โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Pyricularia oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว

ชื่อนิสิต นายธนพล กุลวัชวิมล รหัสประจำตัว 5932319823

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Pyricularia oryzae* ที่ก่อโรคใหม้ในข้าว

Antagonistic bacteria against *Pyricularia oryzae*, the causal agent of rice blast disease

ชื่อนิสิต นายธนพล กุลวัชวิมล **เลขประจำตัว** 5932319823

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Pyricularia oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว

โดย

นายธนพล กุลวัชวิมล

เลขประจำตัว 5932319823

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Pyricularia oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว
โดย	นายธนพล กุลวัชวิมล รหัสนิสิต 5932319823
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

ชื่อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Pyricularia oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว

นิสิตผู้ทำโครงการ นายธนพล กุลวัชวิมล รหัสประจำตัว 5932319823

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อค้นหาแบคทีเรียที่มีความสามารถยับยั้ง *Pyricularia oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว โดยนำแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่คัดแยกมาจากดินและน้ำทะเลจากงานวิจัยก่อนหน้านี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M23, M25 และ M26 มีความสามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้สูงที่สุด ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 48.33, 50.00 และ 55.00% ตามลำดับ จึงเลือก 3 สายพันธุ์ข้างต้นไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงความสามารถในการยับยั้งสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ 54.07% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M26 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 45.53% และสายพันธุ์ M23 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 36.58% จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปทดสอบเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งรา จากการทดสอบหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ได้แก่ Luria-Bertani (LB), Nutrient Broth (NB) และ Tryptic Soy Broth (TSB) พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหาร LB มีการยับยั้งรามากที่สุด โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 54.07% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M26 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 45.53% และสายพันธุ์ M23 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 36.58% เมื่อผันแปรค่า pH (6, 7 และ 8) ของอาหาร LB เพื่อหา pH ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* ผลที่ได้พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงที่สุด โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 67.92% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M26 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 60.42% และสายพันธุ์ M23 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 59.17% จากผลการทดลองของงานวิจัยในครั้งนี้ทำให้ได้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการยับยั้ง *P. oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว และทราบถึงภาวะเบื้องต้นที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในยับยั้งรา โดยแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสามมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นสารควบคุมชีวภาพ เพื่อนำไปใช้ควบคุมโรคไหม้ในข้าวได้จริงในอนาคต

Project: Antagonistic bacteria against *Pyricularia oryzae*, the causal agent of rice blast disease

Student: Thanapon Kunlawatwimon ID 5932319823

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Panan Rerngsamran

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

This research aims to find antagonistic bacteria that have ability to inhibit *Pyricularia oryzae*, the causal agent of rice blast disease. Ten bacterial strains isolated from soil and sea water from previous research were tested for their antifungal abilities using dual culture method. The results showed that strains M23, M25 and M26 were the top three bacteria that showed the highest percentage of inhibition against *P. oryzae* with 48.33, 50.00 and 55.00% inhibition, respectively. Thereby, these three bacterial strains were selected for evaluating of their antifungal abilities using cell-free supernatant. The results found that cell-free supernatant of strain M25 had the highest antifungal ability with 54.07% inhibition, followed by strain M26 with 45.53% inhibition and strain M23 with 36.58% inhibition. These 3 strains of bacteria were subjected for optimization to find the suitable growth condition of the bacteria to increase the inhibition efficiency. Among the cultures media tested which were Luria-Bertani (LB), Nutrient Broth (NB) and Tryptic Soy Broth (TSB), it was found that LB medium gave the highest inhibition efficiency. By culturing in LB, cell-free supernatant of strain M25 had the highest antifungal ability with 54.07% inhibition, followed by strain M26 with 45.53% inhibition and strain M23 with 36.58% inhibition. Upon varying pH (6, 7 and 8) of LB medium to find optimal pH to inhibit *P. oryzae*, it was found that cell-free supernatant of all 3 bacterial strains cultured in LB medium with pH 7 had the highest percentage of inhibition. The strain M25 showed the highest percentage of inhibition with 67.92%, followed by strain M26 with 60.42% and strain M23 with 59.17%. The results of this project revealed 3 bacterial strains with superior antifungal activity against *P. oryzae* which is the causal agent of rice blast disease, and revealed the growth condition of bacteria that improved their antifungal activities. These bacterial strains have potential to be developed into a biological agent for biocontrol of rice blast in the future.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการฯ ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง มอบความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ในการทำโครงการนี้ อีกทั้งยังกรุณาตรวจสอบและแก้ไขปรับปรุงโครงการฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อโครงการ ช่วยอำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในเรื่องเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา ทำให้งานวิจัยดำเนินไปอย่างราบรื่นสำเร็จลุล่วงไปอย่างดี และรวมถึงประสบการณ์ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ด้วย

ขอขอบคุณ นางสาวสิริตา เสียมไหม นายสิรภพ ภูมิภูติกุล และนายอัษฎาวุธ แกล้วกล้า ซึ่งเป็นพี่ในห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำคำปรึกษาชี้แนะแนวทางการดำเนินงานในการทำโครงการนี้ จนโครงการนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวณัฐมณ วาจรัส นิสิตปริญญาตรีร่วมห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่เป็นเพื่อนคู่คิด ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือด้วยความเต็มใจเป็นอย่างดี และร่วมกันแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ตลอดการทำโครงการนี้ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติชั้น 19 รวมถึงพี่ ๆ ปริญญาเอกและปริญญาโท และเพื่อน ๆ นิสิตปริญญาตรีในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนที่คอยสนับสนุนตลอดจนเป็นกำลังใจในการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคน ที่คอยสนับสนุน และเป็นกำลังใจสำคัญในการทำโครงการนี้ และสุดท้ายขอขอบคุณตนเองที่ตั้งใจศึกษาเล่าเรียน มีความรับผิดชอบและนำความรู้ที่ได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยามาปรับใช้ในการดำเนินงานในการทำโครงการนี้ ส่งผลให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
หน้าอนุมัติโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์การทดลอง	9
บทที่ 2 เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์	10
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	50

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1: ลักษณะอาการของข้าวที่ติดโรคใบไหม้ 3

รูปที่ 2: เส้นใย, ก้านชูโคนิเดีย และโคนิเดียของ *P. oryzae* 4

รูปที่ 3: ลักษณะโคโลนีของ *P. oryzae* ด้านบนอาหาร PDA และด้านล่างของอาหาร 4

รูปที่ 4: แอพเพรสสอเรียม , เจิร์มทิวบ์ และโคนิเดีย 5

รูปที่ 5: การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ด้วยวิธี dual culture 13

รูปที่ 6: การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ 15

รูปที่ 7: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ N1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 24

รูปที่ 8: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ N3 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 24

รูปที่ 9: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ TW1-1ng เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 24

รูปที่ 10: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ TD12-11 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 25

รูปที่ 11: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M10 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 25

รูปที่ 12: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M22 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 25

รูปที่ 13: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M23 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 26

รูปที่ 14: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M25 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 26

รูปที่ 15: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M26 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 26

รูปที่ 16: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M27 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 27

รูปที่ 17: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 28

รูปที่ 18: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 28

รูปที่ 19: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 29

รูปที่ 20: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร LB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 31

รูปที่ 21: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 31

รูปที่ 22: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร LB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 31

หน้า

รูปที่ 23: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร NB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 32
รูปที่ 24: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร NB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 32
รูปที่ 25: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร NB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 32
รูปที่ 26: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 33
รูปที่ 27: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 33
รูปที่ 28: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 33
รูปที่ 29: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 36
รูปที่ 30: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 36
รูปที่ 31: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 36
รูปที่ 32: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 7 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 37
รูปที่ 33: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 7 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 37
รูปที่ 34: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 7 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 37
รูปที่ 35: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 8 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 38
รูปที่ 36: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 8 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 38
รูปที่ 37: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 8 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 38

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture 23

ตารางที่ 2: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ 28

ตารางที่ 3: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB, NB และ TSB 30

ตารางที่ 4: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6, 7 และ 8 35

บทที่1

บทนำ

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นผู้ย่อยสลายในระบบนิเวศ และมีบทบาทที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ด้วย โดยสามารถพบราได้ในแหล่งต่าง ๆ ทั้งในดิน แหล่งน้ำ และในสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งมีการประมาณการว่าปัจจุบันมีจำนวนสปีชีส์ของราอยู่ถึง 5.1 ล้านสปีชีส์ (Blackwell, 2011) จากการทดลองและการศึกษาราของมนุษย์ทำให้มีการค้นพบประโยชน์มากมาย ทั้งความสามารถในการผลิตสารและเอนไซม์ต่าง ๆ ของรา ทำให้มนุษย์ได้มาซึ่งเอนไซม์ ยา และอาหารต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตาม มีราส่วนหนึ่งที่พบว่าก่อโรคในพืช (phytopathogenic fungi) และสามารถผลิตสารที่เป็นพิษต่อพืชได้ ราเหล่านี้ส่งผลเสียต่อผลผลิตทางการเกษตรและสุขภาพของคน ซึ่งผลเสียดังกล่าวอาจนำไปสู่ความเสียหายของเศรษฐกิจทางการเกษตร ทำให้การส่งออกผลผลิตทางการเกษตรมีปริมาณลดลง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียรายได้ที่สำคัญของประเทศ สูญเสียอาหารเพื่อการบริโภค และอาจก่อโรครุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตในคนและสัตว์ได้ (Wang และคณะ, 2019) ราก่อโรคพืชเป็นกลุ่มของราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช โดยรากลุ่มนี้จะก่อโรคพืชได้หลากหลายรูปแบบ ซึ่งโดยทั่วไปจะแบ่งราก่อโรคพืชเป็น 3 กลุ่ม (Wang และคณะ, 2014) ได้แก่ 1) biotrophic pathogen ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่มีปฏิสัมพันธ์กับพืช โดยเชื้อสามารถอาศัยและใช้สารอาหารจากเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตได้ โดยในหลายกรณีแสดงอาการของโรคที่ไม่รุนแรง, 2) necrotrophic pathogen ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่ฆ่าและทำลายเนื้อเยื่อพืช โดยจะดึงสารอาหารจากเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้ว และ 3) hemibiotrophic pathogen ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่เริ่มต้นด้วยการประพฤติแบบ biotroph แล้วเปลี่ยนไปเป็น necrotroph ราโรคพืชทั้ง 3 กลุ่มเป็นเพียงตัวอย่างหลัก ๆ เท่านั้น ซึ่งยังมีการก่อโรคเพิ่มเติมอีกหลายแบบ ด้วยความสามารถในการก่อโรคและกลยุทธ์มากมายนี้ ทำให้ราโรคพืชสร้างความเสียหายต่อพืชผลผลิตทางการเกษตรได้หลายชนิด อาทิเช่น ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด เป็นต้น (Doehlemann และคณะ, 2017)

ข้าวและความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ผลผลิตทางการเกษตรสำคัญของโลกมีมากมาย หนึ่งในนั้นคือ ข้าว ซึ่งประมาณครึ่งหนึ่งของประชากรโลกใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบหลักในการประกอบอาหาร (Song และคณะ, 2018) เป็นที่ทราบกันดีว่าประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตข้าวรายใหญ่ของโลก พื้นที่ปลูกข้าวคิดเป็นมากกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดของประเทศ นอกจากนี้ ข้าวยังเป็นอาหารหลักของประชากรไทย รวมถึงเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญในการส่งออกของประเทศอีกด้วย (Kraithong และคณะ, 2018) ปีพุทธศักราช

