บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเป็นมาและความสำคัญ

พื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริตั้งอยู่ในพื้นที่ป่าสงวนแห่งชาติป่าขุนแม่กวง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ เนื้อที่ 8,500 ไร่ ลักษณะภูมิประเทศโดยทั่วไปเป็นป่าเขา มีพื้นที่ค่อนข้างราบอยู่บ้างตามสองฝั่งห้วยฮ่องไคร้ ด้านทิศเหนือเป็นป่าไม้เบญจพรรณสภาพสมบูรณ์ พื้นที่ตอนกลางและตอนใต้เป็นป่าแดงหรือป่าแพะ ลักษณะเป็นป่าซึ่งมีสภาพค่อนข้างเสื่อมโทรม เหมาะสำหรับใช้เป็นพื้นที่ศึกษาการพัฒนาเกษตรกรรมด้านต่างๆ รวมถึงเหมาะสำหรับใช้เป็นพื้นที่ศึกษาเก็บรวบรวมข้อมูลสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเช่น แบคทีเรีย ราโปรโตซัว และไลเคน ในด้านต่างๆ เช่นแหล่งที่อยู่อาศัย การแพร่กระจาย และการใช้ประโยชน์ เป็นเหตุให้จำเป็นต้องมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดขึ้นจากวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่เกิดควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมเพื่อการปรับตัวให้เหมาะสมกับที่อยู่อาศัย เป็นเหตุให้เกิดสิ่งมีชีวิตมีจีโนไทป์ใหม่ๆ เกิดขึ้นจำนวนมาก (วุฒิ สุมิตร และชำนาญ แย้มผกา, 252530)

ความหลากหลายทางชีวภาพ คือสภาพโดยรวมของสิ่งมีชีวิต และพันธุกรรมทั้งหมดที่ปรากฏอยู่บนโลกนี้ ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรม คือพันธุกรรมที่มีอยู่ในแต่ละหน่วยสิ่งมีชีวิตที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มในประชากร หน่วยพันธุกรรมหรือยีนรูปแบบต่าง ที่มีความแตกต่างกันอย่างมากมาย และเป็นตัวการสำคัญที่กำหนดรูปร่าง และการทำงานของสิ่งมีชีวิตตลอดจนการสืบทอดสายพันธุ์ และเผ่าพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต อาจกล่าวได้ว่ายีนเป็นหน่วยพันธุ์กรรมซึ่งมีความแตกต่างที่มีบทบาทเหมือนกัน ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในหน่วยสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วยนั้น มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เรียกว่า มิวเตชันซึ่งอาจเกิดขึ้นในระดับยีน หรือในระดับโครโมโซม ผสมผสานกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งเอื้ออำนวยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงยีนระหว่างโครมาทิด ของโครโมโซมคู่เหมือนกันโดย กลไกที่เรียกว่าครอสซิ่งโอเวอร์ เป็นผลทำให้ยีนสลับที่รวมกันใหม่ ซึ่งจะถูกถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานต่อๆ ไปในประชากร ซึ่งเรียกว่า gene pool การถ่ายทอดยีนไปหลายๆรุ่น เช่นการคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพ ทำให้พันธุกรรมของประชากรในแต่ละรุ่นเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเกิดขึ้นทีละเล็กละน้อยทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (ปรีชา ประเทพา, 2543)

อิทธิพลของสภาพแวดล้อมต่อจุลินทรีย์ในดิน

สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อ จำนวนชนิดและกิจกรรมของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก สภาพแวดล้อมที่สำคัญ ประกอบด้วย ความชื้นในดิน การถ่ายเทอากาศ อุณหภูมิ อินทรีย์วัตถุ สภาพ พีเอช ชนิด และปริมาณธาตุอาหารในดิน นอกจากนั้นเขตเกษตรกรรม ฤดูกาล และระดับความลึกของดินนับเป็นสภาพแวดล้อมอันสำคัญ เช่นกัน (Alexander, 1976)

ความชื้นในดิน เนื่องจากน้ำเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรโตพลาส น้ำจึงควรจะมีเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งต้องการน้ำแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์

การถ่ายเทอากาศ น้ำ และอากาศในดินต่างอาศัยช่องว่างในดิน ถ้าน้ำมากจะมีอากาศน้อย ดังนั้นอากาศอาจเป็นตัวกำหนดชนิดของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในดินได้

