



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp.
ที่ก่อโรคทะลายเน่าในปาล์ม

ชื่อนิสิต นางสาวนภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์ รหัสประจำตัว 6032328923

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp.
ที่ก่อโรคทะลายเน่าในปาล์ม

โดย

นางสาวนภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์

เลขประจำตัว 6032328923

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ


โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรค
ทำลายเน่าในปาล์ม
โดย นางสาวนภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์ รหัสนิสิต 6032328923
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ
ปีการศึกษา 2563


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์


..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร. ธานีภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงการ


..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

ชื่อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคทะลายเน่าในปาล์ม
นิสิตผู้ทำโครงการ นางสาวนภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์ รหัสนิสิต 6032328923
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการทดสอบความสามารถของสารแอนตาโกนิสติกจากแบคทีเรียในการควบคุมรา *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคทะลายเน่าในปาล์ม จากการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคด้วยสารระเหยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ 40.41% ตามด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 และ M27 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ 16.23% และ 7.28% ตามลำดับ การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารแอนตาโกนิสติกของแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 พบว่าเมื่อนำน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา *Marasmius* sp. แล้ว แบคทีเรียสายพันธุ์ M22 และ M27 สามารถควบคุมการเจริญของราได้ดีเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 65.65% และ 59.44% ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 56.14% จากผลการทดลองที่ได้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 สามารถควบคุมราก่อโรคได้ดีที่สุดจึงนำไปศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารแอนตาโกนิสติก และพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตสารแอนตาโกนิสติกได้ดีเมื่อเข้าสู่ช่วงโมเมนต์ที่ 8 โดยจากการทดสอบพบว่าที่ระยะเวลา 16, 20 และ 28 ชั่วโมงแบคทีเรียสามารถผลิตสารแอนตาโกนิสติกได้ดีที่สุดโดยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา 65.67%, 65.75% และ 69.93% ตามลำดับ จากการติดตามการเจริญพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตสารแอนตาโกนิสติกได้เมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ที่ 8 ชั่วโมง เป็นต้นไป การศึกษาเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยศึกษาลักษณะทางกายภาพพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง เมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA พบว่าแบคทีเรีย M22 มีความใกล้เคียง 100% กับ *Bacillus subtilis* CAB1111 (KJ194590.1), แบคทีเรียสายพันธุ์ M25 มีความใกล้เคียง 100% กับ *Bacillus velezensis* T18 (KY307917.1) และแบคทีเรีย M27 มีความใกล้เคียง 99.87% กับ *B. velezensis* R-QL-120-24 (MT078637.1) แบคทีเรียและสารที่ผลิตได้มีศักยภาพสามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคทะลายเน่าในปาล์มได้

Project Title Antagonistic bacteria against *Marasmius* sp., the causal agent of bunch rot disease in oil palm

