วารสารผลิตกรรมการเกษตร
JOURNAL OF AGRICULTURAL PRODUCTION
MJU

ผลของสารพาต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวในยางพารา

Effects of Carriers on Efficiency of Antagonistic Bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* on Inhibition of *Rigidoporus microporus* causing of White Root Disease in Para Rubber

พันธ์ทิพย์ จุลวรรณโณ[1,2,3] และ อัจฉรา เพ็งหนู[1,2,3*]
Puntip Jullawanno[1,2,3] and Ashara Pengnoo[1,2,3*]

[1] สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90110
[1] Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla 90110
[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900
[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900
[3] ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90110
[3] Natural Biological Control Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla 90110
[*] Corresponding author: ashara.p@psu.ac.th

(Received: 12 October 2021; Revised: 7 December 2021; Accepted: 9 March 2022)

Abstract

Rigidoporus microporus is a soil-borne fungus that causes white root rot disease of para rubber. Controlling disease using bio-agent is effective and safe for environment. In addition to antagonistic bacteria, carrier is a key component of bio-agent. Therefore, this research aimed to study the effect of carriers on efficacy of antagonistic bacteria *Bacillus subtilis* isolate SM1, LPDD3-2 and *Bacillus amyloliquefaciens* isolate PT7 for inhibition of

R. microporus. Seven carriers including bentonite, kaolin, lactose, modified starch, rice starch, cassava starch and corn starch were tested in completely randomized design (CRD) for 4 replications. The result showed that antagonistic bacteria on potato dextrose agar (PDA) containing bentonite showed the highest viability and different from other carriers (P≤ 0.01). Including, the antagonistic bacteria revealed enlarge size of colony in this medium. The mycelial growth of *R. microporus* on PDA containing bentonite was not statistically different from the control (PDA). *R. microporus* growth inhibition by *B. subtilis* isolate SM1 and LPDD3-2 on PDA containing bentonite was higher than other carriers using dual culture method and different from the control (PDA) (P≤ 0.01). The result indicated that carriers affected the growth and efficacy of antagonistic bacteria. The selection of the proper carrier is critical to the development of antagonistic bacteria bio-agent.
Keywords: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, Carrier, *Hevea brasiliensis*

บทคัดย่อ

Rigidoporus microporus เป็นเชื้อราในดินสาเหตุโรครากขาวของยางพารา การควบคุมโรคด้วยชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ มีประสิทธิผลและปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม นอกจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สารพา (carrier) นับเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญของชีวภัณฑ์ การวิจัยจึงศึกษาผลของสารพาต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ *Bacillus amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ทดสอบกับสารพาทั้งหมด 7 ชนิด คือ เบนโทไนท์ เคโอลิน แลคโตส แป้งดัดแปร แป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ ผลการวิจัยพบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์มีปริมาณสูงสุดในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมเบนโทไนท์และแตกต่างกับสารพาชนิดอื่น ๆ (P≤ 0.01) รวมทั้งมีขนาดโคโลนีใหญ่ขึ้น ขณะที่การเจริญของเส้นใย *R. microporus* ในอาหาร PDA ที่ผสมเบนโทไนท์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (PDA) การยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. microporus* ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 ด้วยวิธี dual culture ในอาหาร PDA ผสมเบนโทไนท์สูงกว่าสารพาชนิดอื่นและแตกต่างกับชุดควบคุม (PDA) (P≤ 0.01) แสดงให้เห็นว่าสารพามีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ การเลือกสารพาที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์
คำสำคัญ: *Bacillus subtilis Bacillus amyloliquefaciens* สารพา ยางพารา