อุณหภูมิในดิน อุณหภูมิเป็นตัวกำหนดปริมาณ และชนิดของกระบวนการทางชีวภาพ จุลินทรีย์แต่ละชนิดต่างต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญไม่เท่ากัน อาจแบ่งชนิดของจุลินทรีย์ได้ตามอุณหภูมิพอเหมาะ ดังนี้

Mesophiles เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส และสามารเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในพวกนี้

Psychrophiles เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิพอเหมาะมีค่าต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส

Thermophiles เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูงอยู่ในช่วง 45-65 องศาเซลเซียส มีแบคทีเรียหลายชนิดที่เป็น obligate thermophiles ซึ่งการเจริญจะหยุดชะงักเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส

อินทรีย์วัตถุ จำนวนของจุลินทรีย์ขึ้นกับ ปริมาณอินทรีย์วัตถุ หรือสารอินทรีย์คาร์บอนที่ใส่ลงในดิน เช่น ซากพืช ซากสัตว์ หรือปุ๋ยอินทรีย์ จำนวนของแบคทีเรีย และเชื้อราเพิ่มขึ้นอย่างมาก และใช้สารประกอบอินทรีย์ส่วนที่ย่อยสลายง่ายไปเป็นส่วนใหญ่แล้ว เหลือสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายยาก และการแข่งขันลดลง ก็จะพบปริมาณแอคติโนมัยสีทเพิ่มขึ้น (Brock, 1966)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภาพพีเอช (pH) ดินที่มีพีเอชสูง หรือต่ำมากจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในสภาพ พี เอช เป็นกลาง

ธาตุอาหารในดิน การเติมธาตุอาหารอื่นลงไปในดินก็มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เช่น การเติมปุ๋ยไนโตรเจนลงในดินจะช่วยเพิ่มปริมาณของแบคทีเรีย แต่ในบางโอกาสการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงได้ (Brown, 1978)

นอกจากนี้สภาพแวดล้อมอื่น เช่น ฤดูกาลอันเป็นผลรวมของสภาพความชื้น และอุณหภูมิ ฤดูกาลเป็นตัวกำหนดบทบาทของพืชบนดิน อิทธิพลของสารที่ถูกขับจากรากพืชแต่ละชนิดก็มีบทบาทต่อ จุลินทรีย์ได้ไม่เหมือนกัน

เขตเกษตรกรรมมีบทบาทต่อพืช และจุลินทรีย์ การไถพรวน การให้น้ำ ย่อมมีผลต่อสภาพการถ่ายเทอากาศ และความชื้นในดิน และยังเป็นการเพิ่มโอกาสในการสลายของอินทรีย์วัตถุในบริเวณข้างเคียงให้เกิดการสลายได้มากยิ่งขึ้น และระดับความลึกของดินก็มีอิทธิพลต่อชนิด และปริมาณจุลินทรีย์ โดยปริมาณจะลดลงตามระดับความลึกของดิน (Alexander, 1976)

บทบาทและความสำคัญของเชื้อ *B. subtilis* มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โรคพืชทางดินเริ่มจากรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านจากแหล่งที่มีโรคระบาด จากตัวอย่างโรค หรือจากดินที่มีคุณลักษณะพิเศษที่พืช สามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีความต้านทานโรค จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีลักษณะพิเศษ ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และสามารถยับยั้ง หรือทำลายเชื้อโรคได้ สามารถแพร่พันธุ์ได้ง่าย ตลอดจนมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม จุลินทรีย์ปฏิปักษ์โรคพืชทางดินที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ *Trichoderma Gliocladium Agrobacterium Streptomyces Bacillus* และ *Pseudomonas* (ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และ รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์, 2540)

B. subtilis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโรคพืชที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อที่มีการระบาดได้อย่างรวดเร็ว และยังไม่มีวิธีการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ (นลินี จาริกภากร และคณะ 2535) โดยเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ซึ่งอาจจะพิจารณาได้จากเหตุผลที่สำคัญ คือมีความสามารถเข้าทำลายโดยตรง และสามารถแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในสภาพแวดล้อมที่ขาด