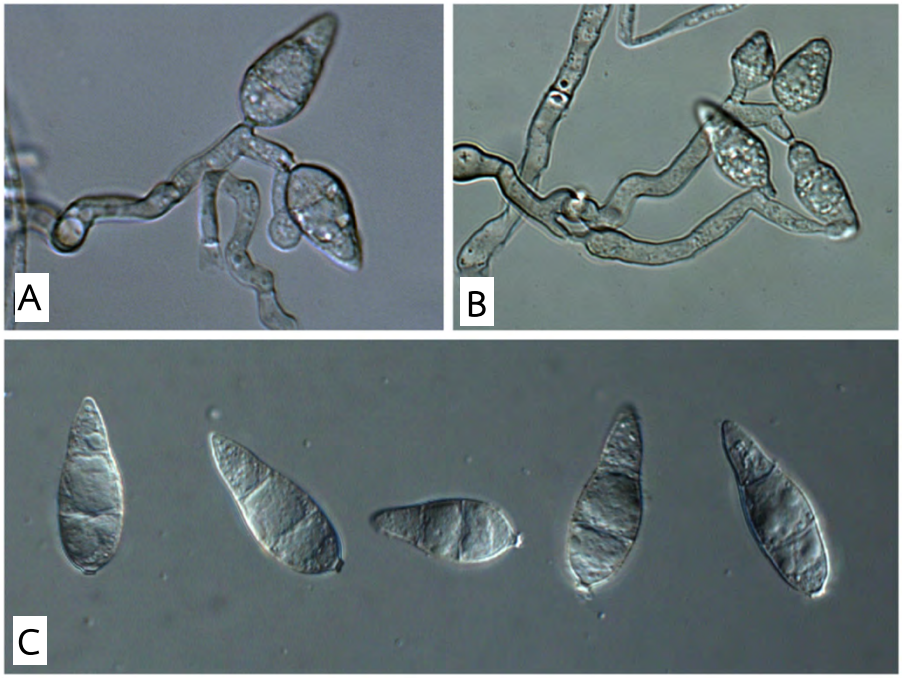
2561 ประเทศไทยส่งออกข้าวเป็นอันดับ 2 ของโลก ด้วยปริมาณส่งออกอยู่ที่ประมาณ 11.0 ล้านตัน และผลิตข้าวเป็นอันดับ 6 ของโลก ด้วยปริมาณผลิต 20.4 ล้านตัน (กระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา, 2562a) ในเดือนมกราคมถึงสิงหาคม ปีพุทธศักราช 2562 ประเทศไทยส่งออกข้าวเป็นอันดับ 1 ในประเทศกลุ่มอาเซียน ด้วยปริมาณส่งออกรวม 5,354,661 ตัน มูลค่าส่งออก 2,872.4 ล้านเหรียญสหรัฐฯ (กระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา, 2562b) ในปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาศัตรูพืชทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ซึ่งราเป็นศัตรูพืชหลักที่ก่อให้เกิดความเสียหายระหว่างการเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยว ส่งผลทำให้มีผลผลิตลดลง โรคที่เกิดในข้าวมีสาเหตุหลักจากรา ซึ่งมีโรคที่สำคัญมากมาย อาทิเช่น โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot disease) ที่มีสาเหตุจาก *Biopolaris oryzae* โดยอาการของโรคจะพบใบข้าวมีจุดสีน้ำตาล รอยเปื้อนคล้ายสนิม ซึ่งอาจเกิดบนเมล็ดข้าวเปลือก ทำให้เมล็ดข้าวเปลือกสกปรก เสื่อมคุณภาพ เมื่อนำข้าวสารไปสีเมล็ดจะหักง่าย, โรคใบขีดสีน้ำตาล (narrow brown spot disease) ที่มีสาเหตุจาก *Cercospora oryzae* โดยอาการของโรคจะพบใบข้าวมีสีน้ำตาลเป็นขีด ๆ ทำให้ใบแห้งตาย, โรคกาบใบแห้ง (sheath bright disease) ที่มีสาเหตุจาก *Rhizoctonia solani* โดยอาการของโรคจะเกิดแผลสีเขียวปนเทาบริเวณกาบใบใกล้ระดับน้ำ ทำให้กาบใบเหี่ยวแห้ง, โรคถอดฟักดาบ (Bakanae disease) ที่มีสาเหตุจาก *Fusarium fujikuroi* โดยอาการของโรคต้นข้าวจะมีลักษณะผอมสูงเด่น สีเขียวซีด เกิดรากแขนงที่ข้อต่อลำต้นตรงระดับน้ำ ทำให้ต้นข้าวตายก่อนออกรวง, และโรคลำต้นเน่า (stem rot disease) ที่มีสาเหตุจาก *Sclerotium oryzae* โดยอาการของโรคจะมีลำต้นจุดสีน้ำตาลดำ ใบล่างต้นข้าวเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ทำให้กาบใบและลำต้นเน่า ต้นข้าวดึงออกจากกอได้ง่าย และล้มตาย (กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2559) นอกจากโรคที่ได้กล่าวมาข้างต้นยังมีโรคในข้าวที่เกิดจากราอีกมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคไหม้ของข้าว (blast rice) ที่เป็นโรคที่สร้างความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวมากที่สุดในบรรดาโรคของข้าวที่เกิดจากรา ทั้งนี้มีรายงานพบว่าในแต่ละปีโรคไหม้ของข้าวทำให้สูญเสียผลผลิตข้าวประมาณ 10-30% และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปีอีกด้วย (Talbot, 2003)

โรคไหม้ของข้าว และ *Pyricularia oryzae*

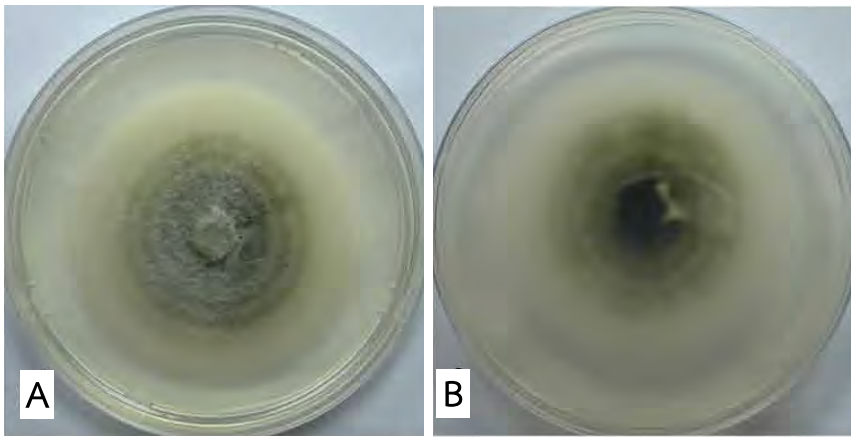
โรคไหม้ของข้าว (blast rice) เป็นโรคที่พบในข้าว (*Oryza sativa*) จากการติดเชื้อ *Pyricularia oryzae* ซึ่งสร้างความเสียหายต่อการเพาะปลูกข้าว (Awla และคณะ, 2017) โดยอาการและแผลของโรคแสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งจะพบอาการได้ทั้งบริเวณใบ ข้อต่อใบ ข้อต่อลำต้น และคอรวงข้าว และเข้าทำลายทั้งในระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวง โดยเฉพาะระยะออกรวงจะทำให้ข้าวมีการติดเมล็ดน้อยลง น้ำหนักและขนาดของเมล็ดข้าวลดลงไม่สมบูรณ์ ซึ่งหากข้าวเกิดการติดเชื้อบริเวณใบจะสังเกตเห็นลักษณะแผลจุดสีน้ำตาลและมีสีเทาตรงกลางแผล (Ariya-anandech และคณะ, 2018)

รูปที่ 1: ลักษณะอาการของข้าวที่ติดโรคใบไหม้ (Miller, 2018)

P. oryzae เป็นชื่อเรียกรานี้ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ส่วนระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีชื่อว่า *Magnaporthe oryzae* ซึ่งเป็นราสาเหตุหลักของโรคไหม้ในข้าว (Klaubauf และคณะ, 2014) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสร้างสปอร์ที่เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) โดยโคนิเดียมีลักษณะเป็นสปอรที่ไม่มีเยื่อหุ้ม ใสไม่มีสี (hyaline) มีรูปร่างเป็นทรงลูกแพร (pear-shaped หรือ pyriform) ปลายยอดแหลม (tapering) แบ่งเป็น 3 เซลล์ และเส้นใยมีผนังกั้น (septate) ดังรูปที่ 2 (สรินนา อ่ำรุ่ง, 2561) เมื่อเจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จะมีลักษณะโคโลนีที่สร้างเส้นใยสีขาวเรียบไปกับผิวหน้าอาหาร ตรงกลางโคโลนีสร้างสปอร์สีเทาอ่อน หากสังเกตจากด้านล่างของอาหารจะเห็นตรงกลางมีสีเทาเข้มถึงสีดำ ดังรูปที่ 3 (Castroagudin และคณะ, 2016)



รูปที่ 2: เส้นใย, ก้านชูโคนิเดีย [A และ B] และโคนิเดีย [C] ของ *P. oryzae* (Klaubauf และคณะ, 2014)



รูปที่ 3: ลักษณะโคโลนีของ *P. oryzae* ด้านบนอาหาร PDA [A] และด้านล่างของอาหาร [B] (Castroagudin และคณะ, 2016)

P. oryzae จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota และจัดเป็นราก่อโรคพืชกลุ่ม hemibiotrophic pathogen โดยในระยะแรกจะได้รับสารอาหารจากเซลล์เนื้อเยื่อพืชที่ยังมีชีวิต หลังจากนั้นจะทำลายเนื้อเยื่อพืชเพื่อดึงสารอาหารมาใช้ ในการก่อโรคจะเริ่มขึ้นเมื่อโคนิเดียของราแพร่กระจายไปยังใบข้าว ก่อให้เกิดการติดเชื้อและเข้ายึดครองพื้นที่ (colonize) โคนิเดียจะพัฒนาสร้างเซลล์พิเศษที่มีลักษณะเป็นโดม (dome-shaped) ที่เรียกว่า แอพเพรสสอเรียม (appressorium) ซึ่งราจะใช้โครงสร้างนี้เจาะเข้าไป

ภายในเซลล์พืช ดังแสดงในรูปที่ 4 (Dagdas และคณะ, 2012) จากนั้นจะใช้สารอาหารจากเซลล์เนื้อเยื่อพืชเพื่อการเจริญและเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งผลิตโคนิเดียเพิ่มมากขึ้นและแพร่กระจายไปยังข้าวต้นอื่นต่อไป

รูปที่ 4: แอพเพรสสอเรียม [AP], เจิร์มทิวบ์ [GT] และโคนิเดีย [CN] (Kong และคณะ, 2013)

ด้วยความสามารถแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางและรวดเร็วเนื่องจากการแพร่กระจายสปอร์ตามลม ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการระบาดของโรคในวงกว้าง ดังนั้นจึงต้องป้องกันหรือรักษาโรคเพื่อลดการสูญเสียผลผลิตข้าว (Rong และคณะ, 2020) ซึ่งนำไปสู่การค้นหาวิธีการเพื่อการป้องกันและกำจัดรา โดยส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมการใช้สารฆ่าแมลงและสารฆ่ารา (fungicide) เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลที่ดีอย่างมากภายในเวลาที่รวดเร็ว (Choi และคณะ, 2017) นอกจากนี้ เนื่องจากประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความต้องการอาหารเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลผลิตทางการเกษตรที่เพียงพอต่อความต้องการ สารฆ่าราจึงยิ่งถูกนำมาใช้เพื่อกำจัดราในพืชเพื่อทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลการใช้สารฆ่าราในระยะสั้นอาจไม่ส่งผลกระทบมาก แต่หากใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานานแล้ว สารฆ่าราซึ่งเป็นสารเคมีสามารถตกค้างและปนเปื้อนในอาหารและทำให้เกิดปัญหาต่อผู้บริโภคได้ (Gupta, 2019) สารฆ่าราบางชนิดสร้างมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมและยังส่งผลให้รามีพัฒนาการในการต้านทานสารเคมีที่สูงขึ้น ซึ่งยากต่อการกำจัดในอนาคต (Choi และคณะ, 2017) เพื่อลดปัญหาจากการใช้สารฆ่าราที่เป็นสารเคมี จึงมีการศึกษาเพื่อค้นหาสารอื่น ๆ ที่ไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมมาทดแทน

การควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพ (biological control) เป็นการนำ สัตว์ พืช แบคทีเรีย หรือรา หรือผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มาใช้เพื่อกำจัดสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ไม่เป็นที่ต้องการ ซึ่งวิธีนี้กำลังได้รับความสนใจและศึกษาเป็นอย่างมาก (Deepa และ Sreenivasa, 2019) ถึงแม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับวิธีควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพจะมีนานกว่า 200 ปีแล้ว แต่ทว่างานวิจัยส่วนใหญ่มีจุดประสงค์มุ่งเน้นไปยังโรคพืชที่แพร่กระจายมาจากดิน (soilborne plant disease) ไม่ว่าจะมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียหรือราในดินก็ตาม ในทางตรงข้าม งานวิจัยเกี่ยวกับวิธีควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพสำหรับโรคที่แพร่โดยสปอร์ทางอากาศยังมีรายงานอยู่ไม่มากเท่าที่ควร (Shimoi และคณะ, 2010)

วิธีควบคุมทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่เพื่อป้องกันพืชจากการติดเชื้อรา เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงและไม่ทำให้เกิดสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์พืช (Wilgen และคณะ, 2020) ในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมทางชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของ *Lysinibacillus* sp. ต่อ *Ralstonia solanacearum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวบนมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) ผลการวิจัยแสดงให้ถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยการตรึงแบคทีเรียไว้บนแกรไฟต์และซิลิกานาโนพาร์ทิเคิล (Djaya และคณะ, 2019), ความสามารถของ *Bacillus subtilis* EDR4 ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของ *Sclerotinia sclerotiorum* ซึ่งก่อโรคในผักกาดก้านขาว (rape seed) (Chen และคณะ, 2014), และการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของ *Pseudomonas* spp. และ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งโรค Panama ซึ่งทำให้กล้วยเหี่ยว โดยมีสาเหตุจาก *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (*Foc*) ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารเมแทบอไลต์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในการยับยั้งราดังกล่าว (Bubici และคณะ, 2019)

Bacillus

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้ มีการสร้างเอนโดสปอร์ พบมากในธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นในดิน น้ำ อากาศ และทางเดินอาหารของสัตว์ ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดิน (Foysal และ Lisa, 2018) เอนโดสปอร์ของ *Bacillus* สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี และบางชนิดเป็นแบคทีเรียไม่ก่อโรค จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ *Bacillus* ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นอย่างมากเพื่อนำมาใช้เป็นแบคทีเรียที่ผลิตสารควบคุมทางชีวภาพ (Gautam และคณะ, 2019) นอกจากนี้ *Bacillus* ยังเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและในภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด และมีความสามารถปกป้องพืชจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยหลั่งเอนไซม์ สารระเหย หรือสารออกฤทธิ์

ทางชีวภาพต่าง ๆ ได้หลายชนิด ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งรา ได้แก่ สารกลุ่มแบคทีริโอซิน (bateriocin), สารกลุ่มพอลิคีไทด์ (polyketide) และสารกลุ่มลิโพเปปไทด์ (lipopeptide) เป็นต้น (Fira และคณะ, 2018)

ปัจจุบัน *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ถูกนำมาศึกษาเพื่อยับยั้งราที่ก่อโรคไหม้ในข้าว โดยมีรายงานว่า *Bacillus subtilis* T429 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากพืชของต้นข้าว สามารถยับยั้ง *Magnaporthe grisea* ที่ก่อโรคใบไหม้ในข้าว ทำให้สูญเสียผลผลิตข้าว โดยพบว่า *B. subtilis* T429 สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไมโทคอนเดรียลดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้าง ATP และนอกจากนี้แบคทีเรียดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการสร้างเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเส้นใยของรา ซึ่งส่งผลต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วของเส้นใยราได้ และงานวิจัยนี้ยังพัฒนาต่อยอดโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปผ่านกระบวนการสเปรย์ดรายด์ (spray drying) เพื่อยืดอายุการทำงานและเพิ่มความกระจายตัวของสารเมแทบอไลต์ เมื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคพบว่ามีประสิทธิภาพที่สูงกว่าการใช้ไตรไซคลาโซล (tricyclazole) ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Meng และคณะ, 2015)