คำนำ

Rigidoporus microporus เป็นเชื้อราในดินสาเหตุโรครากขาว เข้าทำลายระบบรากของยางพารา ปัจจุบันการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคมีหลากหลายวิธี แต่การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นวิธีการที่มีความปลอดภัย โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis B. megaterium B. thuringiensis* และ *B. amyloliquefaciens* สามารถควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด เช่น การควบคุมเชื้อรา *Bipolaris maydis* สาเหตุโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Djaenuddin *et al*., 2020) การควบคุมโรคเหี่ยวของกล้วย ที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *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 ซึ่งแบคทีเรียบาซิลลัสมีคุณสมบัติเด่นในการสร้างสารปฏิชีวนะ สร้างเอมไซม์ที่ช่วยย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา ผลิตสารระเหยที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรค (Nikaji, 2016) แต่การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นจำเป็นต้องใช้สารพา (carriers) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค โดยทั่วไปสารพามีลักษณะเป็นสารเฉื่อย และทำหน้าที่เป็นตัวพาเชื้อจุลินทรีย์ให้กระจายทั่วถึงพื้นที่เป้าหมายเมื่อนำไปใช้งาน ซึ่งสารพามีอนุภาคขนาดเล็ก บางชนิดสามารถละลายน้ำได้หมด ในส่วนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้หมด สามารถช่วยป้องกันเซลล์จุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และเป็นแหล่งของอาหารและพลังงานแก่จุลินทรีย์ (Carpin *et al*., 2017) โดยปริมาณของคาร์บอน หรือคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารพาที่แตกต่างกัน จะส่งผลทำให้การเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ไม่เท่ากัน จึงส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (Schisler *et al*., 2004) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. solani* เพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้ *B. megaterium* ร่วมกับสารพาแลคโตสโมโนไฮเดรต (lactose monohydrate) (Kanjanamaneesathian *et al*., 2007) และสารพาบางชนิด เช่น ทัลคัม (talcum), เบนโทไนท์ (bentonite) และเคโอลิน (kaolin) ยังช่วยในการกระจายตัวของเซลล์จุลินทรีย์ได้ดี (Ting *et al*., 2010) ขณะที่สารพาทัลคัมและเบนโทไนท์ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ *B. coagulans* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าซูการ์บีท โดยเฉพาะความยาวของรากเพิ่มขึ้น (Jorjani *et al*., 2011) และการใช้ชีวภัณฑ์ *B. firmus* ที่มีสารพาทัลคัมสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง และชีวภัณฑ์ไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของต้นกล้า และการงอกของเมล็ดถั่วหรั่ง ทั้งนี้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ยังคงมีชีวิตรอดมากกว่า 10^8 โคโลนีต่อกรัม หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี ที่อุณหภูมิห้อง (Pengnoo *et al*., 2006) นอกจากนี้สารพายังส่งผลให้อายุการเก็บรักษาของชีวภัณฑ์แตกต่างกัน จึงได้คัดเลือกสำหรับพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อยืดอายุของจุลินทรีย์ (Swami *et al*., 2017)

ดังนั้น งานทดลองจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารพาต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* และเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา อีกทั้งศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ผสมสารพาชนิดต่าง ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อราสาเหตุโรครากขาว

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 และเชื้อรา *R. microporus* ไอโซเลท NK6 ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ สำหรับการเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอนโดสปอร์ที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที และนำสารแขวนลอยเอนโดสปอร์แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อทำลาย vegetative cell ได้ปริมาณสารแขวนลอยเอนโดสปอร์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 เท่ากับ 4.6×10^{9}, 3.1×10^{9} และ 3.2×10^{5} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อรา *R. microporus* ทำการเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ผลของสารพาต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำสารพา 7 ชนิด ได้แก่ เบนโทไนท์ (bentonite) เคโอลิน (kaolin) แลคโตส (lactose) แป้งดัดแปร (modified starch) แป้งข้าวเจ้า (rice starch) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) และแป้งข้าวโพด (corn starch) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผสมในอาหาร PDA ให้มีความเข้มข้น 0.36 เปอร์เซ็นต์ แล้วเทอาหาร PDA แต่ละชนิดในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำสารแขวนลอยเอนโดสปอร์ที่เตรียมไว้ปริมาณ 0.30 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วกระจายเซลล์ของแบคทีเรียให้ทั่วผิวหน้าอาหาร โดยวิธี spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ตรวจสอบลักษณะการเจริญและนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลท เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PDA) ที่ไม่มีการผสมสารพา

ผลของสารพาต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากขาว

นำเชื้อรา *R. microporus* ที่เตรียมไว้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นวุ้น 0.5 เซนติเมตร วางบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA ผสมสารพาแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยการวัดรัศมีการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* คำนวณค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PDA) ที่ไม่มีการผสมสารพา

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรครากขาว โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA ที่ผสมสารพาชนิดต่าง ๆ

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธีการ dual culture บนอาหาร PDA ที่ผสมสารพาแต่ละชนิด โดยการ