แคลน รวมทั้งมีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เป็นจุลินทรีย์ที่พบอาศัยอยู่ในพืชโดยไม่ส่งผลกระทบต่อพืชที่อาศัยอยู่ และยังมีความสามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดี โดยการสร้างสปอร์ ด้วยเหตุนี้ทำให้มีการศึกษา *B. subtilis* มาใช้ควบคุมจุลินทรีย์ต่างๆที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ซึ่งจะทำให้การเพิ่มผลผลิต ลดปริมาณนำเข้าสารเคมี และลดปริมาณสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม และในพืชผลต่างๆ ซึ่งมีผลทำให้มีความปลอดภัยกับผู้ผลิต และผู้บริโภคนอกจากนี้ยังช่วยลดอัตราการสูญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต และจุลินทรีย์ต่างๆ (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2540; ศรีสุดา กวยาสกุล, 2542)

ลักษณะของโคโลนีของ *Bacillus* แตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของอาหาร อุณหภูมิของการบ่ม ความชื้น และสภาพแวดล้อมอื่น แต่ส่วนใหญ่แล้วโคโลนีจะมีสีขาวขุ่น ทึบแสง ไม่สร้างสารสี ยกเว้นบางชนิด เช่น *B. megaterium* สร้างสีเหลืองเมื่อเจริญบนอาหารเคซีน ในขณะที่ *B. fastidious* สร้างสีเหลือง เมื่อเจริญบนอาหาร allantoin agar ส่วน *B. subtilis* สร้างสีชมพู สีเหลือง สีน้ำตาล หรือสีส้ม บนอาหาร nutrient agar (Sneath, Mair and Sharpe, 1968; Gordon, Haynes and Hor-Noy Pang, 1973)

สารปฏิชีวนะเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ มีฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง (Waksman, 1961) และสารปฏิชีวนะเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ที่ไม่เกี่ยวข้อง หรือจำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์ แต่ถูกผลิตขึ้นมาเป็นพิเศษใน จุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะได้ (Bu'lock, 1961; Katz and Deamain, 1977) เรียกกระบวนการเมเทบอลิซึมที่ผลิตสารปฏิชีวนะว่า เมแทบอลิซึม ทุติยภูมิ (secondary metabolism) และเรียกผลผลิตที่ได้ว่า สารในกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ (Kurylowicz, 1976)

B. subtilis AP01 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และเชื้อรา 2 ชนิด แบบเข้าครอบครอง (colonization) โดย *B. subtilis* AP01 สามารถเจริญครอบคลุมเชื้อสาเหตุของโรคพืชได้ แต่การควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าในทุเรียน *Colletotricum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของถั่วเหลือง และ *Scleroticum roljaii* สาเหตุโรคโคนเน่า และต้นเน่าของถั่วลิสง จะเป็นแบบสร้างสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ *B. subtilis* ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะที่ สร้างโดย *B. subtilis*

สารปฏิชีวนะ
Mycobacillin
Subtilin (Jansin and Hirshmann, 1944)
Bacilysin
Bacillomycin
Fungistatin
Bulbiformin
Bacillin
Subsporin
Bacillocin
Mycosubtilin (Katz and Demain, 1977)
Iturin
Rhizocticins
Ristocetin
Surfactin
Chlorotetain
Fengycin
Botrycidin
Alboleutin
Xanthobacidin (Huang and Chang, 1975)
Bacilysin
Fengymycin (Loeffler et al., 1986)

กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแบคทีเรีย

เชื้อในสกุล *Bacillus* ผลิตสารปฏิชีวนะประเภทเปปไทด์ (peptide antibiotics) โครงสร้างสารประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด และขับออกนอกเซลล์แล้วสารนั้นจะมีผลไปทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ ซึ่งแบ่งออกตามความสามารถในการทำลายได้ 5 ประเภท คือ

1. สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ผนังเซลล์เป็นโครงสร้างที่แข็งแรง และทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ ตลอดจนช่วยป้องกันการแตกของเซลล์ เนื่องมาจากแรงดันออสโมซีสสูง ๆ สารปฏิชีวนะประเภทนี้ส่วนใหญ่จะไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้ เช่น bacitracin สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียนี้ จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีในระยะที่แบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์ ถ้าหากอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ไม่มีการแบ่งเซลล์ หรือแบ่งเซลล์ช้ามาก การใช้สารปฏิชีวนะประเภทนี้จะไม่ได้ผลดี แม้แบคทีเรียนั้นจะอ่อนแอต่อสารปฏิชีวนะนี้ก็ตาม (Wolin, 1979; Pelczer et al., 1981)

2. สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติ semipermeable membrane โดยสารส่วนใหญ่จะเข้าสู่เซลล์แบบ active transport ซึ่งต้องใช้พลังงานในการนำสารเข้าสู่เซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์จะควบคุมการปล่อยสารบางอย่างออกนอกเซลล์ด้วย สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์จะไปทำให้การนำสารเข้าสู่เซลล์ และออกจากเซลล์ผิดปกติ ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้นานๆ ทำให้เซลล์ตายได้ เช่น polymyxin B และ gramicidin S ทำให้เกิดการรั่วไหลของโพแทสเซียมไอออน มีผลทำให้การสร้างพลังงานหยุชะงักไป และเซลล์หยุดการเจริญ (Wolin, 1979)

3. สารปฏิชีวนะที่ขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การสร้างโปรตีนของเซลล์จุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่สำคัญสำหรับการซ่อมแซม และสร้างเสริมเซลล์ puromycin เป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดย puromycin ไปขัดขวางการจับของไรโบโซมกับ mRNA จึงเป็นการขัดขวางการสร้างโปรตีน (Wolin, 1979)

4. สารปฏิชีวนะที่ขัดขวางการทำงานของกรดนิวคลีอิค เป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญในการควบคุม เมแทบอลิซึมของเซลล์ ดังนั้น การขัดขวางการทำงานของกรดนิวคลีอิคจะทำให้เมแทบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติไปด้วย เช่น edeine มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการสร้าง RNA เมื่อไม่มีการสร้าง RNA ทำให้เมแทบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ (ศรีสุดา กวยาสกุล, 2534)

5. สารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งในระหว่างการเกิดเมแทบอลิซึม (intermediate metabloism) เช่น sulphanilamide ไปขัดขวางการสังเคราะห์ตัวกลางที่ใช้ในปฏิกิริยาการทำงานของเซลล์ ทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติไป (ศรีสุดา กวยาสกุล, 2534)

Mckeen et al. (1986) รายงานการใช้ *B. subtilis* ในการควบคุมการเจริญของ *Monilinia fructicola* เชื้อราสาเหตุของโรคเน่าสีน้ำตาลของพืช บนอาหารสังเคราะห์ ผลการทดลอง พบว่า *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. fructicola* ได้ และพบว่า *B. subtilus* สร้างสารออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (Michener and Snell, 1949; Asante and Neal, 1964)

B. subtilis สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด กลไกการยับยั้งที่สำคัญของเชื้อก็คือ การสร้างสารปฏิชีวนะ (Aldrich and Baker, 1970) เช่น Selenocycin (MZ51) เป็นสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *B. subtilis* รหัส MZ51 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดโรค fusariosis ซึ่งเกิดจาก *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* ได้

การควบคุมโรคพืชโดยการใช้เชื้อสกุล *Bacillus* มีกลไกที่สำคัญ คือ การสร้างสารปฏิชีวนะ โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นในปัจจุบัน กำลังศึกษากันอย่างกว้างขวางในต่างประเทศ และในบางสายพันธุ์ก็สามารถผลิต ในเชิงการค้าได้แล้ว เช่น *B. subtilis* ซึ่งได้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว แต่ยังมีราคาแพง เกษตรกรยังไม่นิยมใช้ (Pusey et al., 1988)

เนื่องจาก *B. subtilis* มีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุของโรคพืชได้แตกต่างกัน มีรายงานการแยกความแตกต่างโดยใช้ *B. subtilis* 5 สายพันธุ์ และใช้เชื้อรา *Phytophthora palmivora* เป็นตัวคัดเลือกสายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ของ *B. subtilis* AP01 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris pv. citri* สาเหตุของโรคแกงเกอร์ในส้ม เชื้อรา *Fusarium roseum* สาเหตุของโรคเหี่ยว และโรคโคนเน่าของกล้วยไม้ *Pythium sp.* สาเหตุโรคเน่าของส้มโอ พบว่าสามารถควบคุมเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียได้แบบครอบครอง แต่การควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivora Collectotricum truncatum* และ *Sclerotium truncatum* เป็นแบบสร้างสารปฏิชีวนะ (มณจันทร์ เมฆธน, 2536; นลินี จาริกภากร และคณะ, 2535) รายงานการใช้ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *B. subtilis* NSRS 89-26 ทดสอบความสามารถในการป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธีควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุของโรคใบแห้ง และเชื้อราสาเหตุของโรคข้าว พบว่า *B. subtilis*