Bacillus safebsis B21 ที่แยกได้จากผลของต้นหอมหมื่นลี้ (*Osmanthus fragrans* Lour.) มีความสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญเส้นใยของ *Magnaporthe oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าว โดยจากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าเป็นสารกลุ่มลิโพเปปไทด์ ซึ่งได้แก่ สารอิทูริน (iturin) A2 และอิทูริน A6 โดยสารชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยรา โดยปรับเปลี่ยนสมบัติการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์รา ทำให้เกิดการเลือกผ่านสารเข้าเซลล์ผิดปกติ เส้นใยมีลักษณะบวม และส่งผลทำให้ไม่สามารถเจริญได้ (Rong และคณะ, 2020)

Bacillus methylotrophicus สายพันธุ์ BC79 ที่แยกได้จากดิน พบว่ามีความสามารถผลิตกรดเฟนอะมิโนเมธิลอะซีติก (phenaminomethylacetic acid) ซึ่งมีสมบัติยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกสปอร์ของ *M. oryzae* นอกจากนี้พบว่ากรดชนิดนี้ ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว ทำให้ได้ผลผลิตข้าวที่สูงขึ้นอีกด้วย (Shan และคณะ, 2013)

จากศักยภาพในการควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากราของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ทำให้ถูกนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งสะดวกต่อการใช้งาน อีกทั้งยังสามารถสร้างรายได้ และเป็นการรณรงค์ให้เกษตรกรใช้ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพแทนการใช้สารเคมีอีกด้วย โดยผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปของผงสำเร็จ ตัวอย่างเช่น การทำผงสำเร็จของ *Bacillus* เพื่อนำไปควบคุมโรคเหี่ยวในมันฝรั่ง ที่พบว่าสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 12 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง และสามารถเก็บได้นาน 15 เดือนในตู้เย็น (บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และคณะ, 2555)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้ง

การค้นหาภาวะที่เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งถือได้ว่าเป็นอีกหนึ่งสิ่งที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปปรับใช้งานจริงในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงต้องมีการประเมินความต้องการในการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ รวมถึงการเจริญของรา และสิ่งแวดล้อมที่ต้นพืชเจริญอยู่ด้วย (Yi และคณะ, 2015)

โดยปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียโดยทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิ, สารอาหาร, pH และเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญ เป็นต้น ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการศึกษาภาวะต่าง ๆ เพื่อหาภาวะที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งราได้ที่สุด ได้แก่

Bacillus amyloliquefaciens BLB371 ที่แยกได้จากดินของประเทศตูนีเซีย พบว่ามีศักยภาพยับยั้ง *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราเทา (grey mold disease) ในมะเขือเทศ คณะผู้วิจัยศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของ เพปโทน, ซูโครส และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้ผลว่าที่ความเข้มข้นของเพปโทน, ซูโครส และสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมที่ 20 กรัม/ลิตร, 25 กรัม/ลิตร, และ 4.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เป็นส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้แบคทีเรียผลิตสารยับยั้งราได้ดีที่สุด (Mezghanni และคณะ, 2012)

Bacillus megaterium ที่แยกได้จากดินบริเวณรากของขมิ้น พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่ก่อโรคในเผือก Cocoyam (*Colocasia esculentus*) ซึ่งเป็นพืชผลผลิตที่สำคัญของประเทศไนจีเรีย โดยผู้วิจัยศึกษาหาภาวะการเลี้ยงแบคทีเรียที่ค่า pH 3, 4, 5, 6, 7 และ 8, แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ ไซโลส, ซูโครส, กลูโคส และแลคโตส, อายุของเชื้อที่ 24 – 120 ชั่วโมง, และอุณหภูมิเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ ได้แก่ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าที่ภาวะค่า pH 6 โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน, อายุของเชื้อ 96 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำให้แบคทีเรียสามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้ดีที่สุด (Mbajiuka และคณะ, 2019)

Bacillus subtilis CCMI 355 ที่แยกได้จากดิน พบว่ามีศักยภาพยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *B. cinerea*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma* sp, *Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii* และ*Trichoderma virgatum* ผู้วิจัยศึกษาภาวะที่แบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของรา โดยศึกษาทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ ค่า pH (pH = 6, 7 และ 8), อุณหภูมิบ่ม (23, 30 และ 37 องศาเซลเซียส), และความเร็วการกวน (0, 60 และ 120 rpm) ผลการทดลองพบว่าที่ภาวะค่า pH 8, บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และไม่มีการกวน เป็นภาวะที่ *B. subtilis* CCMI 355 ผลิตสารยับยั้งราได้มีประสิทธิภาพที่สุด (Moita และคณะ, 2005)

ในการทดลองนี้ จะศึกษาการควบคุมทางชีวภาพสำหรับ *P. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าว โดยการค้นหาแบคทีเรียปฏิปักษ์จากแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี (คง

ยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) และคัดแยกมาจากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง (ดรุณี จิวเจริญ, 2555) ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งราได้หลายชนิด นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุของการเกิดโรคไหม้ในข้าว จากนั้นหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์การทดลอง

เพื่อหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Pyricularia oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว และหาภาวะที่แบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งรา โดยมีเป้าหมายเพื่อนำไปใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพต่อราโรคพืชแทนการใช้ยาฆ่าราในปัจจุบัน

บทที่ 2

เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1 เครื่องมือ

1. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. เครื่องแก้ว ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Pyrex, USA
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scienctific, US
4. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Science, USA
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น T-42K ของบริษัท Beckman, USA
7. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries., USA
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
9. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
10. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 15X60 มิลลิเมตร ของบริษัท Bioscan, Thailand
11. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
12. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น j2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
13. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
14. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
15. ไมโครปิเปตและทิปรุ่น P200 และ P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Nichiryo, Japan
16. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
17. Cock Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
2. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Productora the Agar SA, Chili
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
5. อาหารสำเร็จรูป TSB (Tryptic Soy Broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
6. อาหารสำเร็จรูป NB (Nutrient Broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
7. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท Himedia, india

2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไพเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
8F	5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´	(Kaewklom, 2014)
1492R	5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3´	(Kaewklom, 2014)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียจากงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) และคัดแยกมาจากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง (ดรุณี จิวเจริญ, 2555) ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae*

2.1 การเตรียมแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ จากงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ N1, N3, TW1-1ng, TD12-11, M10, M22, M23, M25, M26 และ M27 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 การเตรียม *P. oryzae*

เลี้ยงรา *P. oryzae* บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-5 วัน

2.3 การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ด้วยวิธี dual culture

ทดสอบการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture โดยนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ข้างต้นมาเลี้ยงร่วมกับราบนอาหารแข็ง PDA เจาะชิ้นวุ้นของรา (agar plug) บริเวณขอบของโคโลนีรา โดยใช้ cork borer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำมาวางบนอาหาร PDA โดยให้วุ้นด้านที่มีราสัมผัสกับผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นขีดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลงบนอาหารที่มีชิ้นวุ้นรา ยาว 2 เซนติเมตร โดยให้ตำแหน่งการขีดแบคทีเรียห่างจากชิ้นวุ้นของรา 2.5 เซนติเมตร ดังรูปที่ 5 สำหรับชุดควบคุม นำชิ้นวุ้นของราวางไว้ตำแหน่งเดียวกันกับชุดทดสอบ โดยไม่มีการขีดแบคทีเรีย

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-6 วัน วัดขนาดรัศมีการเจริญของราโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยวัดตั้งแต่บริเวณปลายสุดของโคโลนีราที่มีการเจริญ จากด้านที่ขีดแบคทีเรีย ผ่านจุด

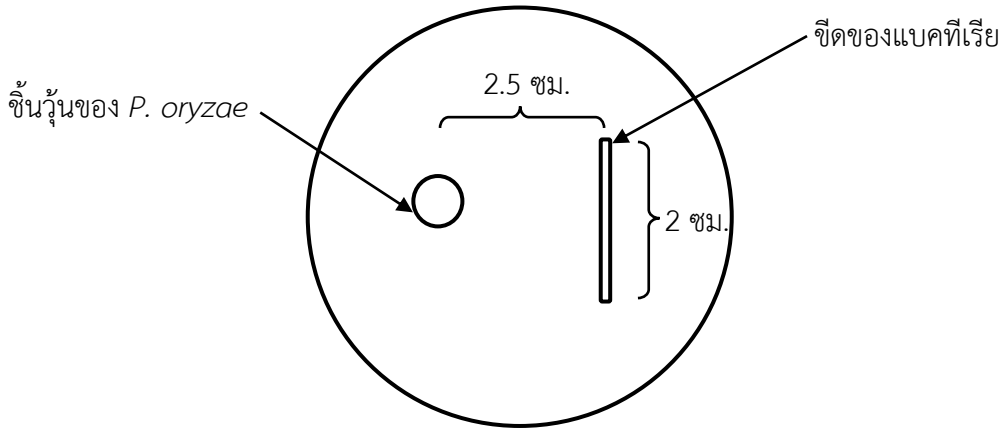
กึ่งกลางชิ้นวุ้นรา จนถึงปลายสุดของโคโลนีอีกด้านหนึ่ง และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรด้านล่าง (ธารทิพย์ รัตนะ, 2016) โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เลือกแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก เพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ต่อไป

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดควบคุม (มิลลิเมตร)

B คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดทดสอบ (มิลลิเมตร)



<u>รูปที่ 5</u>: การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ด้วยวิธี dual culture

2.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ (cell free supernatant)

นำแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งราได้ดีที่สุด ซึ่งได้จากการทดสอบด้วยวิธี dual cuture มาใช้ในการทดสอบนี้

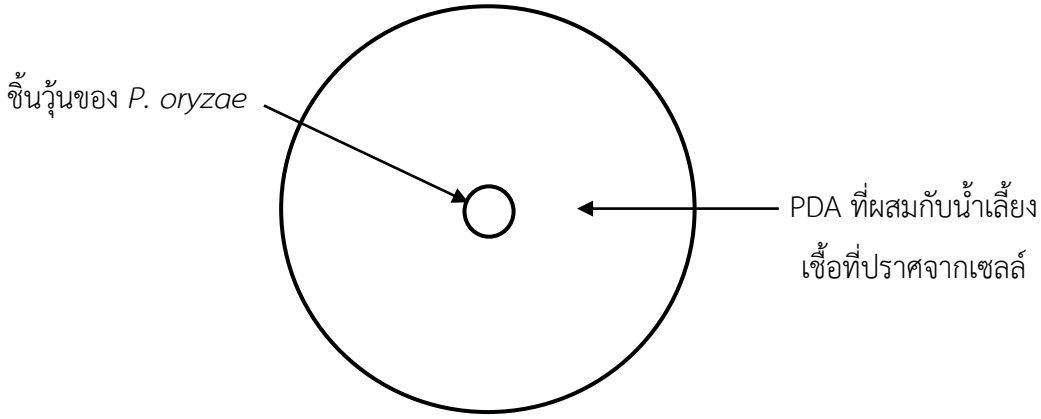
2.4.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมีเตอร์ ให้มีค่าประมาณ 0.5 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB ขวดใหม่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไปกรองเซลล์ โดยใช้ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อ Millipore filter ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมครอน ซึ่งจะได้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์

2.4.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ผสมกับอาหารแข็ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียมาผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 2:10 โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ 10 มิลลิลิตร ผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงจานเพาะเชื้อตั้งไว้ให้อาหารแข็ง แล้วเจาะชิ้นวุ้นของราบริเวณขอบของโคโลนีรา โดยใช้ cork borer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และนำชิ้นวุ้นของราวางลงบนจุดกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ ดังรูปที่ 6 สำหรับชุดควบคุม นำชิ้นวุ้นของราวางไว้ตรงกลางอาหารเพียงอย่างเดียว

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6-7 วัน วัดขนาดรัศมีการเจริญของราโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยวัดตั้งแต่บริเวณปลายสุดของโคโลนีราที่มีการเจริญ จากด้านที่ขีดแบคทีเรีย ผ่านจุดกึ่งกลางชิ้นวุ้นรา จนถึงปลายสุดของโคโลนีอีกด้านหนึ่ง และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ



รูปที่ 6: การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์

3. การทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *P. oryzae*

หาภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย โดยภาวะที่ใช้ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ, pH และอุณหภูมิ

3.1 การทดสอบหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือกนำมาทดสอบได้แก่ Luria-Bertani (LB), Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก3) และ Tryptic Soy Broth (TSB) (ภาคผนวก ก4)

3.1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมีเตอร์ ให้มีค่าประมาณ 0.5 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB, NB และ TSB ขวดใหม่ แต่ละขวดมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไปกรองเซลล์ โดยใช้ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อ Millipore filter ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมครอน จะได้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB, NB และ TSB แบบผสมกับอาหารแข็ง

นำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB, NB และ TSB ผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 2:10 โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ 10 มิลลิลิตร ผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงจานเพาะเชื้อ ตั้งไว้ให้อาหารแข็ง วางชิ้นวุ้นของราลงบนจุดกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ ดังรูปที่ 6 สำหรับชุดควบคุม วางชิ้นวุ้นของราลงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6-7 วัน วัดขนาดรัศมีการเจริญของราหน่วยเป็นมิลลิเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

3.2 การทดสอบหาค่า pH ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย

เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราที่ดีที่สุดจากข้อ 3.1.2 มาปรับค่า pH เพื่อหา pH ที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งรา โดยค่า pH ที่นำมาทดสอบได้แก่ 6, 7 และ 8

3.2.1 การเตรียมอาหารเหลวที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7 และ 8

เตรียมอาหารเหลวที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีค่า pH ที่ 6, 7, และ 8 ด้วย 1M HCl และ 1M NaOH

3.2.2 การเตรียมแบคทีเรีย

นำโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมีเตอร์ ให้มีค่าประมาณ 0.5 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลวที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH เป็น 6, 7 และ 8 บ่มเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไปกรองเซลล์ โดยใช้ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจาก

เชื้อ Millipore filter ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมครอน จะได้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมที่ปรับค่า pH 6, 7 หรือ 8 แบบผสมกับอาหารแข็ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมที่ปรับค่า pH 6, 7 หรือ 8 ผสมกับ PDA ในอัตราส่วน 2:10 โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ 10 มิลลิลิตร ผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงจานเพาะเชื้อตั้งไว้ให้อาหารแข็ง วางชิ้นวุ้นของราลงบนจุดกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ ดังรูปที่ 6 สำหรับชุดควบคุม วางชิ้นวุ้นของราลงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6-7 วัน วัดขนาดรัศมีการเจริญของราหน่วยเป็นมิลลิเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เลือกภาวะค่า pH ที่เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

3.3 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.2 ซึ่งมีค่า pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.3 ที่เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุด นำมาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งรา โดยอุณหภูมิที่นำมาทดสอบได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

3.3.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมีเตอร์ ให้มีค่าประมาณ 0.5 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลวที่เหมาะสม ที่มีค่า pH ที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไปกรองเซลล์ โดยใช้ชุดกรองสารตัวอย่าง

ให้ปราศจากเชื้อ Millipore filter ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมครอน จะได้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่แต่ละอุณหภูมิ

3.3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส แบบผสมกับกับอาหารแข็ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ในอาหารเหลวที่เหมาะสม ที่ pH ที่เหมาะสม ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ผสมกับ PDA ในอัตราส่วน 2:10 โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ 10 มิลลิลิตร ผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงจานเพาะเชื้อ ตั้งไว้ให้อาหารแข็ง วางชิ้นวุ้นของราลงบนจุดกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ ดังรูปที่ 6 สำหรับชุดควบคุม วางชิ้นวุ้นของราลงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6-7 วัน วัดขนาดรัศมีการเจริญของราหน่วยเป็นมิลลิเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

เลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ได้ดีที่สุด นำมาระบุเอกลักษณ์ ดังนี้

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเซลล์โดยการย้อมแกรม (Gram stain)

4.2 การทดสอบทางชีวเคมี

4.2.1 ทดสอบความสามารถการใช้ออกซิเจนในการเจริญของแบคทีเรีย

4.2.2 ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส

4.2.3 ทดสอบสมบัติในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

โดยสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) จากนั้นส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่ได้มาจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 9F และ 1510R

4.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit เลี้ยงแบคทีเรียให้อยู่ในช่วง log phase ในอาหารเหลว LB ถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อครั้งละ 1 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติม TE Buffer 100 ไมโครลิตร ลงในตะกอนเซลล์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) และเติมไลโซไซม์ (lysozyme) 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปเติม TE buffer 100 ไมโครลิตร ที่ผสมกับโปรตีเนสเค (Proteinase K) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม RNase A 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้ายส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม BL buffer 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 100% เอทานอล 220 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นใส่สารละลายลงใน HiBind® DNA Mini Column ซึ่งวางซ้อนอยู่กับหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายที่กรองได้ออก นำ HiBind® DNA Mini Column ใส่ซ้อนกลับไปที่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร และเติม HBC buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายที่กรองได้ออก จากนั้นเติม DNA Wash buffer 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่กรองได้ออก และใส่คอลัมน์กลับไปที่หลอดเดิม ล้างด้วย DNA Wash buffer 700 ไมโครลิตร ซ้ำ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนสารละลายออก

แล้วนำคอลัมน์ใส่กลับไปที่หลอดเดิม ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นนำ HiBind® DNA Mini Column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ขนาด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติม elution buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.3.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 4.3.1 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งในหลอดปฏิกิริยาปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยส่วนประกอบ ดังนี้

5X PCR buffer	10 ไมโครลิตร
50 μM 8F (forward primer)	1.0 ไมโครลิตร
50 μM 1492R (reverse primer)	1.0 ไมโครลิตร
20 mM dNTPs	1.0 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1.0 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase ((1–5 units/μL)	0.25 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่อง PCR (Biorad) และปรับอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนด (Kaewklom และคณะ, 2014) ดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที	

4.3.3 การทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 4.3.2 มาทำอีเล็กโทรโฟเรซิสบนอะกาโรสเจลในบัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE) (ภาคผนวก ข1) โดยเตรียม 0.9% อะกาโรสเจลที่มีสีย้อมดีเอ็นเอ SERVA DNA stain G (Serva Electrophoresis Gmbh, Germany) (ภาคผนวก ข2) โหลดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็น 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) ลงในช่องใส่ตัวอย่าง ทำอีเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีเคลื่อนที่มาเกือบถึงปลายสุดของอะกาโรสเจล นำเจลออก แล้วนำไปส่องใต้ UV ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.3.4 การทำบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอออกจากเจล

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ ดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป GeneJet Gel extraction kit (Thermo Scientific, USA) โดยตัดเจล บริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการละลายใน binding buffer ปริมาตรเท่ากับเจล ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ประกอบคอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์เข้ากับหลอดเก็บสารละลาย จากนั้นใส่สารละลายเจลลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วเติม wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงต่ออีก 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เปล่ามาประกอบเข้ากับคอลัมน์แทนหลอดเก็บสารละลาย ใส่ elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอ แล้ววัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nanodrop; Thermo Scientific, USA)

4.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วในข้อ 4.3.4 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยบริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเตรียมแบคทีเรีย

จากการนำแบคทีเรียจากงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) และคัดแยกมาจากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง (ดรุณี จิวเจริญ, 2555) ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้แบคทีเรียทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ N1, N3, TW1-1ng, TD12-11, M10, M22, M23, M25, M26 และ M27

2. การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae*

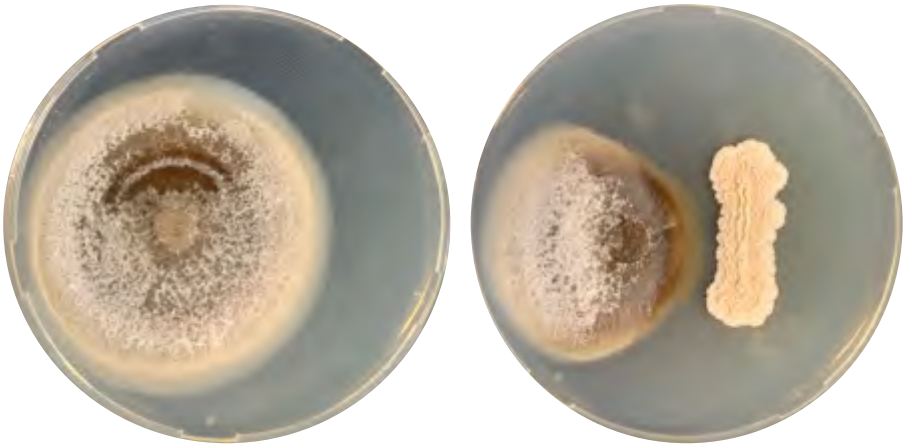
นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ จึงนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae*

2.1 การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ด้วยวิธี dual culture

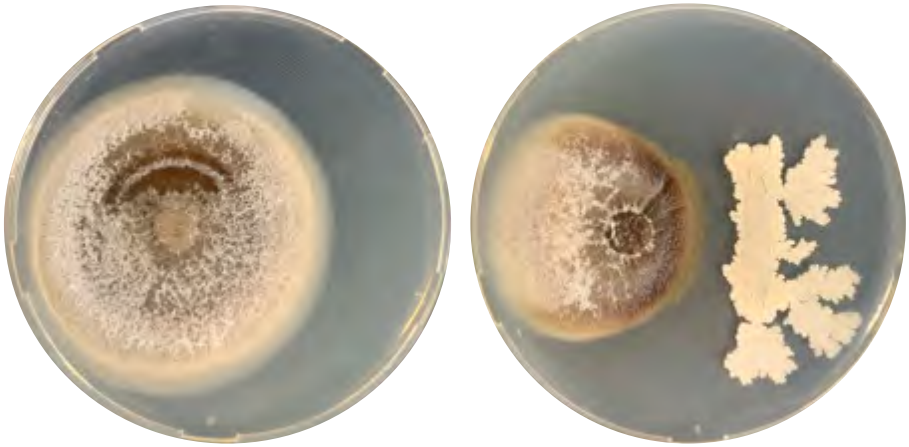
จากการนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ข้างต้นมาเลี้ยงร่วมกับราบนอาหารแข็ง PDA โดยการนำชิ้นวุ้นรามาวางบนอาหาร PDA โดยให้วุ้นด้านที่มีราสัมผัสกับผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นขีดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ยาว 2 เซนติเมตร โดยให้ตำแหน่งการขีดแบคทีเรียห่างจากชิ้นวุ้นของรา 2.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-6 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งนำชิ้นวุ้นของราวางไว้ตำแหน่งเดียวกันกับชุดทดสอบ โดยไม่มีการขีดแบคทีเรีย วัดขนาดรัศมีการเจริญของราโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่า แบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 7-16

ตารางที่ 1: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
N1	40 ± 0.41	22.7 ± 1.23	43.33
N3	40 ± 0.41	21.3 ± 1.25	46.67
TW1-1ng	40 ± 0.41	22.0 ± 1.63	45.00
TD12-11	40 ± 0.41	24.7 ± 1.70	38.33
M10	40 ± 0.41	22.3 ± 0.94	44.07
M22	40 ± 0.41	21.0 ± 2.16	47.50
M23	40 ± 0.41	20.7 ± 0.94	48.33
M25	40 ± 0.41	20.0 ± 0.82	50.00
M26	40 ± 0.41	18.0 ± 1.63	55.00
M27	40 ± 0.41	21.0 ± 2.16	47.50

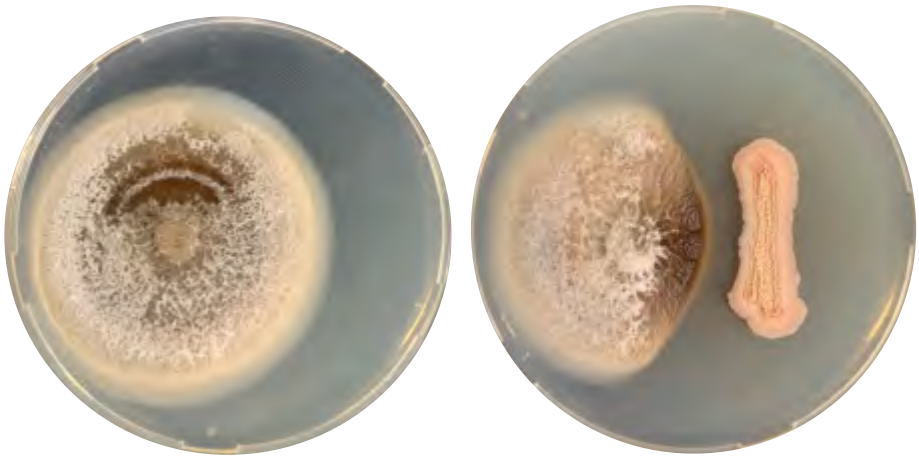


รูปที่ 7: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ N1 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

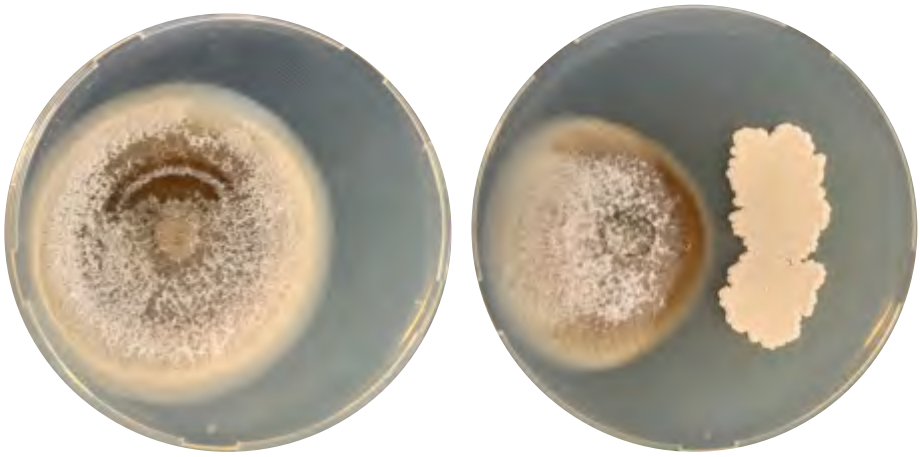


รูปที่ 8: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ N3 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

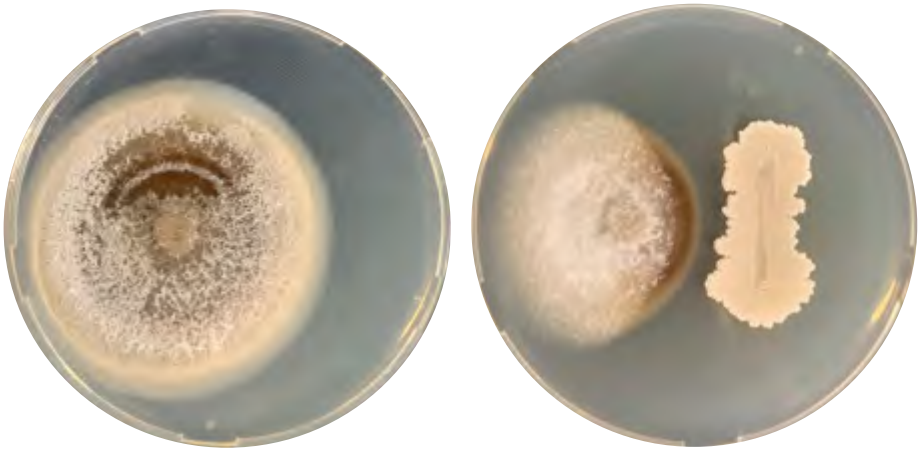
รูปที่ 9: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ TW1-1ng (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