วางชิ้นวุ้นเชื้อสาเหตุห่างจากขอบจานอาหาร 2 เซนติเมตร และขีดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตรงข้ามกับเชื้อรา *R. microporus* ให้ห่างจากขอบจานอาหาร 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยการวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* คำนวณค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PDA) ที่ไม่มีการผสมสารพา และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามวิธีของ Morton and Stroube (1955)

$$\text{Percentage inhibition (\%)} = 100 \times ((R1 - R2)/R1)$$

เมื่อ R1 = ความยาวของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = ความยาวของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการทดลองด้วยวิธีของ Duncan New's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลของสารพาต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens*

การเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 บนอาหาร PDA ผสมสารพาแต่ละชนิด ทำให้ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีขนาดใหญ่ขึ้น แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 1) จำนวนโคโลนีเดียวของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อผสมสารพาเบนโทไนท์ โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $5.9 \pm 2.3 \times 10^{10}$ และ $2.1 \pm 1.3 \times 10^{7}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 สามารถเจริญเติบโตบนอาหาร PDA ผสมสารพาเบนโทไนท์ เคโอลิน แลคโตส แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวโพด โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $8.6 \pm 1.3 \times 10^{9}$, $6.7 \pm 2.1 \times 10^{9}$, $8.6 \pm 2.1 \times 10^{9}$, $8.3 \pm 2.7 \times 10^{9}$ และ $8.1 \pm 2.0 \times 10^{9}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) กับชุดควบคุม และการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีแนวโน้มดีกว่าใน *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ส่วนในสารพาแป้งดัดแปร แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท เจริญเติบโตได้น้อยที่สุด (Table 1) ทั้งนี้การเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้รับพลังงานจากแหล่งคาร์บอน น้ำ และธาตุอาหารต่าง ๆ (Jacoby *et al*., 2017) พลังงานส่วนใหญ่ถูกใช้ในการสังเคราะห์ทางชีวภาพ อาศัยประสิทธิภาพของปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต มีการใช้พลังงานจากสารที่ได้จากการย่อยสลายในการสร้างสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้เกิดการสร้างส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ เซลล์จึงสามารถเจริญเติบโตได้ (Kohl *et al*., 2019) และแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับลักษณะของแหล่งกำเนิดคาร์บอน ความเข้มข้นของสารที่ได้รับ และประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Egli, 2015) โดยเฉพาะการใช้เบนโทไนท์ ช่วยยืดอายุจุลินทรีย์

(Rakian *et al*., 2018) เป็นแหล่งของพลังงานและอาหาร สามารถปกป้องเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วยคุณสมบัติที่ทึบแสงของเบนโทไนท์ (Ting *et al*., 2010) ทำให้การเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ขนาด และลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน โดยลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์มีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตนานกว่า (Figure 1)

Table 1 Growth of antagonistic bacteria on the PDA media containing various carriers

Carriers	Number of viable *Bacillus* spp. (cfu/ml)		
	B. subtilis (SM1)	*B. subtilis* (LPDD3-2)	*B. amyloliquefaciens* (PT7)
control PDA	$5.7 \pm 2.8 \times 10^{7}$ e	$9.7 \pm 2.4 \times 10^{7}$ c	$2.2 \pm 2.4 \times 10^{4}$ f
bentonite	$5.9 \pm 2.3 \times 10^{10}$ a	$8.6 \pm 1.3 \times 10^{9}$ a	$2.1 \pm 1.3 \times 10^{7}$ a
kaolin	$8.5 \pm 2.0 \times 10^{9}$ b	$6.7 \pm 2.1 \times 10^{9}$ a	$3.2 \pm 2.1 \times 10^{4}$ e
lactose	$5.5 \pm 2.1 \times 10^{9}$ c	$8.6 \pm 2.1 \times 10^{9}$ a	$1.7 \pm 1.0 \times 10^{6}$ c
modified starch	$5.7 \pm 1.5 \times 10^{7}$ e	$4.2 \pm 1.3 \times 10^{6}$ d	$4.2 \pm 1.2 \times 10^{3}$ g
rice starch	$8.9 \pm 2.3 \times 10^{9}$ b	$8.3 \pm 2.7 \times 10^{9}$ a	$3.3 \pm 2.1 \times 10^{6}$ b
cassava starch	$7.6 \pm 1.0 \times 10^{8}$ d	$7.6 \pm 1.0 \times 10^{8}$ b	$2.6 \pm 1.1 \times 10^{5}$ d
corn starch	$9.4 \pm 2.4 \times 10^{9}$ b	$8.1 \pm 2.0 \times 10^{9}$ a	$1.6 \pm 1.0 \times 10^{6}$ c
T-test	**	**	**
C.V. (%)	0.59	0.70	1.15