Student Name Miss. Naphatsawan Thammasawat ID 6032328923

Advisor Assoc. Prof. Dr. Panan Rerngsamran

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

This research aimed to test the ability of antagonistic substances from bacteria to control *Marasmius* sp. that caused bunch rot disease of oil palm. By testing the biocontrol ability by volatile substance, it was found that bacteria M22 was able to inhibit fungi with 40.41% inhibition, followed by M25 and M27 with 16.23% and 7.28%, respectively. The optimum temperature for producing antagonistic substances by bacteria M22, M25 and M27 was examined. The result showed that cell-free supernatants of M22 and M27 from 30°C showed better inhibition against *Marasmius* sp. at 65.65% and 59.44%, respectively, whereas that of M25 from 37°C showed 56.14% inhibition. Since the best result was obtained from bacteria M22, it was selected for time optimization test for the production of antagonistic substances. It was revealed that the highest antagonistic activity was found from supernatant after 8 hours. At 16, 20 and 28 hours, the bacteria was able to produce highest antagonistic activities with the inhibition of 65.67%, 65.75% and 69.93%, respectively. By monitoring the growth of bacteria, it was demonstrated that bacteria was able to produce antagonistic substances when entering stationary phase of growth at 8 hours onward. Morphological identification of M22, M25 and M27 showed that all of them were Gram positive with rod-shaped. Sequence analysis of 16S rRNA region indicated that M22 has 100% similarity to *Bacillus subtilis* CAB1111 (KJ194590.1), M25 has 100% similarity to *Bacillus velezensis* T18 (KY307917.1), and M27 has 99.87% similarity to *B. velezensis* R-QL-120-24 (MT078637.1). Bacteria and the substances produced has potential to be used to control *Marasmius* bunch rot disease in oil palm.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการฯ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในการทำโครงการนี้ และการตรวจสอบและแก้ไขปรับปรุงโครงการฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทำโครงการตลอดจนการอำนวยความสะดวกในการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ในห้องปฏิบัติการ 1904/15 ได้แก่ นางสาวสิริตา เสียมไหม และนายสิรภพ ภูมิภูติกุล พี่ในห้องปฏิบัติการ 1904/14 พี่ปริญาโทและปริญาเอกในห้องปฏิบัติการ 1804/16 และใน ห้องปฏิบัติการ 1704/16 ในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการทำวิจัย ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทำโครงการนี้

ขอขอบคุณบุคคลในครอบครัวทั้งบิดา มารดาที่ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจในการทำงานวิจัยนี้ รวมทั้งเพื่อนร่วมภาควิชาจุลชีววิทยาชั้นปีที่ 4 ทุกคนที่คอยให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ และให้กำลังใจสนับสนุนในการทำโครงการให้ผ่านไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณนายชิตพล ลีชัยพรกุล หรือน้องเตนล์ และสมาชิกใน WayV ชิวหมินและแบคชยอน รวมทั้งสมาชิกอีก 7 คนในวง EXO ในการเป็นกำลังใจร่วมทั้งเป็นแรงผลักดันให้มีกำลังใจในการทำโครงการให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สุดท้ายนี้ขอขอบคุณตนเองที่อดทนและหมั่นหาความรู้เพิ่มเติมและนำความรู้ที่เรียนจากภาควิชาจุลชีววิทยามารับใช้ในโครงการของตนทำให้งานวิจัยผ่านไปได้โดยสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	9
บทที่ 2 เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์	
2.1 เครื่องมือ	10
2.2 เคมีภัณฑ์	11
2.3 ชุดทดลองสำเร็จรูป	11
2.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์	11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
3.1 การเตรียมแบคทีเรียและรา <i>Marasmius</i> sp.	12
3.2 การตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของ <i>Marasmius</i> sp.	12
3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารระเหยที่มีความสามารถในการยับยั้งรา	12
3.4 การทดสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแอนติไบโอติกจากแบคทีเรีย	12
3.5 การหาระยะเวลาที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของรา <i>Marasmius</i> sp.	13
3.6 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารประกอบแอนติไบโอติกจากแบคทีเรีย	13
3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27	14
3.7.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย ได้แก่การย้อมสีแกรมและลักษณะสมบัติภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x100 เท่า	14
3.7.2 การทดสอบระดับชีวโมเลกุล	14
(1) การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย	14
(2) การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	15
(3) การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส	15

(4) การทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์	15
(5) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การหาภาวะเบื้องต้นที่สามารถชักนำให้ <i>Marasmius</i> sp. สามารถสร้างเบสิดิโอสปอร์ได้	17
4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารระเหยที่สามารถยับยั้ง <i>Marasmius</i> sp.	17
4.3 การทดสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแอนตะโกนีสติกจากแบคทีเรีย	20
4.4 การหาระยะเวลาที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ <i>Marasmius</i> sp.	25
4.5 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารประกอบแอนตะโกนีสติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ M22	29
4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย M22, M25 และ M27	29
4.6.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย	29
4.6.2 การทดสอบระดับชีวโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA	30
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก ก	38
ภาคผนวก ข	39
ภาคผนวก ค	40