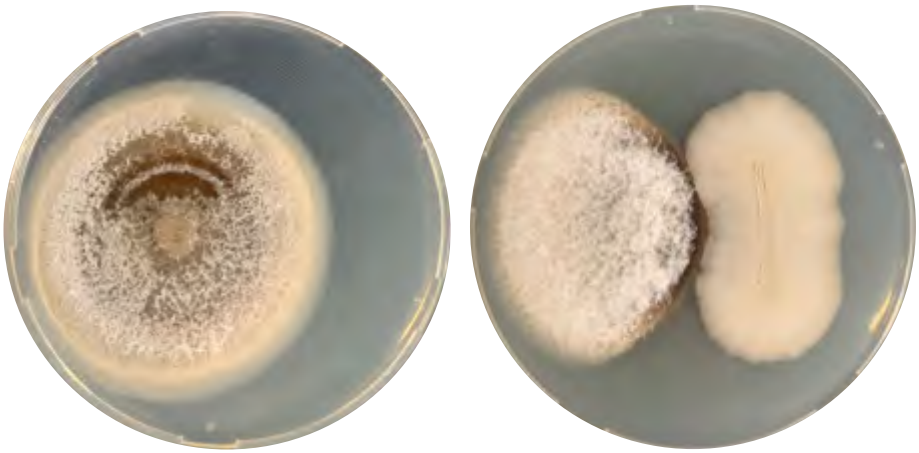
รูปที่ 10: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ TD12-11 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



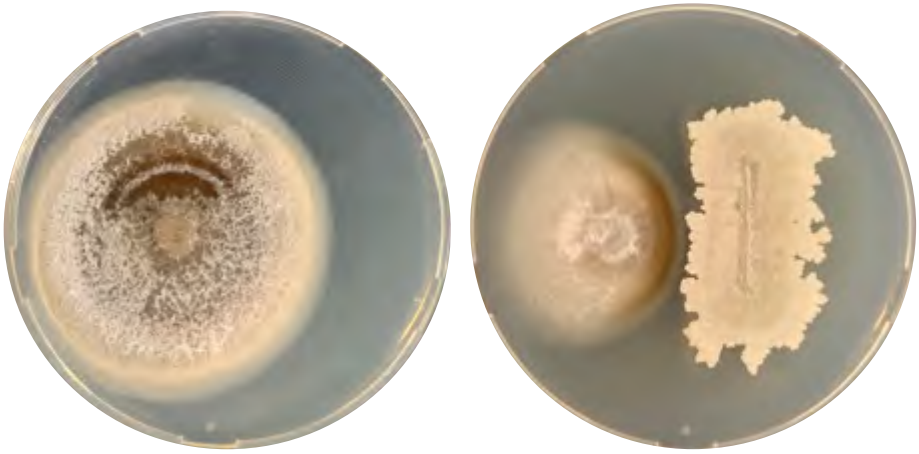
รูปที่ 11: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M10 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



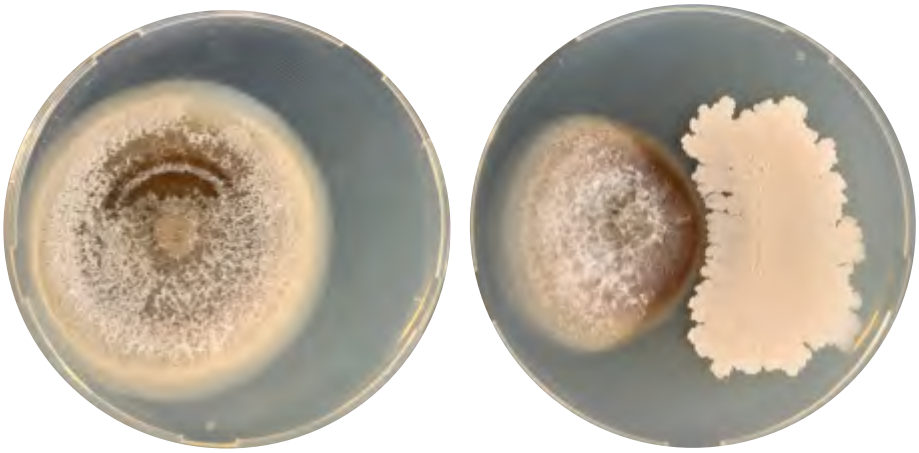
รูปที่ 12: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M22 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 13: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M23 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 14: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M25 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 15: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M26 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

รูปที่ 16: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยสายพันธุ์ M27 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

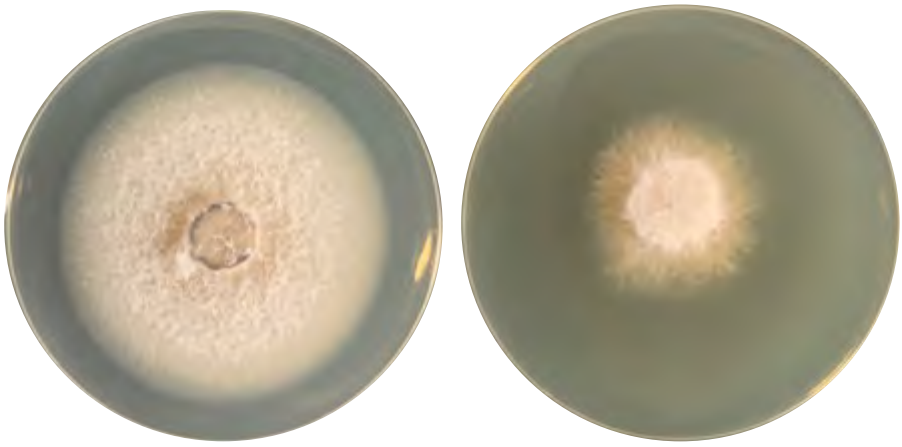
จากตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ของแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่แสดงความสามารถยับยั้งราได้สูงที่สุด ได้แก่ สายพันธุ์ M23, M25 และ M26 โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 48.33, 50.00 และ 55.00% ตามลำดับ จึงเลือก 3 สายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อนำไปศึกษาความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ (cell free supernatant) ในการทดลองต่อไป

2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ (cell free supernatant)

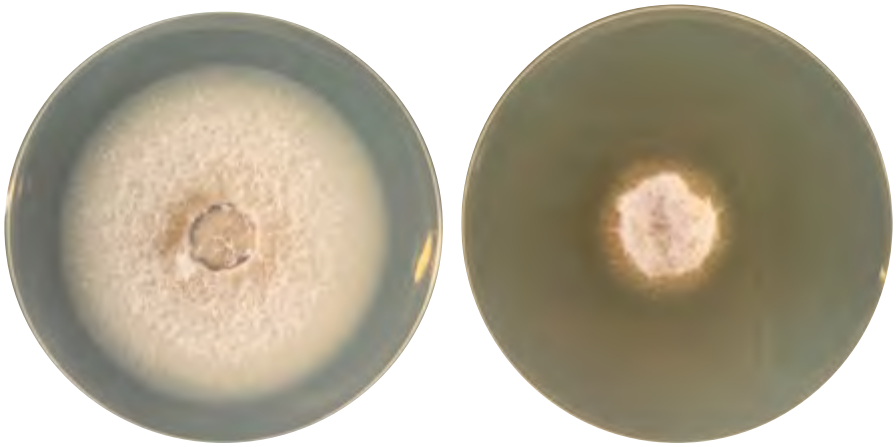
จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ M23, M25 และ M26 ที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสูงสุดในการทดลองด้วยวิธี dual culture มาผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 2:10 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางชิ้นวุ้นของราไว้ตรงกลางอาหารเพียงอย่างเดียว เมื่อวัดขนาดรัศมีการเจริญของราโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 17-19

ตารางที่ 2: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์

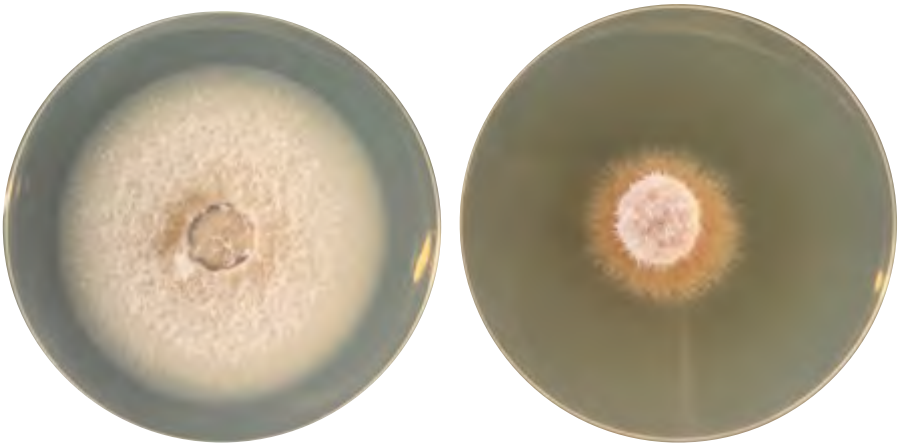
สายพันธุ์แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
M23	41 ± 0.82	26.0 ± 0.41	36.58
M25	41 ± 0.82	18.8 ± 0.47	54.07
M26	41 ± 0.82	22.2 ± 0.85	45.53



รูปที่ 17: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 18: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 19: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

จากตารางที่ 2 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงถึงความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ 54.07% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M26 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 45.53% และสายพันธุ์ M23 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 36.58% จึงนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปทดสอบเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *P. oryzae* ซึ่งได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, pH และอุณหภูมิ

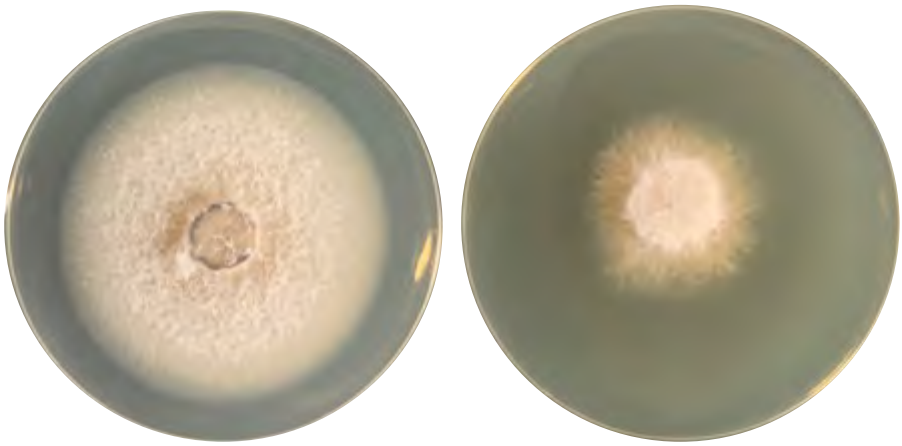
3. การทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *P. oryzae*

3.1 การทดสอบหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย

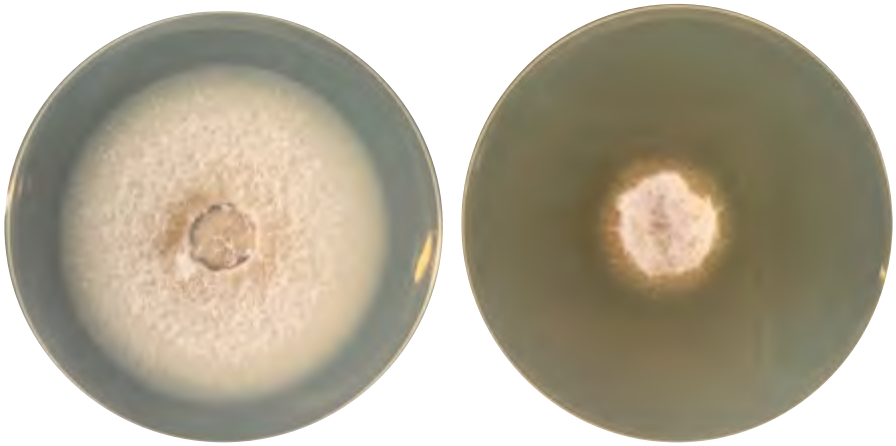
จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB, NB และ TSB มาผสมกับ PDA ในอัตราส่วน 2:10 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่นำชิ้นวุ้นของราวางไว้ตรงกลางอาหารเพียงอย่างเดียว จากการวัดขนาดรัศมีการเจริญของราโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 20-28

ตารางที่ 3: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB, NB และ TSB

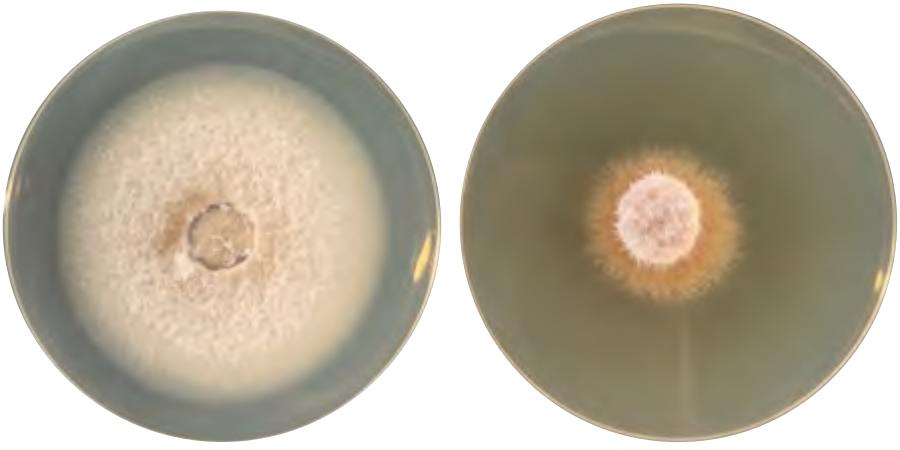
อาหารเลี้ยงเชื้อ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
		ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
LB	M23	41 ± 1.08	26.0 ± 0.41	36.58
	M25	41 ± 1.08	18.8 ± 0.47	54.07
	M26	41 ± 1.08	22.2 ± 0.85	45.53
NB	M23	41 ± 1.08	35.3 ± 0.24	13.82
	M25	41 ± 1.08	30.5 ± 0.41	25.61
	M26	41 ± 1.08	26.8 ± 0.62	34.55
TSB	M23	41 ± 1.08	33.2 ± 0.62	19.10
	M25	41 ± 1.08	28.5 ± 0.41	30.49
	M26	41 ± 1.08	28.0 ± 0.41	31.71