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different ** There is statistical different at P≤ 0.01 level by DMRT test

Figure 1 Growth of antagonistic bacteria, *Bacillus subtilis* (SM1) on the PDA media containing bentonite, lactose and rice starch compared to control

ผลของสารพาต่อการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

อาหาร PDA ที่ผสมสารพาแป้ง, แลคโตส และเบนโทไนท์ ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนสารพาแป้งดัดแปร และเคโอลิน มีผลให้เชื้อรา *R. microporus* เจริญเติบโตช้ากว่าปกติ โดยเจริญเติบโตช้าที่สุดในสารพาแป้งดัดแปร คือ 5.10 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P≤ 0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Table 2) นอกจากนี้มีรายงานว่าการใช้อัลจิเนต (alginate) และแป้งข้าวโพดไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา (Pereira and Roberts, 1991) ขณะที่การใช้แป้งมันสำปะหลัง ไม่ได้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราให้เพิ่มขึ้น รวมถึงการสร้างสปอร์ ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคในพืช (Kwoseh *et al*., 2012)

Table 2 Mycelial growth of *Rigidoporus microporus* on the PDA media containing various carriers

Carriers	Mycelium growth of *R. microporus* (cm.)
bentonite	6.90 ± 0.17 a
kaolin	6.23 ± 0.25 b
lactose	6.93 ± 0.12 a
modified starch	5.10 ± 0.10 c
rice starch	7.00 ± 0.00 a
cassava starch	7.00 ± 0.00 a
corn starch	7.00 ± 0.00 a
control (PDA)	7.00 ± 0.00 a
F-test	**
C.V. (%)	0.68

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different ** There is statistical different at P≤ 0.01 level by DMRT test

ผลของสารพาต่อประสิทธิภาพของ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท (*B. subtilis* ไอโซเลท SM1 LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดี โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA ที่ผสมสารเบนโทไนท์ โดยยับยั้งได้เท่ากับ 71.10 และ 69.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีบนอาหาร PDA ที่ผสมสารพาเบนโทไนท์, แป้งข้าวเจ้า, แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด โดยยับยั้งได้เท่ากับ 60.49 63.57 62.51 และ 63.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการใช้สารพาแป้งดัดแปร พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราน้อยที่สุด ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้แตกต่างทางสถิติอย่างมี

นัยสำคัญยิ่ง (P≤ 0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Table 3) โดยลักษณะของการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สังเกตได้จากแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญเติบโตได้ดีขึ้นในอาหาร PDA ที่ผสมสารพา ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร PDA อย่างเดียว ในขณะที่เส้นใยเชื้อราเจริญเติบโตได้น้อย (Figure 2) ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ และผลของสารพา เนื่องจากสารพาบางชนิดทำหน้าที่เพิ่มประสิทธิภาพ หรือช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ บางชนิดเป็นแหล่งของอาหาร และช่วยป้องกันเซลล์ของจุลินทรีย์ (Jayasudha *et al*., 2017) นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งสังเกตได้จากการทดสอบเมื่อผสมสารพากับอาหาร PDA มีผลให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงขึ้นทั้ง 3 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบในอาหาร PDA อย่างเดียว ขณะที่สารพาทั้ง 7 ชนิดไม่ส่งเสริมให้การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเกิดบริเวณยับยั้งดังกล่าว แบคทีเรียปฏิปักษ์มีการปลดปล่อยสารที่ละลายน้ำและแพร่ซึมเข้าไปในอาหาร โดยสารที่ปล่อยออกมา เช่น fengycin, iturin และsurfactin เป็นต้น ซึ่งมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อรา (Rangel, 2013) ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเข้าใกล้หรือไม่สามารถเจริญผ่านแบคทีเรียไปได้ ทำให้บริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราชุดทดสอบมีลักษณะผิดปกติ โดยเส้นใยเล็กลง และไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้ (Moore *et al*., 2003) ทั้งนี้เมื่อติดตามผลการทดลองหลังจากระยะเวลา 7 วัน เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ยังคงไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

Table 3 Percentage of *Rigidoporus microporus* mycelial inhibition by *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* antagonistic bacteria on the PDA media containing various carriers