NSRS 89-24 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทั้ง 8 ชนิด ได้ส่วน *B. subtilis* NSRS 89-26 สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวได้ 7 ชนิด

Bacillus ส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ amylase และสารปฏิชีวนะประเภทพอลิเพปไทด์ได้ เช่น Bacitracin, Gramicidin S, Subtilin และ Biocin จากเชื้อ *B. licheniformis, B. brevis, B. subtilis* และ *B. cereus* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *B. licheniformis* และ *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช *Hemilasia vastatrio* ในขณะที่ *B. aureus* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *Sclerotiam rolfsii* และ *Rhizoctonia solfmi* ได้ (Pleban, Ingel and Chet, 1995)

B. subtilis ที่เป็นจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชชนิดต่างๆ โดยเฉพาะเชื้อราสาเหตุของโรครากเน่า โคนเน่าในทุเรียน เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ พบได้ในสภาพธรรมชาติโดยทั่วไปเจริญเติบโตได้เร็วสามารถปรับตัวและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีสามารถสร้างสปอร์ได้ โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (Corke and Risbeth, 1981; Sinclair et al., 1989) หรือทำให้เกิดผลเสียหายต่อพืชที่อาศัยอยู่ (Reddy and Rage, 1989) นอกจากนี้ *B. subtilis* ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น Yanthobacidin (Huang and Chang, 1975) Subtilin (Jansen, 1944) Bacilysin และ Fengymycin (Loeffler et al., 1986)

มนจันทร์ เมฆธน (2536) ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *P. palmivora C. truncatum* และ *S. roljsii* พบว่า *B. subtilis* AP01 มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งเป็นสาเหตุโรคพืชทั้งสาม โดยสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งจะเห็นรอยยับยั้ง ระหว่างการเจริญของเชื้อทดลองทั้งสอง

มนจันทร์ เมฆธน (2536) ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pythium sp.* พบว่า *B. subtilis* AP01 มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสองชนิด แบบเข้าครอบครอง โดยระยะแรกเชื้อราสามารถเจริญคลุมเชื้อ *B. subtilis* AP01 หลังจากนั้นก็ถูก *B. subtilis* AP01 เจริญเติบโตครอบคลุม ซึ่งสังเกตได้จากเส้นใยของเชื้อราจะยุบลงเนื่องจากเกิด lysis

วิธีการทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลเพื่อการจัดจำแนกและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลสามารถใช้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ใช้วิธี Isozyme ในการจัดจำแนก *Caledia captica* (Moran, Wikinson and Shaw, 1989) Serotyping สามารถบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ *Bacillus cereus* (Shinagawa, 1993) และวิธี Plasmid Profile มีการใช้ในการบอกความแตกต่างของ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่ไม่ได้ทุกสายพันธุ์ (Debuono et al., 1998) เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มีอยู่หลายวิธี เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR) Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน

วิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สายเดี่ยวที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะ และมีความยาวเพียง 8-10 นิวคลีโอไทด์ (William et al., 1990; Welsh and Mcclelland, 1990) เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสเป็นเบสคู่สมกัน การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากปฏิกิริยา Polymerase chain โดยไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์ไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมากโดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางตรงกันข้าม ($5' \rightarrow 3'$) จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ หรือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้นๆ เข้าไปจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบที่บริเวณหนึ่งแบบสุ่ม เอ็นไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจึงเข้าไปเกาะ และเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอสายสั้นๆ จากปลาย $3'$ ของไพรเมอร์ ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีการ RAPD ทำให้ได้ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส บนอะกาโรสเจล แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบหาโพลีมอร์ฟีซึม (Polymorphism) โดยการเปรียบเทียบจากความเหมือน และแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เป็นผลจากชิ้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้ามาเกาะหายไปหนึ่งตำแหน่ง หรือมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามา หรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป เทคนิคนี้ ตรวจสอบโพลีมอฟีซึมได้ในระดับสูง ทำได้ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ (Staub and Megtic, 1993; Bardakci and Skibinski, 1994) นำมาใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต และสามารถนำไปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ (Nilsson et al., 1998; Batinic et al., 1998)