รูปที่ 20: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร LB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



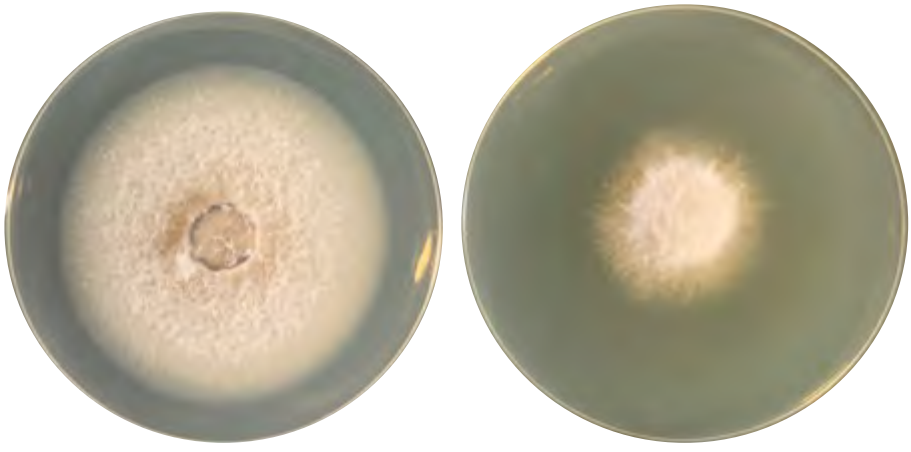
รูปที่ 21: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



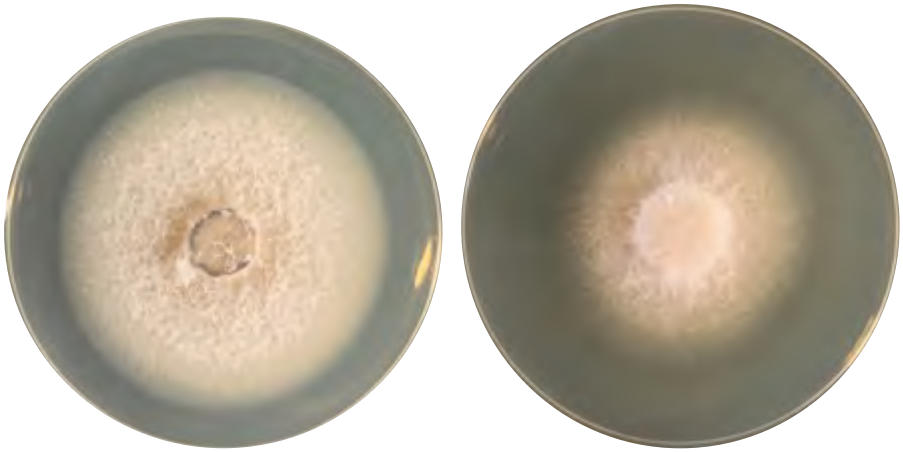
รูปที่ 22: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร LB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

รูปที่ 23: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร NB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

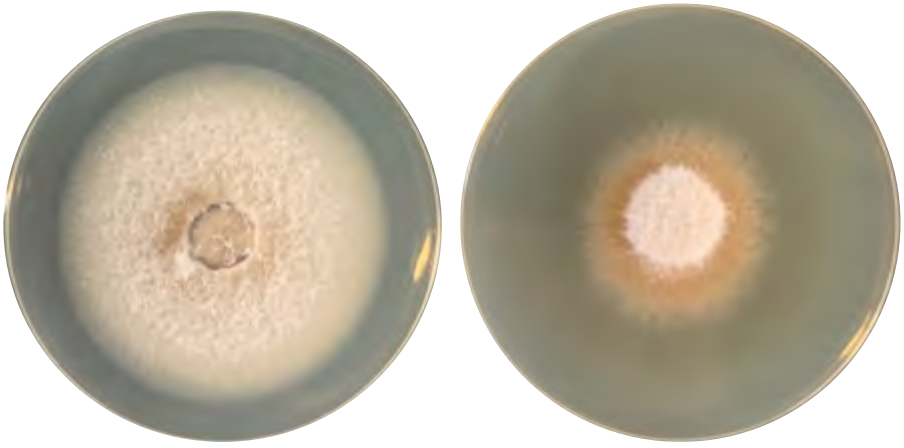
รูปที่ 24: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร NB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



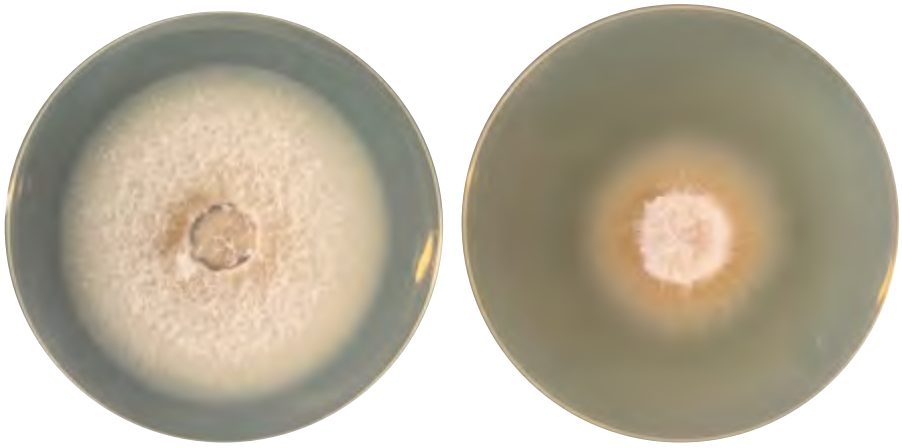
รูปที่ 25: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร NB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 26: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 27: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 28: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

จากตารางที่ 3 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร LB, NB และ TSB แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร LB มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงที่สุด โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 54.07% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M26 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 45.53% และสายพันธุ์ M23 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 36.58% ความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร NB พบว่า สายพันธุ์ M26 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด รองลงมาเป็นสายพันธุ์ M25 และสายพันธุ์ M23 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็น 34.55, 25.61 และ 13.82% ตามลำดับ ความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSB มีอันดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราจากมากไปน้อยคือ สายพันธุ์ M26 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 31.71% รองลงมาคือสายพันธุ์ M25 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 30.49% และสุดท้ายคือสายพันธุ์ M23 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 19.10% จากผลการทดลองแสดงว่าอาหาร LB ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุด ซึ่งในการทดลองนี้ไม่มีการปรับค่า pH ของอาหาร จึงเลือกใช้อาหาร LB เพื่อศึกษาภาวะค่า pH และอุณหภูมิเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราต่อไป

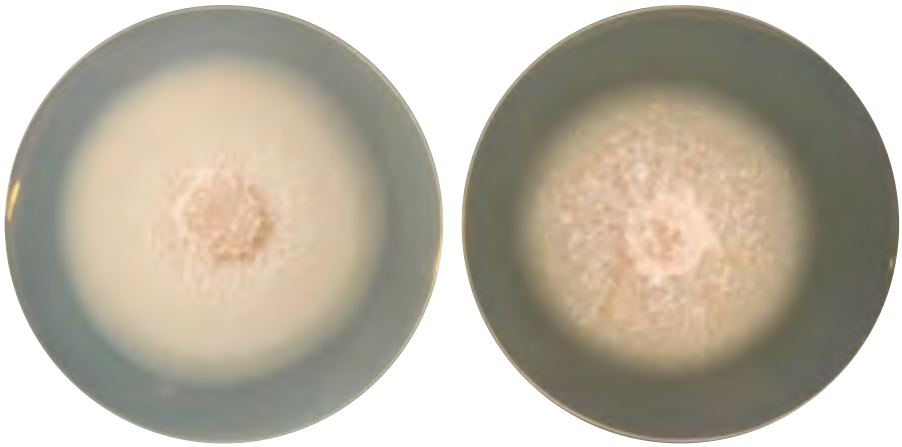
3.2 การทดสอบหาค่า pH ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่ปรับค่า pH ให้เป็น pH 6, 7 และ 8 ด้วย 1M HCl หรือ 1M NaOH ผสมกับ PDA ในอัตราส่วน 2:10 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่นำชิ้นวุ้นของราวางไว้ตรงกลางอาหารเพียงอย่างเดียว เมื่อวัดขนาดรัศมีการเจริญของราโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพื่อหาค่า pH ที่เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุด พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารที่ค่า pH ทั้ง 3 ค่า สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 29-37

ตารางที่ 4: ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6, 7 และ 8

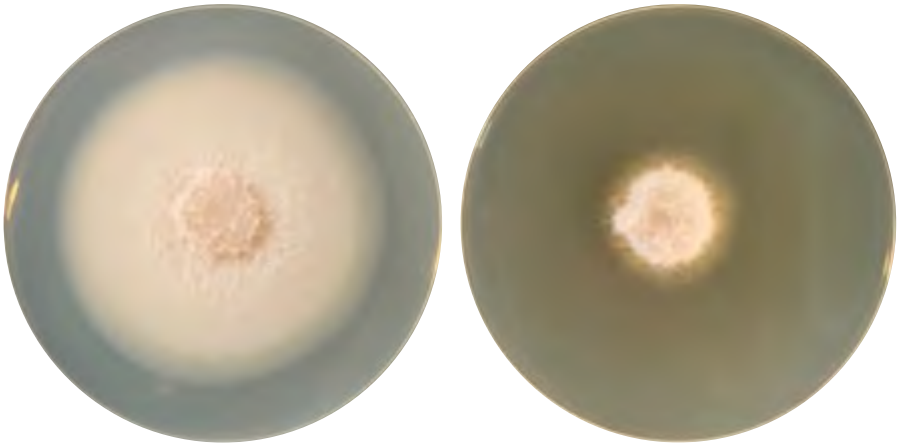
pH	สายพันธุ์แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
		ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
6	M23	40 ± 0.82	37.2 ± 0.24	7.08
	M25	40 ± 0.82	33.5 ± 0.41	16.25
	M26	40 ± 0.82	38.2 ± 0.24	4.58
7	M23	40 ± 0.82	16.3 ± 0.24	59.17
	M25	40 ± 0.82	12.8 ± 0.24	67.92
	M26	40 ± 0.82	15.8 ± 0.24	60.42
8	M23	40 ± 0.82	36.0 ± 0.82	10.00
	M25	40 ± 0.82	33.5 ± 0.41	16.25
	M26	40 ± 0.82	35.7 ± 0.62	10.83

รูปที่ 29: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

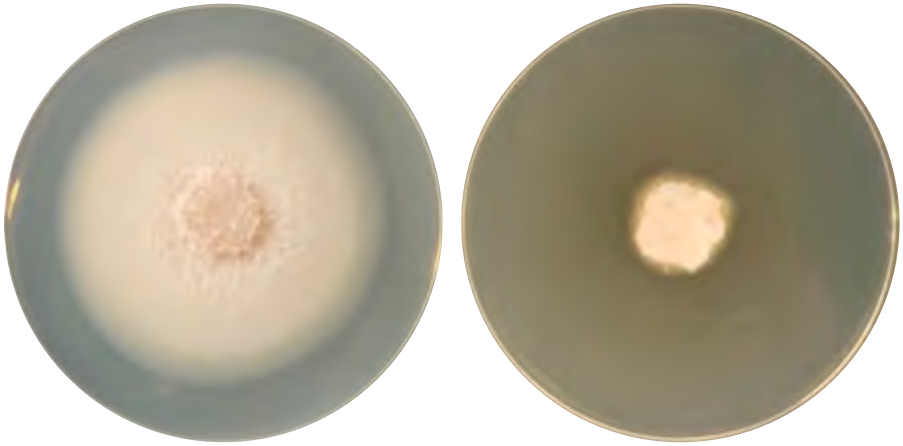


รูปที่ 30: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

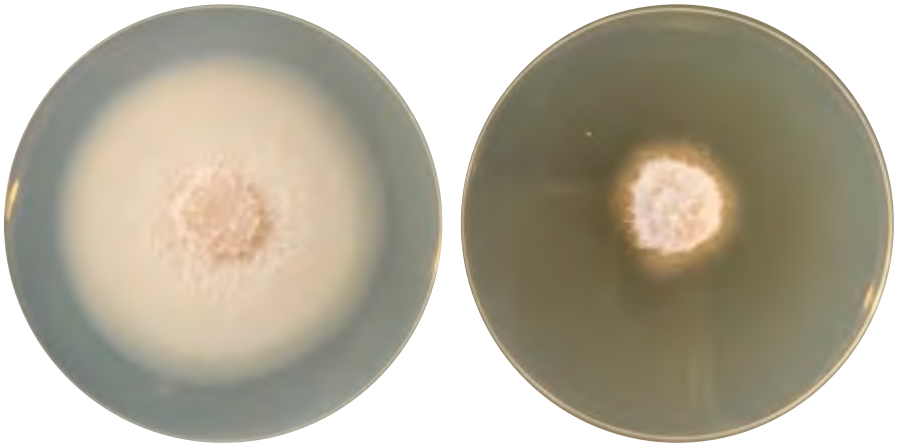
รูปที่ 31: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



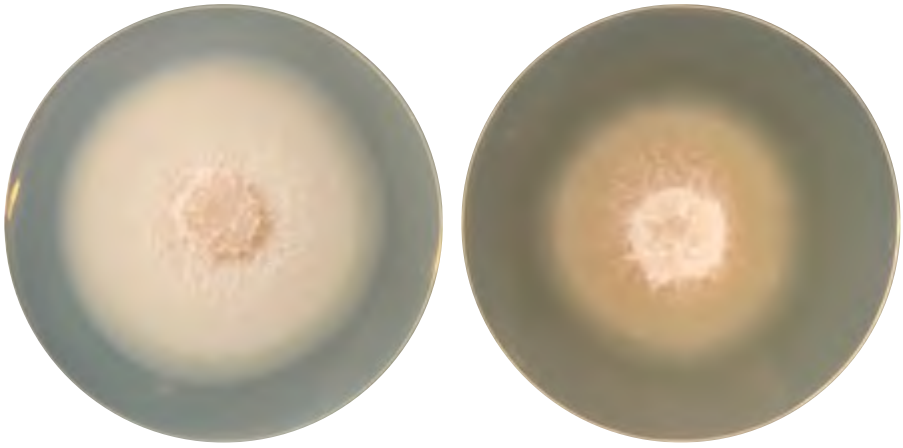
รูปที่ 32: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 7 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