Carriers	Percentage of *R. microporus* mycelium inhibition		
	B. subtilis (SM1)	*B. subtilis* (LPDD3-2)	*B. amyloliquefaciens* (PT7)
bentonite	71.10 ± 0.95 a	69.68 ± 0.57 a	60.49 ± 0.65 a
kaolin	54.33 ± 1.00 e	50.80 ± 0.49 d	47.31 ± 1.00 b
lactose	68.91 ± 0.65 b	64.79 ± 0.59 c	46.42 ± 0.53 b
modified starch	45.79 ± 0.68 f	43.14 ± 0.98 f	41.62 ± 0.73 c
rice starch	68.61 ± 1.00 b	65.77 ± 0.63 b	63.57 ± 0.69 a
cassava starch	68.76 ± 0.66 b	66.85 ± 0.56 b	62.51 ± 0.78 a
corn starch	67.23 ± 0.87 c	65.30 ± 0.38 b	63.41 ± 0.53 a
control PDA+*Bacillus* spp.	56.07 ± 0.41 d	46.43 ± 0.13 e	39.29 ± 0.21 d
control PDA	0.00	0.00	0.00
T-test	**	**	**
C.V. (%)	0.12	0.08	0.09

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different ** There is statistical different at P≤ 0.01 level by DMRT test

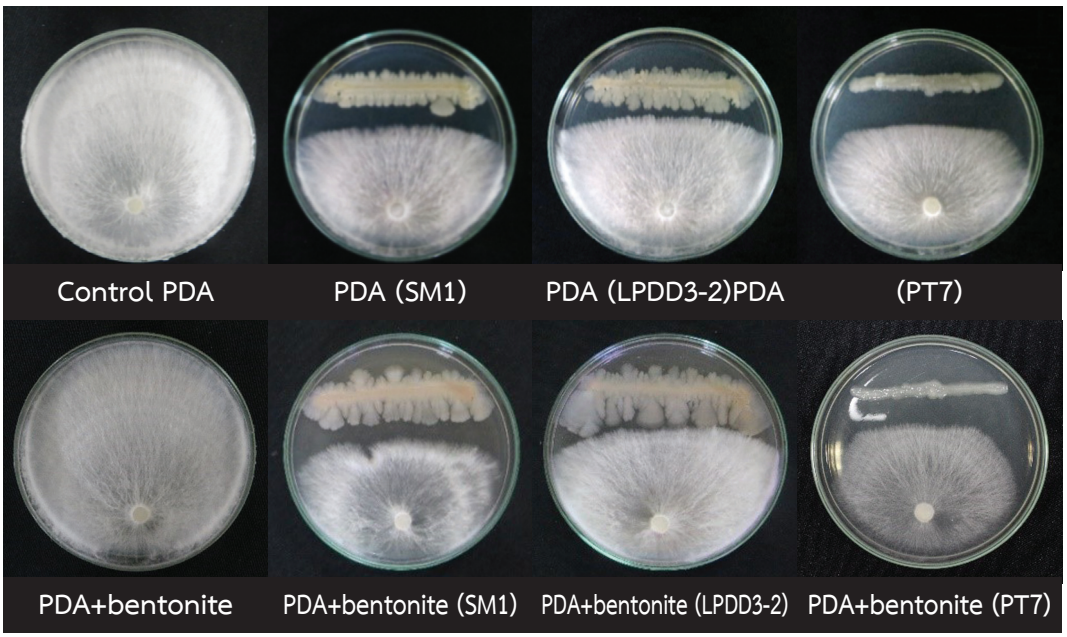

Figure 2 The efficacy of antagonistic bacteria for suppression the mycelial growth of *Rigidoporus microporus* on the PDA media containing bentonite at 7 days

สรุปผลการวิจัย

การใช้สารพาเบนโทไนท์ ส่งผลให้การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 สูงสุดและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีปริมาณเชื้อมากกว่าชุดควบคุม 10^2-10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และขนาดของโคโลนีใหญ่ขึ้น โดยเฉพาะ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในอาหาร PDA ผสมสารพาทุกชนิดไม่ต่างจากชุดควบคุม ยกเว้น เคโอลินและแป้งดัดแปร ขณะที่สารพาทุกชนิดโดยเฉพาะสารพาเบนโทไนท์ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยิ่ง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้น *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 บนอาหาร PDA ผสมเคโอลิน อย่างไรก็ตาม อาหาร PDA ผสมเบนโทไนท์ ทำให้ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราสูงสุดถึง 71.10 เปอร์เซ็นต์ การศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการการควบคุมโรครากขาวของยางพาราโดยชีววิธีร่วมกับการจัดการดิน ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และภาควิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Bubici, G., M. Kaushal, I.M. Prigigallo, LG.C. Cabanas and M.J. Blanco. 2019. Biological control agents against fusarium wilt of banana. Frontiers in Microbiology. 10: 1-33.

