- Nell, M., Voetsch, M., Vierheilig, H., Steinkellner, S., ZitterlEglseer, K., Franz, C., and Novak, J. 2009. Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(6): 1090-1096.
- Nandris, D., Nocole, M. and Geiger, J.P. 1987. Root rot disease of rubber tree. *Plant Disease. The American Phytopathological Society*. 71(4): 298-306.
- Omorusi, I.V., Eguavoen, O.I., Ogbemor, N.O., Bosah, B.O., Orumwense, K. and Ijie, K. 2014. Control of white root rot disease in rubber plantations in Nigeria. *International Journal of Microbiology and Immunology Research* 3: 046-051.
- Ongena M. and Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16: 115-125.
- Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J. and Dowling, D.N. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontier in Microbiology* 6(2015): 745.
- Pal, K., and Gardener, B.M. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*: DOI 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Patel, K. and Prajapati, K. 2014. Xylanase production by *Cladosporium* sp. from agricultural waste. *International Journal of Current Research and Academic Review* 2(12): 84-90.

- Parker, E.J. 2000. Signalling in plant disease resistance. In *Molecular Plant Pathology* (ed. M. Dickinson and J. Beynon). pp. 198-217. Sheffield Academic Press: Sheffield, U.K.
- Palupi, T., S. Ilyas, M. Machmud, and E. Widajati. 2017. Effect of seed coating with biological agents on seed quality of rice. *Biodiversitas*. 18(2): 727-732.
- Peighamya-Ashnaei, S., Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M. and Behboudi, K. 2007. Effect of carbon and nitrogen sources on growth and biological efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 72: 951-956.
- Pengnoo, A., Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A. and Kanjanamaneesathian, M. 2006. Bacterial antagonist as seed treatment to control leaf blight disease of bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(1): 9-14.
- Pradhan, N. and Sukla, L.B. 2005. Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*,5, 850–854.
- Rabbee, M.F., Ali, M.S., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C. and Baek, K. 2019. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules with in plant microbiomes. *Molecules*. 24(6): 1046-1059.
- Rahman, M.M.E., Hossain, D.M., Suzuki, K., Shiiya, A., Dey, T.K., Nonaka, M. and Harada, N. 2016. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. *Australasian Plant Pathology* 45: 103–117.
- Raja, A., Kumar, S., Singh, S.K. and Prakash, J. 2018. Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Journal*, 15, 199-209.
- Rakshit, A., Sunita, K., Pal, S., Singh, A. and Singh, H.B. 2015. Bio-priming mediated nutrient use efficiency of crop species, pp. 181-191. In Rakshit, A., Singh, H.B. and

- Sen, A., eds. Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances. Springer, New Delhi.
- Rocha, M.V.P., Barreto, R.V.G., Melo, V.M. and Goncalves, L.R.B. 2009. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. Applied Biochemistry and Biotechnology, 155(1), 366-378.
- Satyaprakash, M., T. Nikitha, E.U.B. Reddi, B. Sadhana and S.S. Vani. 2017. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria and their role in plant nutrition. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6(4): 2133-2144.
- Sharma, S.B., R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi and T.A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer plus 2 : 587. [Online]. Available <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-587> (25 October 2020).
- Salomon, M. V., Funes Pinter, I., Piccoli, P. and Bottiini, R. 2017. Use of plant growth-promoting rhizobacteria as biocontrol agents: induced systemic resistance against biotic stress in plants. Microbial Application Volume2: Biomedicine, Agriculture and Industry, Springer International Publishing, Cham. Vol. 2 pp: 133-152.
- Schaechter, M. 2006. From growth physiology to system biology. International Microbiology 9: 157–161.
- Shahab, S., Ahmed, N. and Khan, N. S. 2009. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. African Journal of Agriculture Research 4(11): 1312-1316.
- Sheng, X.F., J.J. Xia and J. Chen. 2003. Mutagenesis of the *Bacillus edaphicus* strain NBT and its effect on growth of chili and cotton. Agri. Sci. in China. 2: 40-1.
- Sheng, X.F. and L.Y. He. 2006. Solubilization of potassium bearing minerals by a wild type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Can. J. Microbiol. 52(1): 66-72.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. Journal Bioscience and Bioengineering 89: 515-521.