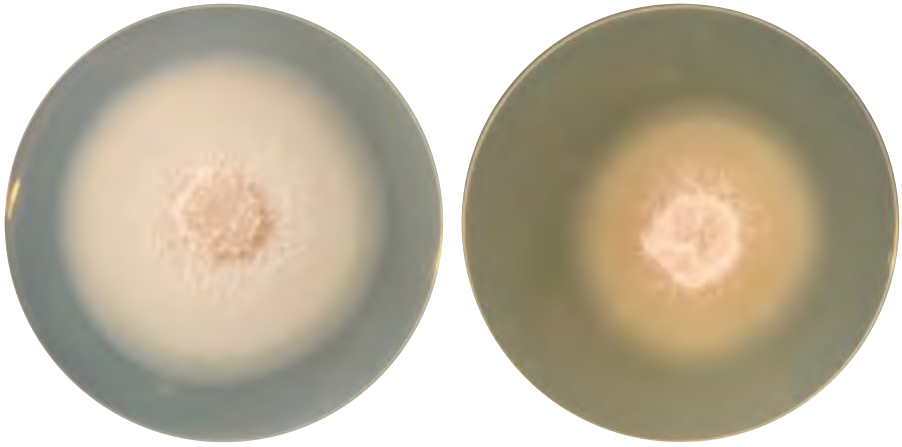
รูปที่ 33: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 7 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



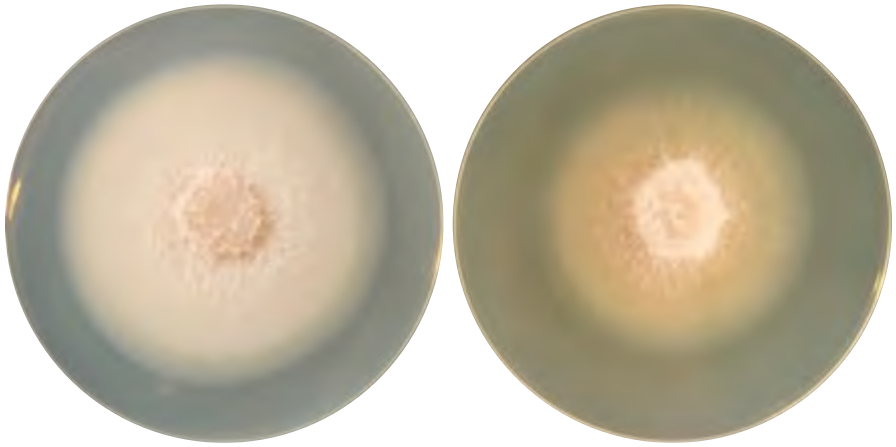
รูปที่ 34: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 7 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 35: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M23 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 8 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 36: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 8 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)



รูปที่ 37: การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ M26 ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 8 (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ซ้าย)

จากตารางที่ 4 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6, 7 และ 8 แสดงให้เห็นว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH เท่ากับ 7 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงที่สุด โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 67.92% รองลงมาคือสายพันธุ์ M26 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 60.42% และสายพันธุ์ M23 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 59.17% ความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 6 พบว่า สายพันธุ์ M25 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุดเช่นเดียวกับ ที่ pH 7 รองลงมาเป็นสายพันธุ์ M23 และสายพันธุ์ M26 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็น 16.25, 7.08 และ 4.58% ตามลำดับ ความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH 8 มีอันดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราจากมากไปน้อยคือ สายพันธุ์ M25 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 16.25% รองลงมาคือสายพันธุ์ M26 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 10.83% และสุดท้ายคือสายพันธุ์ M23 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 10.00% ซึ่งลำดับความสามารถในการยับยั้งเหมือนที่ pH 7 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่า ภาวะอาหาร LB ที่ pH เท่ากับ 7 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้อาหาร LB ที่ปรับภาวะเป็น pH 7 ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมและเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราต่อไป

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับหากทำการทดลองครบ

สำหรับการทดลองที่เหลือ คือการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย ผลการทดลองที่มีทำให้ทราบถึงอาหารและค่า pH ของอาหารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรีย หากทำการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสม คาดว่าสามารถทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่ดีขึ้นได้ และเมื่อทราบอุณหภูมิที่แบคทีเรียต้องการทำให้ได้ข้อมูลภาวะอาหาร ค่า pH และอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถนำภาวะที่ได้ไปศึกษาหาช่วงเวลาในการบ่มแบคทีเรียว่าที่ช่วงเวลาใดที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารชีวภาพที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งราสูงที่สุด หลังจากที่ได้ความสามารถในการยับยั้งราของแบคทีเรีย ซึ่งแสดงออกมาในรูปแบบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของทั้ง 3 สายพันธุ์ ต้องพิจารณาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งที่ได้ว่า จากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นั้น สายพันธุ์ใดให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่โดดเด่น แตกต่างกัน

อย่างไร เพื่อคัดเลือกไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย โดยจะเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถโดดเด่นที่สุด หรือหากมีสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงใกล้เคียงกันก็อาจนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด

ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราของแบคทีเรียที่คาดว่าจะได้ คาดว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส น่าจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่แบคทีเรียทั่วไปเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งหากแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีก็อาจนำไปสู่ความสามารถในการยับยั้งราที่ดี ทั้งนี้เป็นเพียงแค่การคาดการณ์เท่านั้น ยังมีความจำเป็นที่จะต้องทดลองเพื่อผลที่แน่ชัดต่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ได้จากแบคทีเรียที่เลี้ยงที่ภาวะที่เหมาะสม ผลที่ได้คาดว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ มีแนวโน้มที่จะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน การคาดการณ์นี้มาจากผลการทดลองก่อนหน้า ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพการยับยั้งราใกล้เคียงกัน ซึ่งหากผลการทดลองเป็นตามที่คาดนี้ จะนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียต่อไป

จากงานวิจัยก่อนหน้าได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ไว้เบื้องต้นแล้ว โดยเป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีรูปร่างเป็นแท่ง (bacilli) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ย้อมติดสีน้ำเงินของคริสตัลไวโอเลต ไม่มีเอนโดสปอร์ และการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ และจากการศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าสายพันธุ์ M25 และ M26 มีสมบัติในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบคู่มือ Practical Atlas for Bacterial Identification สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้ว่า สายพันธุ์ M23 คาดว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp., สายพันธุ์ M25 คาดว่าอยู่ในสกุล *Corynebacterium* sp. และสายพันธุ์ M26 คาดว่าอยู่ในสกุล *Coryophanon* sp. (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นเพียงการคาดการณ์เท่านั้น และควรพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของแบคทีเรียเหล่านี้ต่อไป

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการนำแบคทีเรียจากงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) และคัดแยกมาจากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง (ดรุณี จิวเจริญ, 2555) ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ มาตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Pyricularia oryzae* ด้วยวิธี dual culture โดยนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ข้างต้นมาเลี้ยงร่วมกับราบนอาหารแข็ง PDA โดยวางชิ้นวุ้นราบ่มที่อุณหภูมิห้องก่อนขีดแบคทีเรีย เป็นเวลา 3 วัน เนื่องจาก *P. oryzae* เป็นราที่โตช้า หากขีดแบคทีเรียพร้อมกับวางชิ้นวุ้นรา จะทำให้โคโลนีแบคทีเรียเจริญมาถึงชิ้นวุ้นราก่อนที่ราจะเจริญ ทำให้ราไม่สามารถเจริญได้ เมื่อวางชิ้นวุ้นราครบ 3 วัน โคโลนีราเกิดการเจริญ จึงขีดแบคทีเรียแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอีก 5-6 วัน พบว่าทั้ง 10 สายพันธุ์มีความสามารถยับยั้ง *P. oryzae* โดยสายพันธุ์ M23, M25 และ M26 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถยับยั้งสูงที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 48.33, 50.00 และ 55.00% ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ผสมกับอาหารแข็ง โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียมาผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 2:10 ซึ่งผลของการทดสอบพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 54.07% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M26 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 45.53% และสายพันธุ์ M23 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 36.58% จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ผสมกับอาหารแข็ง สามารถกล่าวได้ว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารต้านราและสามารถหลั่งสารต้านราที่สร้างขึ้นออกมานอกเซลล์ได้ แต่จากการทดลองนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าสารต้านราที่สร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์เป็นสารประเภทใด และมีกลไกในการควบคุมราอย่างไร จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ด้วยวิธี dual culture และทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ผสมกับอาหารแข็ง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ของการทดสอบ 2 วิธี ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน โดยวิธี dual culture นั้น มีลำดับการยับยั้งมากไปน้อยโดยสายพันธุ์ M26, M25 และ M23 ส่วนวิธีการทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ มีลำดับการยับยั้งมากไปน้อยโดยสายพันธุ์ M25, M26 และ M23 ซึ่งความแตกต่างของผลการทดลองนี้สามารถพบได้ทั่วไป เนื่องจากในบางกรณี แบคทีเรียบางชนิดอาจมีการผลิตสารยับยั้งราประเภทสารระเหย (volatile compound) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา (Islam และคณะ, 2018) ซึ่งกรณีนี้อาจพบว่าผลการยับยั้งด้วยวิธี dual culture มีแนวโน้มให้ผลการยับยั้งที่สูงกว่าเมื่อใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ นอกจากนี้อาจพบว่าราถูกยับยั้งได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่มีความสามารถเข้ายึดครองแย่งพื้นที่ในการเจริญได้ดีของแบคทีเรีย (กาญจนา มณีศรี, 2557) อย่างไรก็ตาม มีหลายกรณีที่การยับยั้งราด้วย

สารต้านราที่ผลิตออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์แสดงผลการยับยั้งที่สูงกว่า ยกตัวอย่างเช่น ในงานวิจัยซึ่งศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเส้นใยราที่ก่อโรคในข้าวได้แก่ *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum* และ *Helminthosporium oryzae* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23 พบว่าผลการยับยั้งด้วยวิธีการทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าทดสอบวิธี dual culture อีกทั้งลำดับความสามารถการยับยั้งราก็แตกต่างกัน (Saechow และคณะ, 2018)

จากการทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *P. oryzae* โดยขั้นแรกทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB, NB และ TSB มาผสมกับ PDA ในอัตราส่วน 2:10 ทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่าอาหารเหลว LB ทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพการยับยั้งดีที่สุด โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 54.07% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M26 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 45.53% และสายพันธุ์ M23 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 36.58% ซึ่งลำดับความสามารถในการยับยั้งราของ 3 สายพันธุ์เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ก่อนหน้า

จากนั้นทดสอบหาค่า pH ที่เหมาะสมของอาหารเหลว LB ในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *P. oryzae* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ค่า pH เท่ากับ 7 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงที่สุด โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 แสดงความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 67.92% รองลงมาคือ สายพันธุ์ M26 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 60.42% และสายพันธุ์ M23 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 59.17% จากการทดลองสรุปผลได้ว่า ภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *P. oryzae* คืออาหาร LB ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 7

แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงสุดในการยับยั้ง *P. oryzae* เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งผู้เก็บตัวอย่างได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งได้แก่ การศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเซลล์โดยการย้อมแกรมและการตรวจสอบการสร้างสปอร์ พบว่ามีรูปร่างเป็นแท่ง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่มีเอนโดสปอร์ และการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนเพื่อการเจริญ สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ และจากการศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าสายพันธุ์ M25 และ M26 มีสมบัติในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งเมื่อนำผลไปเปรียบเทียบกับคู่มือ Practical Atlas for Bacterial Identification ได้คาดว่าสายพันธุ์ M23 อยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ M25 คาดว่าอยู่ในสกุล

Corynebacterium sp. และสายพันธุ์ M26 คาดว่าอยู่ในสกุล *Coryophanon* sp. (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) ผลการทดลองดังกล่าวเป็นเพียงการคาดการณ์เท่านั้น และควรพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของแบคทีเรียเหล่านี้ต่อไป

สำหรับแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* มีงานวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งราโรคพืช โดยมีรายงานว่า *Lactobacillus* ที่คัดแยกได้จากหญ้าหมักข้าวโพด มีความสามารถในการยับยั้ง *Fusarium verticillioides* ซึ่งเป็นราผลิตสารพิษ (mycotoxigenic fungus) โดยพบว่า *Lactobacillus* จะผลิตกรดแลกติกทำให้ค่า pH ลดลง และสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ (Kharazian และคณะ, 2017) ส่วนแบคทีเรียสกุล *Corynebacterium* sp. มีรายงานว่า *Corynebacterium* sp. ที่แยกได้จากดินตะกอนที่เก็บจากอ่าวเมนเนอร์ประเทศอินเดีย มีความสามารถยับยั้งรากอ่อโรคในพืชได้หลายชนิด อาทิ *Colletotrichum musae*, *Sclerotium rofsii*, *Rhizoctonia solani* และ *Alternaria alternata* (Dhinakaran และคณะ, 2012) แบคทีเรียในสกุล *Corynebacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญ และมีความสามารถในการแย่งพื้นที่เพื่อยับยั้งราได้หลายรูปแบบ เช่น การแย่งอาหาร และการผลิตแอนติไบโอซิสไซเดอโรฟอร์ (antibiosis siderophore) ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่แบคทีเรียสร้างและปล่อยออกมาเพื่อช่วยในการแย่งจับไอออนของเหล็ก (Rosales และคณะ, 1995) ซึ่งใกล้เคียงจากลักษณะที่คาดไว้ รวมถึงมีความสามารถยับยั้งราจึงมีโอกาสที่สายพันธุ์ M25 อาจจะอยู่ในสกุล *Corynebacterium* sp. แต่ยังจำเป็นที่จะต้องทำการพิสูจน์เพื่อความถูกต้อง