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ <i>Marasmius</i> sp. ด้วยสารระเหยจาก แบคทีเรีย M22, M25 และ M27	19
ตารางที่ 4.2 การยับยั้งการเจริญของ <i>Marasmius</i> sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	21
ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการเจริญของ <i>Marasmius</i> sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	22
ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของ <i>Marasmius</i> sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	23
ตารางที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของ <i>Marasmius</i> sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	24
ตารางที่ 4.6 การยับยั้งการเจริญของ <i>Marasmius</i> sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22 ที่ 30 องศา เซลเซียส เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน	26

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 แนวโน้มอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันในประเทศไทย	1
รูปที่ 1.2 ลักษณะของใบปาล์มที่เป็นโรคใบจุดที่มีสาเหตุจาก <i>Curvularia eragrostidis</i>	2
รูปที่ 1.3 ลักษณะของยอดปาล์มที่เกิดโรคยอดเน่าและทางใบบิด	3
รูปที่ 1.4 ทะลายปาล์มน้ำมันที่เกิดโรคจาก <i>Marasmius palmivorus</i>	3
รูปที่ 1.5 ปาล์มที่เป็นโรคทะลายเน่าและไส้กลวง	4
รูปที่ 1.6 ลักษณะของปาล์มที่เกิดโรคลำต้นเน่าที่มีสาเหตุจาก <i>Ganoderma boninense</i>	4
รูปที่ 1.7 การเจริญของ <i>Marasmius palmivorus</i> บนทะลายปาล์ม	5
รูปที่ 1.8 กลไกการควบคุมโรคของจุลินทรีย์	6
รูปที่ 4.1 ลักษณะของสายใย <i>Marasmius</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า บริเวณลูกศรแสดงลักษณะของ clamp connection บนสายใยรา	17
รูปที่ 4.2 ลักษณะโครงสร้างของสปอร์ของ <i>Marasmius</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่าบริเวณลูกศรแสดงลักษณะของสปอร์ที่พบ	17
รูปที่ 4.3 การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 (OD ₆₀₀) และผลการยับยั้งราต่อเวลา	29
รูปที่ 4.4 ลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่าของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 (ซ้าย), M25 (กลาง) และ M27 (ขวา)	30
รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27 เปรียบเทียบกับ 1kb DNA Ladder	30

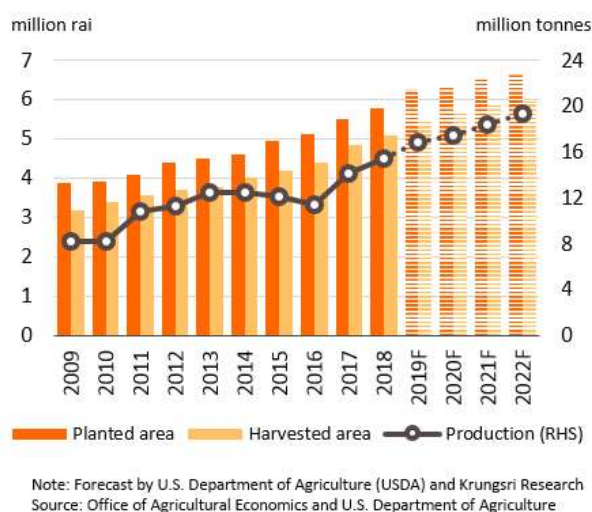
บทที่ 1

บทนำ

ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในตระกูลปาล์มเช่นเดียวกับมะพร้าว ตาล โหนด และ อินทผาลัม มีถิ่นกำเนิดในแถบแอฟริกา สามารถเจริญได้ดีในภูมิประเทศที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น มีปริมาณน้ำฝนกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอตลอดปี เจริญได้ดีในดินร่วนถึงเหนียว ดังนั้นประเทศที่อยู่ในแนว แถบเส้นศูนย์สูตรจึงนิยมปลูกปาล์มน้ำมัน (Konan และคณะ, 2006) มีรายงานการพบปาล์มน้ำมันครั้งแรกในปี พ.ศ. 1977 ในแอฟริกาตะวันตก โดยปาล์มน้ำมันถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2472 ที่จังหวัดสงขลา และเริ่มมีการปลูกเพิ่มมากขึ้นในภาคใต้และภูมิภาคอื่นในประเทศไทย