- Shrivastava A., Tadepalli K., Goel G., Gupta K. and Kumar Gupta P. 2017. Melanized fungus as an epidural abscess: a diagnostic and therapeutic challenge. *Medical Mycology Case Reports* 16: 20-24.
- Shrivastava, U.P. and Kumar, A. 2011. A Simple and Rapid Plate Assay for the Screening of Indole-3-acetic Acid (IAA) Producing Microorganisms. *Int. J. Appl. Biol. Pharma. Technol*, 2, 120-123.
- Siddiqui, M.A.H., Biswas, M., Faruk, M.O., Roy, M., Asaduzzaman, A.K.M., Sharma, S.C.D., Biswas, T. and Roy, N. 2016. Optimization, isolation and characterization of cellulase-free thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. *American Journal of Life Sciences*, 4(4), 93-98.
- Singh, G., Sharma, J.R. and Hoondal, G.S. 2008. Chitinase production by *Serratia marcescens* GG5. *Turkish Journal of Biology*. 32: 231-236.
- Singh K., Ihlenfeld C., Oates C., Plant J. and Voulvoulis N. 2011. Developing a screening method for the evaluation of environmental and human health risks of synthetic chemicals in the mining industry. *International Journal of Mineral Processing* 101: 1-20.
- Singh, V., Upadhyay, R.S., Sarma, B.K. and Singh, H.B. 2016. Seed bio-priming with *Trichoderma asperellum* effectively modulate plant growth promotion in pea. *International Journal of Agriculture Environment & Biotechnology* 9: 361-365.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(4): 1-13. a001438.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol*. 56(4): 845-857.
- Styriakova, I., Styriak, I., Hradil, D. and Bezdicka, P. 2003. The release of iron bearing minerals and dissolution of feldspar by heterotrophic bacteria of *Bacillus* species. *Ceramic-Silicaty*. 47(1): 20-26.

- Sumi, C.D, Yang, B.W, Yeo, I.C. and Hahm, Y.T. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*. 61(2): 93-103.
- Taechapoempol, K., Sreethawong, T., Rangsunvigit, P., Namprohm, W., Thamprajamchit, B., Rengpipat, S. and Chavadej, S. 2011. Cellulase-producing bacteria from thai higher termites, *Microcerotermes* sp: Enzymatic activities and Ionic liquid tolerance. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 164: 204–219.
- Tian, Y., Fan, Y., Liu, J., Zhao, X. and Chen, W. 2016. Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electronic Journal of Biotechnology* 19: 41-49.
- Thomma, K. and Sirithorn, P. 2012. Effect of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* B006 as seed coating for control of *Botryosphaeria rhodina*, cause of gummosis disease. *Khon Kaen Agriculture Journal* 40(1): 53-60. (in Thai)
- Torres M. J., Perez Brandan C., Sabate D. C., Petroselli G., Erra-Balsells R. and Audisio M. C. 2017. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control* 105: 93-99.
- Turan, M., Ataoglu, N. and Sahin, F. 2005. Evaluation the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. *Journal of Sustainable Agriculture* 28(3): 99-108.
- Utami, D.R., Sutrisno, A. and Kusnadi, J. 2016. Isolation, purification and characterization of mannanase from *Bacillus subtilis* MAN-511. *International Journal of Science Technology & Engineering*, 2(11), 83-87.
- Vacheron, J., Debrosses, G., Bouffaud, M-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dye, F. and Prgent-Combaret, C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci*, 4:356-375.
- Vespermann, A., Kai, M. and Piechulla, B. 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and arabidopsis thaliana. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(17): 5639-5641.

- Vikram, A. and Hamzeharghani, H. 2008. Effect of Phosphate solubilizing bacteria on nodulation and growth parameters of greengram (*Vigna Radiata* L. wilezek.). Research Journal of Microbiology 3: 62-72.
- Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A and Kanjanamaneesathian, M. 2013. Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium* – alginate microcapsules for control of rice sheath blight. World Journal Microbiology and Biotechnology 29: 1487-1497.
- Zhao, M., Yuan, J., Zhang, R., Dong, M., Deng, X., Zhu, C., Li, R. and Shen, Q. 2018. Microflora that harbors the NRPS gene are responsible for *Fusarium wilt* disease-suppressive soil. Applied Soil Ecology. 132: 83-90.
- Zhao P., Quan, C., Wang, Y., Wang, J. and Fan, S. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. Spinaciae. Journal Basic Microbiology. 54: 448–456.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร nutrient agar (NA)

peptone	5 กรัม
beef extract	3 กรัม
วุ้น	17 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

2. สูตรอาหาร potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
วุ้น	17 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

3. สูตรอาหาร potato dextrose broth (PDB)