Carpin, M., H. Bertelsen, A. Dalberg, J.K. Bech, J. Risbo, P. Schuck and R. Jeantet. 2017. How does particle size influence caking in lactose powder. Food Engineering. 209: 61-67.

Chumthong, A., R. Wiwattanapatapee, H. Viernstein, A. Pengnoo and M. Kanjanamaneesathian. 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.

Djaenuddin, N., S. Suriani and A. Muis. 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.

Egli, T. 2015. Microbial growth and physiology: A call for better craftsmanship. Frontiers in Microbiology. 6: 1-12.

Huang, X., N. Zhang, X. Yong, X. Yang and Q. Shen. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. Microbiological Research. 167: 135-143.

Jacoby, R., M. Peukert, A. Succurro, A. Koprivova and S. Kopriva. 2017. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition-current knowledge and future directions. Frontiers in Plant Science. 8: 1-19.

Jayasudha, S.M., K.C. Kirankumar, E. Rajashekhara and D.Y. Rudresh. 2017. Evaluation of different carrier materials for development of bacterial bio-control agents formulations with enhanced shelf-life. Microbiology and Applied Sciences. 6(9): 1145-1153.

Jorjani, M., A. Heydari, R.H. Zamanizadeh, S. Rezaee and L. Naraghi. 2011. Development of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus coagulans* based bioformulations using organic and inorganic carriers and evaluation of their influence on growth parameters of sugar beet. Biopesticides. 4(2): 180-185.

Kanjanamaneesathian, M., R. Wiwattanapatapee, A. Pengnoo, K. Oungbho and A. Chumthong. 2007. Efficacy of novel formulations of *Bacillus megaterium* in suppressing sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani.* Plant Pathology Journal. 6(2): 195-201.

Kohl, J., R. Kolnaar and J.W. Ravensberg. 2019. Mode of action of microbial

biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science. 10: 1-19.

Kwoseh, C.K., A.M. Darko and K. Adubofour. 2012. Cassava starch-agar blend as alternative gelling agent for mycological culture media. Journal of Agriculture and Applied Sciences. 8(1): 8-15.

Moore, W.C., J. McKoy, R.D. Valle, D. Armstrong, M.E. Bernard, M. Katz and E.R. Gordon. 2003. Fungal cell wall septation and cytokinesis are inhibited by bleomycins. Chemotherapy. 47(10): 3281-3289.

Morton, D.J. and W.H. Stroube. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology. 45: 417-420.

Nikaji, J. 2016. Development of formulation and application of *Bacillus subtilis* for controlling soft rot disease of Chinese mustard. M.S. Thesis in Crop Science, Suranaree University of Technology.

Pengnoo, A., R. Wiwattanapatapee, A. Chumthong and M. Kanjanamaneesathian. 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.

Pereira, M.R. and W.A. Roberts. 1991. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Journal of Economic Entomology. 84(6):1657-1661.

Rakian, T.C., L. Karimuna, M. Taufik, G.A.K. Sutariati, M. Muhidin and U. Fermin. 2018. The effectiveness of various Rhizobacteria carriers to improve the shelf life and the stability of Rhizobacteria as Bioherbicide. Earth and Environmental Science. 122: 1-7.

Rangel, A.B.F. 2013. Inhibition of food-related bacteria by antibacterial substances produced by *Pseudomonas* sp. strains from pasteurized milk. Food Science and Technology (Campinas). 16(4): 326-333.

Schisler, D.A., P.J. Slininger, R.W. Behle and M.A. Jackson. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. Journal of Phytopathology. 94(11): 1267-1271.

Swami, D., B. Paul and S.K. Dotasara. 2017. Effect of carriers on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (hd-1) formulations. Entomology and Zoology. 5(3): 590-594.

Ting, A.S.Y., M.T. Fang and C.S. Tee. 2010. An *in vitro* assessment on the efficacy of clay-based formulated cells of *Pseudomonas* Isolate UTAR EPA2 for

petrol degradation. American Journal of Applied Sciences. 7(2): 178-184.

Wiwattanapatapee, R., A. Chumthong, A. Pengnoo and M. Kanjanamaneesathian. 2013. Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium*-alginate microcapsules for control of rice sheath blight disease. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29: 1487-1497.