อย่างไรก็ตาม จากผลการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยผู้วิจัยนี้ พบว่าลักษณะโดยทั่วไปของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่แบคทีเรียเหล่านี้จะมีความสามารถในการยับยั้งราเช่นเดียวกับสกุล *Bacillus* ที่มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาและพบว่าสามารถยับยั้งรากอ่อโรคในพืชได้ ยกตัวอย่างเช่น มีรายงานเกี่ยวกับ *Bacillus subtilis* T429 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากพืชของต้นข้าว สามารถยับยั้ง *Magnaporthe grisea* ที่ก่อโรคใบไหม้ในข้าว ทำให้สูญเสียผลผลิตข้าว โดยพบว่า *B. subtilis* T429 ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไมโทคอนเดรียลดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้าง ATP และนอกจากนี้แบคทีเรียดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการสร้างเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเส้นใยของรา ซึ่งส่งผลต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วของเส้นใยราได้ และงานวิจัยนี้ยังพัฒนาต่อยอดโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปผ่านกระบวนการสเปรย์ดรายด์ (spray drying) เพื่อยืดอายุการทำงานและเพิ่มความกระจายตัวของสารเมแทบอไลต์ เมื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคพบว่ามีประสิทธิภาพที่สูงกว่าการใช้ไตรไซคลาโซล (tricyclazole) ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Meng และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่รายงานว่า *Bacillus safebsis* B21 ที่แยกได้จากผลของต้นหอมหมื่นลี้ (*Osmanthus fragrans*

Lour.) มีความสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของ *M. oryzae* โดยจากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าเป็นสารกลุ่มลิโพเปปไทด์ ซึ่งได้แก่ สารอิทูริน A2 และอิทูริน A6 โดยสารชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยรา โดยปรับเปลี่ยนสมบัติการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์รา ทำให้เกิดการเลือกผ่านสารเข้าเซลล์ผิดปกติ เส้นใยมีลักษณะบวม และส่งผลทำให้ไม่สามารถเจริญได้ของ (Rong และคณะ, 2020) และยังมีวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับการใช้ *Bacillus methylotrophicus* สายพันธุ์ BC79 ที่แยกได้จากดิน และพบว่ามีความสามารถผลิตกรดเฟนอะมิโนเมธิลอะซีติก (phenaminomethylacetic acid) ซึ่งมีสมบัติยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกสปอร์ของ *M. oryzae* (Shan และคณะ, 2013) งานวิจัยที่กล่าวถึงเป็นเพียงตัวอย่างรายงานเกี่ยวกับความสามารถการยับยั้งราของ *Bacillus* เท่านั้นโดยเน้นไปที่รากอ่อโรคในข้าวที่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ดังนั้นการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ยังคงมีความจำเป็น เพื่อให้ได้ชนิดของแบคทีเรียที่มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

งานวิจัยครั้งนี้ได้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *P. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าว และทราบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH ที่เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งรา แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังจำเป็นต้องหาภาวะอื่นที่เหมาะสม เช่น เวลาในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา รวมทั้งต้องระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แน่ชัด นอกจากนี้ ยังจำเป็นต้องศึกษาสารต้านราที่แบคทีเรียผลิตออกมาว่าเป็นสารชนิดใด รวมไปถึงกลไกการทำงานของสารต้านรานั้น ซึ่งเป็นส่วนที่จำเป็นจะต้องศึกษาหากต้องการที่จะพัฒนานำแบคทีเรียไปใช้จริงในอนาคต เพื่อเสริมสร้างความเข้าใจและความปลอดภัยของแบคทีเรียต่อการนำไปใช้จริง ผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้เป็นผลที่ได้จากการทดลองภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การศึกษาบนต้นข้าว หรือการศึกษาในนาข้าวต่อไป รวมทั้งควรมีการศึกษาว่าสารต้านราไม่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Ariya-anandech, K., Chaipanya, C., Teerasan, W., Kate-Ngam, S., Jantasuriyarat, C., 2018. Detection and allele identification of rice blast resistance gene, *Pik*, in Thai rice germplasm. Agriculture and Natural Resources 52, 525-535.

Awla, H.K., Kadir, J., Othman, R., Rashid, T.S., Hamid, S., Wong, M.Y., 2017. Plant growth-promoting abilities and biocontrol efficacy of *Streptomyces* sp. UPMRS4 against *Pyricularia oryzae*. Biological Control 112, 55-63.

Blackwell, M., 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? American Journal of Botany 98, 426-438.

Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M.I., Gomez-Lama Cabanas, C., Mercado-Blanco, J., 2019. Biological control agents against Fusarium wilt of banana. Frontiers in Microbiology 10, 616.

Castroagudin, V.L., Moreira, S.I., Pereira, D.A., Moreira, S.S., Brunner, P.C., Maciel, J.L., Crous, P.W., McDonald, B.A., Alves, E., Ceresini, P.C., 2016. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. Persoonia 37, 199-216.

Chen, Y., Gao, X., Chen, Y., Qin, H., Huang, L., Han, Q., 2014. Inhibitory efficacy of endophytic *Bacillus subtilis* EDR4 against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed. Biological Control 78, 67-76.

Choi, N.H., Jang, J.Y., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Nguyen, V.T., Min, B.S., Le Dang, Q., Kim, J.C., 2017. Antifungal activity of sterols and dipsacus saponins isolated from *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi. Pesticide Biochemistry and Physiology 141, 103-108.

Dagdas, Y.F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L.S., Bielska, E., Steinberg, G., Talbot, N.J., 2012. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Science 336, 1590-1595.

Deepa, N., Sreenivasa, M.Y., 2019. Biocontrol strategies for effective management of phytopathogenic fungi associated with cereals, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, pp. 177-189.

Dhinakaran, A., Rajasekaran, R., Jayalakshmi, S., 2012. Antiphytopathogenic activity of bacterial protein of a marine *Corynebacterium* sp. isolated from Mandapam, Gulf of Mannar. Journal of Biopesticides 5, 17-22.

Djaya, L., Hersanti, Istifadah, N., Hartati, S., Joni, I.M., 2019. *In vitro* study of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytic bacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum* formulated with graphite and silica nano particles as a biocontrol delivery system (BDS). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 19, 101153.

Doehlemann, G., Okmen, B., Zhu, W., Sharon, A., 2017. Plant pathogenic fungi. Microbiolology Spectrum 5.

Fira, D., Dimkic, I., Beric, T., Lozo, J., Stankovic, S., 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillu*s species. Journal of Biotechnology 285, 44-55.

Foysal, M.J., Lisa, A.K., 2018. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 16, 387-392.

Gautam, S., Chauhan, A., Sharma, R., Sehgal, R., Shirkot, C.K., 2019. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Microbial Pathogenesis 130, 196-203.

Gupta, P.K., 2019. Herbicides and fungicides, Biomarkers in Toxicology, pp. 477-499.

Islam, M.A., Nain, Z., Alam, M.K., Banu, N.A., Islam, M.R., 2018. *In vitro* study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Egyptian Journal of Biological Pest Control 28.

Kaewklom, S., Chueakhalm, W., Suthirawut, S., Aunpad, R., 2014. Development of a novel PCR primer to differentiate and identify *Bacillus subtilis* and closely related species isolated from Thai fermented foods. Food Biotechnology 28, 354-368.

Kharazian, Z.A., Salehi Jouzani, G., Aghdasi, M., Khorvash, M., Zamani, M., Mohammadzadeh, H., 2017. Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi. Biological Control 110, 33-43.

Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., de Vries, R.P., Lebrun, M.H., 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (*Pyriculariaceae*). Studies In Mycology 79, 85-120.

Kong, L.A., Li, G.T., Liu, Y., Liu, M.G., Zhang, S.J., Yang, J., Zhou, X.Y., Peng, Y.L., Xu, J.R., 2013. Differences between appressoria formed by germ tubes and appressorium-

like structures developed by hyphal tips in *Magnaporthe oryzae*. Fungal Genetib and Biology 56, 33-41.

Kraithong, S., Lee, S., Rawdkuen, S., 2018. Physicochemical and functional properties of Thai organic rice flour. Journal of Cereal Science 79, 259-266.

Mbajiuka, C.S., Eze, V.C., Ifeanyi, V.O., 2019. Optimization of growth conditions of *Bacillus megaterium* for antifungal activities against Cocoyam phytopathogens. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8, 2184-2193.

Meng, X., Yu, J., Yu, M., Yin, X., Liu, Y., 2015. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. Biological Control 85, 46-51.

Mezghanni, H., Khedher, S., Tounsi, S., Zouari, N., 2012. Medium optimization of antifungal activity production by *Bacillus amyloliquefaciens* using statistical experimental design. Preparative Biochemistry and Biotechnology 42, 267-278.

Miller, F., 2018. Rice blast: the most devastating rice disease in the world. (online). ค้นหาจาก https://agfax.com/2018/09/28/rice-blast-the-most-devastating-rice-disease-in-the-world/, เมื่อวันที่ 23 มีนาคม 2563.

Moita, C., Feio, S.S., Nunes, L., João Marcelo Curto, M., Carlos Roseiro, J., 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.

Rong, S., Xu, H., Li, L., Chen, R., Gao, X., Xu, Z., 2020. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. Pesticide Biochemistry and Physiology 162, 69-77.

Rosales, A.M., Thomashow, L., Cook, R.J., Mew, T.W., 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. Phytopathology 85, 1028-1032.

Saechow, S., Thammasittirong, A., Kittakoop, P., Prachya, S., Thammasittirong, S.N., 2018. Antagonistic activity against dirty panicle rice fungal pathogens and plant growth-promoting activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. Journal of Microbiology and Biotechnology 28, 1527-1535.

Shan, H., Zhao, M., Chen, D., Cheng, J., Li, J., Feng, Z., Ma, Z., An, D., 2013. Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79. Crop Protection 44, 29-37.

Shimoi, S., Inoue, K., Kitagawa, H., Yamasaki, M., Tsushima, S., Park, P., Ikeda, K., 2010. Biological control for rice blast disease by employing detachment action with gelatinolytic bacteria. Biological Control 55, 85-91.

Song, P., Mansaray, L.R., Huang, J., Huang, W., 2018. Mapping paddy rice agriculture over China using AMSR-E time series data. ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing 144, 469-482.

Talbot, N.J., 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. Annual Review of Microbiology journal 57, 177-202.

Wang, X., Fu, X., Chen, M., Wang, A., Yan, J., Mei, Y., Wang, M., Yang, C., 2019. Novel 1,3,5-thiadiazine-2-thione derivatives containing a hydrazide moiety: Design, synthesis and bioactive evaluation against phytopathogenic fungi *in vitro* and *in vivo*. Chinese Chemical Letters 30, 1419-1422.

Wang, X., Jiang, N., Liu, J., Liu, W., Wang, G.L., 2014. The role of effectors and host immunity in plant-necrotrophic fungal interactions. Virulence 5, 722-732.

Wilgen, B.W.V., Raghu, S., Sheppard, A.W., Schaffner, U., 2020. Quantifying the social and economic benefits of the biological control of invasive alien plants in natural ecosystems. Current Opinion Insect Science 38, 1-5.

Yi, Y.-J., Li, Y.-s., Xia, B., Li, W.-p., Pang, L., Tong, Z.-d., 2015. Optimization of medium composition and culture conditions for antifungal activity of a tomato endophytic bacterium. Biological Control 82, 69-75.

กระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา, 2562a. ประเทศไหน ผลิตและส่งออกข้าวมากสุดในโลก ปี 2018. (online). ค้นหาจาก https://www.longtunman.com/16733 เมื่อวันที่ 23 มีนาคม 2563.

กระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา, 2562b. สถานการณ์ภาพรวมตลาดข้าวในอาเซียน ประจำเดือนกันยายน 2562. (online). ค้นหาจาก https://www.ditp.go.th/ditp_web61/article_sub_view.php?filename=contents_attach/564288/564288.pdf&title=564288&cate=455&d=0, เมื่อวันที่ 23 มีนาคม 2563

กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2559. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. (online). ค้นหาจาก http://www.ricethailand.go.th/rkb3/Disease.htm, เมื่อวันที่ 23 มีนาคม 2563.

กาญจนา มณีศรี, 2557. การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.จากเนื้อไม้ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) สำหรับควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* (Butler)และ *P. botryosa* (Chee)โดยชีววิธี, วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549. การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช, โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดรุณี จิวเจริญ, 2555. แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราโรคพืช, โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธารทิพย์ รัตนะ, 2016. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสับปะรดและมะละกอ ในการต่อต้านราก่อโรคแอนแทรกโนสในพริก. วราสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 24(3), 456-468.

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, ทิพวรรณ กันหาญาติ, รุ่งนภา ทองเครื่ง, 2555. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2555. สำนักวัจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม.

สรินนา อ่ำรุ่ง, 2561. การจำแนกเชื้อรา *Pyricularia* species ที่แยกจากข้าวและหญ้าด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และ *Pot2* rep–PCR วิทยาศาสตร์เกษตร 49(1), 27-43.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose broth	24	กรัม
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว Luria-Bertani Agar (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเหลว Nutrient broth (NB)

อาหารสำเร็จรูป Nutrient broth (NB)	24	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB)

อาหารสำเร็จรูป Tryptic soy broth 24 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE)

Trizma base	121	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. 0.9% อะกาโรสเจล

ผงอะกาโรสเจล	0.18	กรัม
บัฟเฟอร์ 1X TAE	20	มิลลิลิตร

ใส่ผงอะกาโรสเจลใน 1X TAE บัฟเฟอร์ กระจายให้เข้ากันก่อนนำไปอุ่นให้เจลละลาย ตั้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายสำหรับย้อมดีเอ็นเอ SERVA DNA stain G (Serva Electrophoresis Gmbh, Germany) ปริมาตร 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเทลงในถาดแม่พิมพ์สำหรับขึ้นเจล โดยระวังอย่าให้มีฟอง และตั้งไว้จนอะกาโรสแข็งตัว