ความก้าวหน้าในปัจจุบันเทคนิคของอณูพันธุศาสตร์ สามารถนำไปใช้แก้ปัญหาการจัดจำแนกเชื้อโรคพืชโดยวิธี RAPD-PCR ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมาขึ้นกับความแตกต่างระหว่างลำดับเบสของเชื้อสาเหตุโรค ไพรเมอร์มีความเฉพาะเจาะจงต่อ species สูงใช้ตรวจสอบเชื้อโรคพืชในเนื้อเยื่อได้อย่างแม่นยำ RAPD bands บางลักษณะที่สังเกตพบมีเพียงบาง species หรือ isolate และเทคนิคนี้ได้พิสูจน์ และยอมรับว่าง่ายในการสร้าง species และไอโซเลทที่จำเพาะเจาะจงสูงใน DNA hybridization probes (Johanson et al., 1994) RAPD-PCR สามารถใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), และ Isozyme เพื่อยืนยันความถูกต้อง (ปรีชา ประเทพา, 2543) RAPD สามารถใช้เพื่อบอกความแตกต่างของ species ในการเจริญเติบโตของเชื้อและการแพร่กระจ่ายของเชื้อ (Cocconcelli et al., 1997; Niemann et al., 1997) รวมถึงแสดงความแตกต่างของเชื้อในระดับ genomospecies (Oakey, Ellis and Gibson, 1996; Permual Pillay and Pillay, 1996)

RAPD สามารถใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับ species และ สายพันธุ์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงถูกใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* (Brousseau et al., 1993) ใช้วิเคราะห์ genetic diversity pattern ทำให้เห็นความเด่นชัดทางด้านยีนและสามารถจำแนกสายพันธุ์หรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ (Sikora et al., 1997) และใช้วิธีการนี้ศึกษายีนที่เฉพาะของจุลินทรีย์ ที่มีความจำกัดทางด้านสัณฐานวิทยา เนื่องจากการศึกษาทางด้านสรีรวิทยา หรือสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถแยกกลุ่มของเชื้อได้ เช่น ความแตกต่างในรูปร่าง ลักษณะระหว่างไอโซเลทของเชื้อ *Sphaeropsis sapinea* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ morphotype A และ morphotype B แต่ไม่แน่นอน การศึกษา RAPD ของไอโซเลท จากพื้นที่ต่างๆกันโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลทสามารถแยกกลุ่มเชื้อได้อย่างชัดเจนและให้ผลที่คล้ายกับการจัดด้วยสัณฐานวิทยา (Smith and Stanosz, 1995; Stanosz, Smith and Guthmiller, 1996)

Stephan, Schraft and Untermann (1994) ใช้เทคนิค RAPD สำหรับศึกษาสายพันธุ์ของ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus* spp. อื่นๆ ทั้งหมด 46 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนก *B. licheniformis* ได้ 10 สายพันธุ์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ 10 นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้พบว่าแบบแผน RAPD สามารถบอกความแตกต่างของ *Bacillus* spp. อื่นๆ 8 สายพันธุ์ แตกต่างจาก *B. licheniformis* ทั้งหมดอย่างชัดเจน ด้วยเหตุนี้เทคนิค RAPD จึงถูกใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบลักษณะของ *Bacillus* spp.

Stephan (1996) ใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของ *B. urius*, *B. lintus* และ *B. cereus* 25 ไอโซเลท พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 22 สายพันธุ์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *B. lintus* 3 สายพันธุ์มีความแตกต่างจาก *B. cereus* ทั้งหมดอย่างชัดเจน ด้วยเหตุนี้เทคนิค RAPD จึงเป็นเครื่องมือตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสำหรับแสดงลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ *B. cereus*

Ronimus, Parker and Morgan (1997) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD ผลที่ได้นั้นสามารถแบ่งแยกจำนวนระหว่าง Thermophilic และ Mesophilic แบคทีเรียแต่ละชนิดและสายพันธุ์ รวมถึงวิเคราะห์ Thermophilic ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ของ *Bacillus stearothermophilus B. kuastophilus B. coagulans B. spracicus B. thermodenitrificans B. thermocatenualatus B. thermoleovans B. licheniformis B. brevis B. thermoglucosidasius B. caldolyticus B. caldotenas B. caldovelox B. thermocloacae* และ *B. smithii* พวก mesophiles สายพันธุ์ของ *B. pumilus B. subtilis B. megaterium B. circulans B. aureus* และ *B. mycoides* ได้

Batinic et al. (1998) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium ultium* และพัฒนาวิธีการนี้ไปเป็น probe เพื่อใช้ในการตรวจหา *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ต่างๆ ที่มียีนสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. ultium*