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

4. สูตรอาหาร PDA เสริมรำข้าวและปลายข้าว

นำรำข้าวและปลายข้าวของพันธุ์ข้าวหอมมะลิ ตามสัดส่วนในตารางภาคผนวกที่ 1 มาเตรียมเป็นอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เสริมรำข้าว และปลายข้าว โดยต้มรำข้าวและปลายข้าวในน้ำกลั่นจนเดือด โดยที่ให้รำข้าวและปลายข้าวสุกแต่ไม่เละ จากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนใส นำมาเติมตามสัดส่วนของสูตรมาตรฐานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรอาหารเสริมรำข้าวและปลายข้าว

สูตรอาหาร	สัดส่วนของแหล่งอาหารต่อ 1 ลิตร (กรัม)
PDA เสริมรำข้าว	
รำข้าว 1%	100
รำข้าว 3%	300
PDA เสริมปลายข้าว	
ปลายข้าว 3%	300
ปลายข้าว 5%	500

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหารเสริมคาร์บอน

Concentration (%)	Number of viable <i>B. subtilis</i> (log CFU/mL)	
	SM1	LPDD3-2
Control 0	10.91	10.95
รำข้าว 1	12.11	12.09
รำข้าว 3	12.15	12.15
ปลายข้าว 3	12.03	12.07
ปลายข้าว 5	12.16	12.12

ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหารเสริมไนโตรเจน

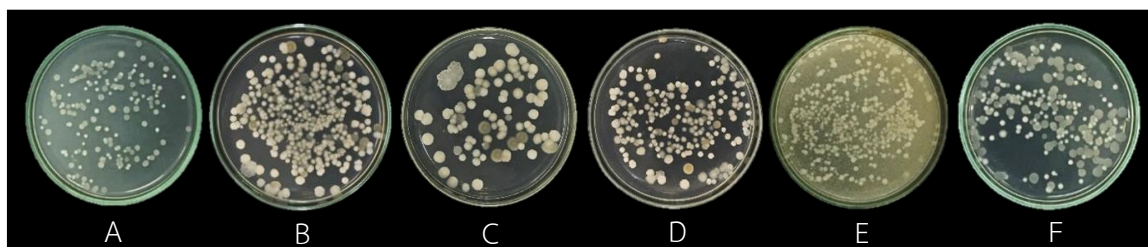
Concentration (g N/L)	Number of viable <i>B. subtilis</i> (log CFU/mL)	
	SM1	LPDD3-2
Control 0	10.91	10.95
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5	11.35	11.30
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1	11.34	11.32
(NH ₄) ₂ SO ₄ 2	11.37	11.36
(NH ₄) ₂ SO ₄ 3	11.27	11.26
NH ₄ NO ₃ 0.5	11.24	11.22
NH ₄ NO ₃ 1	11.25	11.18
NH ₄ NO ₃ 2	11.17	11.18
NH ₄ NO ₃ 3	11.23	11.19

ตารางภาคผนวกที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหารเสริมฟอสฟอรัส

Concentration (mg P/L)		Number of viable <i>B. subtilis</i> (log CFU/mL)	
		SM1	LPDD3-2
Control	0	10.91	10.95
KH ₂ PO ₄	5	11.40	11.38
KH ₂ PO ₄	15	11.28	11.27
KH ₂ PO ₄	25	11.31	11.34
KH ₂ PO ₄	35	11.34	11.33
K ₂ HPO ₄	5	11.37	11.21
K ₂ HPO ₄	15	11.26	11.20
K ₂ HPO ₄	25	11.24	11.20
K ₂ HPO ₄	35	11.17	11.21

ตารางภาคผนวกที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนแหล่งอาหารเสริมโพแทสเซียม

Concentration (mg P/L)		Number of viable <i>B. subtilis</i> (log CFU/mL)	
		SM1	LPDD3-2
Control	0	10.91	10.95
KNO ₃	20	11.27	11.30
KNO ₃	40	11.36	11.34
KNO ₃	60	11.33	11.30
KNO ₃	80	11.34	11.34
K ₂ SO ₄	20	11.17	11.19
K ₂ SO ₄	40	11.12	11.11
K ₂ SO ₄	60	11.09	11.12
K ₂ SO ₄	80	11.10	11.09



ภาพภาคผนวกที่ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 บนอาหาร PDA เสริมแหล่งอาหารต่างชนิด (A) ชุดควบคุม (B) แหล่งไนโตรเจน (C) แหล่งฟอสฟอรัส (D) แหล่งโพแทสเซียม (E) แหล่งคาร์บอนจากรำข้าว และ (F) แหล่งคาร์บอนจากปลายข้าว

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวนพมาศ มณีนิล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6010620023

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2558

ทุนการศึกษา

1. ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
2. ทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

การตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงาน

นพมาศ มณีนิล และอัจฉรา เพ็งหนู. 2565. ผลของรำข้าวและปลายข้าวต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 9(2): 51-58.