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก โดยมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงถึง 50 ล้านดอลลาร์สหรัฐ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ให้ผลผลิตสูง คือให้ปริมาณน้ำมันมากเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น และผลผลิตสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง, สารเคมีทางการเกษตร และเชื้อเพลิงชีวภาพ (Konan และคณะ, 2006) สำหรับประเทศไทย จากข้อมูลสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรพบการปลูกปาล์มน้ำมันที่บริเวณภาคใต้และชายฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทย โดยพบมากในจังหวัดกระบี่, สุราษฎร์ธานี, ชุมพร และนครศรีธรรมราช ซึ่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งหมดในประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับ 4 ของโลก (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2563) ปัจจุบันอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันในประเทศไทยมีพื้นที่การเพาะปลูกเพิ่มขึ้นเฉลี่ยปีละ 3 แสนไร่ต่อปี ดังรูปที่ 1.1 (ชัยวิช โขวเจริญสุข, 2563) จึงเห็นได้ว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ส่งผลต่อเศรษฐกิจในประเทศไทยอย่างมาก



รูปที่ 1.1 : แนวโน้มอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันในประเทศไทย (ชัยวิช โขวเจริญสุข, 2563)

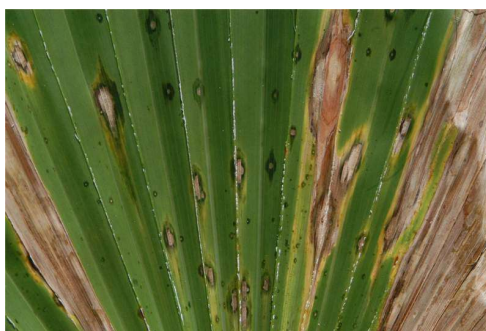
ลักษณะของปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลักษณะดอกมีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในต้นเดียวกัน (monoecious) ดอกมีลักษณะเป็นช่อแยกเป็นช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมีย ซึ่งเกิดสลับกันที่โคนก้านใบ เมื่อดอกตัวเมียได้รับการผสมจากละอองเกสรจากดอกตัวผู้ เกิดเป็นผลบนช่อดอกเรียกว่า ทะลาย ทะลายของปาล์มน้ำมันมีลักษณะรูปไข่ประกอบด้วยก้านทะลาย ช่อทะลาย และผล (นคร สารระคุณ, 2539) จำนวนผลต่อทะลายมีตั้งแต่ 500-1,400 ผล อัตราของน้ำหนักผลต่อทะลายอยู่ที่ 60-70% ผลของปาล์มน้ำมันมีสีเขียวหรือดำเมื่อเป็นผลอ่อน และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมแดงเมื่อผลสุก การสุกของผลเริ่มจากปลายทะลายไปจนถึงโคนทะลาย (ศิริชัย มามีวัฒนะ, 2532)

ปาล์มน้ำมันนิยมปลูกอยู่ 2 ชนิด คือ ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ *Elaeis guineensis* Jacq. เป็นสายพันธุ์ที่ปลูกเพื่อการค้า มีถิ่นกำเนิดจากแอฟริกา ลักษณะที่เด่นชัดของปาล์มสายพันธุ์นี้คือ ให้ผลผลิตจำนวนทะลาย, น้ำหนักต่อผล, เปลือกนอกต่อผล และผลผลิตน้ำมันสูงกว่าสายพันธุ์อื่น อีกสายพันธุ์คือ ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ *Elaeis oleifera* เป็นสายพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดจากบริเวณลุ่มแม่น้ำอะเมซอน ลักษณะเด่นของสายพันธุ์นี้คือ ลักษณะต้นเตี้ยและต้านทานต่อโรคตาเน่า (Lethal bud rot) เฮอร์เซ็นต์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ค่าไอโอดีนสูง มีวิตามินเอ และวิตามินอีสูงกว่าสายพันธุ์อื่น แต่ให้ผลผลิตและปริมาณปาล์มน้ำมันน้อยกว่าสายพันธุ์ *Elaeis guineensis* Jacq. ด้วยลักษณะเด่นเหล่านี้อุตสาหกรรมการปลูกปาล์มน้ำมันในปัจจุบันจึงนิยมใช้ปาล์มน้ำมันพันธุ์ผสมเพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณมากและมีคุณภาพ (กรมวิชาการเกษตร, 2019)

โรคในปาล์มน้ำมัน

โรคในปาล์มน้ำมันจัดเป็นสาเหตุหนึ่งซึ่งผลกระทบต่อการผลิตปาล์มน้ำมัน และทำความเสียหายอย่างมากในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค โรคในปาล์มน้ำมันมีพบได้ตั้งแต่ในระยะเมล็ดจนถึงระยะหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ในช่วงระยะเริ่มปลูกจนถึง 1-2 ปีแรกมักพบโรคใบจุดและโรครากเน่า ในระยะที่ให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันมักพบโรคโรคทะลายเน่าและโรคลำต้นเน่า

โรคใบจุด มีสาเหตุจาก *Curvularia eragrostidis* พบในแปลงต้นกล้าปาล์ม อาการระยะแรกจะพบจุดสีเหลืองขนาดเล็กและจะมีขนาดใหญ่เป็นสีน้ำตาลดำด้านในมีสีเหลือง เห็นเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น ๆ (รูปที่ 1.2) การป้องกันโรคจะตัดใบที่เกิดโรคออกไปทำลายเพื่อไม่ให้เกิดการกระจายของโรค หรือใช้สารเคมีฆ่าราไดธิดีโอคาร์บาเมท, แคปเทน, ไซโคแอกซีไมด์ และแคปทาโฟล



รูปที่ 1.2 ลักษณะของใบปาล์มที่เป็นโรคใบจุดที่มีสาเหตุจาก *Curvularia eragrostidis* (Hughes, 2014)

โรคยอดเน่าและทางใบบิด (Spear rot and crown disease) เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมของปาล์ม พบในปาล์มหลังปลูกลงแปลง 1-2 เดือนโดยจะเห็นทางใบยอดพับลง พบแผลสีน้ำตาลบนยอด ก้านทางบิดงอ ใบเน่า (รูปที่ 1.3)



รูปที่ 1.3 ลักษณะของยอดปาล์มที่เกิดโรคยอดเน่าและทางใบบิด (Elliott., 2015)

โรคทะลายเน่าจากเชื้อเห็ดลม (Marasmius bunch rot) มีสาเหตุจาก *Marasmius palmivorus* พบการระบาดของโรคในช่วงฤดูฝน อาการของโรคจะพบผลปาล์มในทะลายเป็นสีน้ำตาล ปลายผลจะเห็นเส้นใยสีขาวหยาบของรา ทำให้ผลปาล์มเน่า (รูปที่ 1.4) การควบคุมโรคทำได้โดยตัดส่วนที่มีการเกิดโรคและเผาทิ้งเพื่อป้องกันการระบาดของโรค



รูปที่ 1.4 ทะลายปาล์มน้ำมันที่เกิดโรคจาก *Marasmius palmivorus* (คลินิกปาล์มน้ำมัน, 2017)

โรคทะลายเน่าและไส้กลวง (Bunch failure and hallow bunch) อาการทะลายเน่าพบในระยะเริ่มให้ผลผลิต โดยส่วนปลายของทะลายจะเน่าไม่สมบูรณ์ มักเกิดกับต้นกล้าปาล์ม ทำให้ผลทะลายพัฒนาไม่สมบูรณ์ ส่วนอาการไส้กลวงจะเกิดในปาล์มที่มีอายุมากโดยทะลายปาล์มด้านในและไส้ของทะลายจะเน่า (รูปที่ 1.5) ซึ่งโรคนี้อยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน



รูปที่ 1.5 ปาล์มที่เป็นโรคทะลายเน่าและไส้กลวง (Sutarta และคณะ, 2015)

โรคลำต้นเน่าจาก *Ganoderma* มีสาเหตุจาก *Ganoderma boninense* พบในปาล์มน้ำมัน อายุ 4-5 ปี อาการมีลักษณะใบไหม้และโคนต้นมีรอยเน่า และพบเห็ดสีน้ำตาลเจริญที่ลำต้น (รูปที่ 1.6)



รูปที่ 1.6 ลักษณะของปาล์มที่เกิดโรคลำต้นเน่าที่มีสาเหตุจาก *Ganoderma boninense* (Dick, 2015)

นอกจากโรคที่เกิดจากราแล้ว ปาล์มน้ำมันยังสามารถเกิดโรคได้จากแมลงศัตรูพืช ได้แก่ หนอนหน้าแมว, หนอนปลอกเล็ก, ตัวงูหูลาบและตัวแรด การเกิดโรคจากสารเคมี เช่น สารพาราควอท ที่ทำให้เกิดอาการใบไหม้, สารไกลโฟเซต ที่ทำให้เกิดอาการเหลืองที่ใบล่าง และสารคลอโรอะซีทาไมด์ ที่ทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันเกิดอาการโค้งงอ

โรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมัน

สำหรับโรคทะลายเน่านี้มีรายงานความเสียหายทางเศรษฐกิจจากโรคทะลายเน่าของปาล์มครั้งแรกในประเทศมาเลเซีย ซาบาร์ และอินโดนีเซีย โดยพบว่าโรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมันเกิดจาก *Marasmius palmivorus* (Turner, 1965) *M. palmivorus* เป็นราในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Agaricomycetes วงศ์ Marasmiaceae สกุล Marasmius โดยราสกุลนี้ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเห็ดดอก (Turner, 1965) ในภาวะปกติ *M. palmivorus* จะดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม เมื่อราเจริญบนทะลายปาล์มน้ำมันและมีจำนวนมากพอจะเป็นปรสิตทำให้เกิดโรคในพืชได้หลายชนิด เช่น ปาล์ม

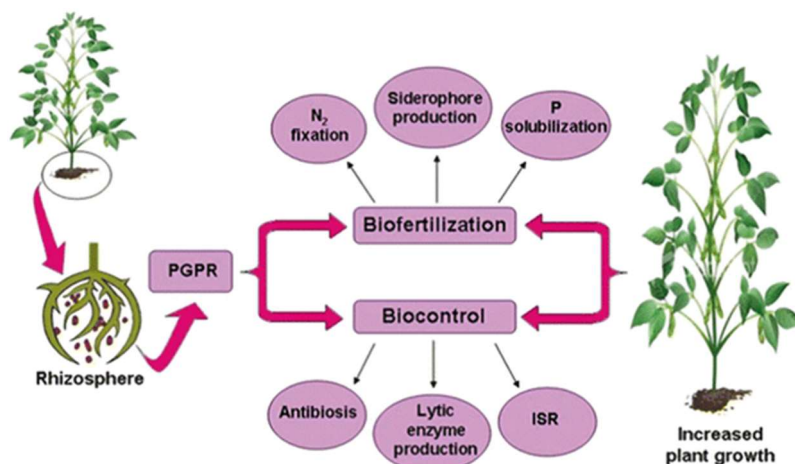
น้ำมัน, มะพร้าว, สับปะรด และยาง การระบาดของโรคทะลายเน่าจะพบมากในช่วงที่มีฝนชุก ความชื้นสูง และพบมากในสวนปาล์มที่มีการดูแลที่ไม่ดี โดยลักษณะของปาล์มน้ำมันที่มีก้านทางตรงจะเกิดโรคได้ง่ายกว่าปาล์มที่มีก้านทางโค้ง (ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช, 2547) ลักษณะของโรคจะพบการเจริญของราบริเวณที่วทะลายและผลปาล์มน้ำมันทำให้ผลปาล์มน้ำมันเน่าเสียและเป็นสีน้ำตาล (รูปที่ 1.7) ผลปาล์มน้ำมันที่เกิดโรคสามารถแพร่กระจายโรคได้และสร้างความเสียหายแก่การผลิตปาล์มน้ำมันอย่างมาก ปัจจุบันการป้องกันและกำจัดโรคทะลายเน่าใช้วิธีการทางเขตกรรม โดยระมัดระวังไม่ให้มีแหล่งของเชื้ออยู่ในสวนปาล์ม, การกำจัดส่วนที่เป็นโรคออกและเผาทำลายเพื่อป้องกันการระบาด, และการจำกัดผลปาล์มในทะลายไม่ให้มีมากเกินไปในช่วงเติบโตให้ผลผลิตระยะแรก นอกจากนี้มีการทดลองใช้ฟิโนลเมอร์คิวไรอะซีเทตในแปลงเพาะปลูกซึ่งพบว่าสามารถกำจัด *M. palmivorus* ได้ แต่เนื่องจากมีสารปรอทเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีผลต่อผู้ใช้งาน จึงยังไม่มีการใช้จริงในเชิงเกษตรกรรม และมีการใช้ไซโคลเฮกซอไมด์ที่สามารถป้องกันโรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมันได้ แต่สารป้องกันที่ใช้มีอันตรายต่อผู้ใช้นาน (Wastie, 1982) สำหรับโรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมันมีการใช้รา *Trichoderma* sp. เพื่อกำจัดราที่ทำให้เกิดโรคร่วมกับการใช้สารเคมี (นคร สารละออง, 2539) การใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนสิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อระบบนิเวศและสมดุลจุลินทรีย์ในระบบนิเวศนั้น จึงมีการคิดค้นเพื่อหาทางเลือกในการควบคุมโรคแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ที่เป็นอันตราย



รูปที่ 1.7 การเจริญของ *Marasmius palmivorus* บนทะลายปาล์ม (ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช, 2547)

การควบคุมโรคโดยวิธีทางชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพ คือ การใช้สิ่งมีชีวิตใดสิ่งมีชีวิตหนึ่ง เช่น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) เพื่อลดจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง กลไกการควบคุมโรคพืชในจุลินทรีย์ขึ้นกับปฏิสัมพันธ์ทางนิเวศวิทยาซึ่งมี 4 แบบ ได้แก่ ภาวะแข่งขัน, การหลั่งสารยับยั้งการเจริญ, ภาวะปรสิตของจุลินทรีย์ และการเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการต้านทานโรค (รูปที่ 1.8) การควบคุมทางชีวภาพสามารถใช้จุลินทรีย์ได้หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเอนโดไฟติกแบคทีเรีย (Dennis และ Webster, 1971), แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Trias และคณะ, 2008) หรือแม้กระทั่งราเพื่อควบคุมโรคพืชที่เกิดจากรากโรค (Inglis และ Kawchuk, 2002; Keswani และคณะ, 2019)



รูปที่ 1.8 กลไกการควบคุมโรคของจุลินทรีย์ (Deka และคณะ, 2015)

ภาวะแข่งขัน (competition) คือ ภาวะที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถแย่งสารอาหาร แร่ธาตุต่าง ๆ หรือปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งการเข้าแย่งพื้นที่อยู่อาศัยทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถดำรงอยู่ได้ โดยเมื่อสารอาหารและแร่ธาตุมีอย่างจำกัด จะส่งผลให้การงอกและเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคลดลง ทำให้หยุดการแพร่ระบาดของโรคได้ (Kohl และคณะ, 2019) ตัวอย่างการควบคุมเชื้อก่อโรคโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ที่มีความสามารถในการแย่งธาตุเหล็กภายในดินโดยผลิตสาร siderophore ไปแย่งจับธาตุเหล็กในดินที่อยู่รอบ ๆ รากพืช ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคได้ธาตุเหล็กลดลง จึงไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้ และสารที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิตยังเป็นสารที่ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นด้วย (Wang และคณะ, 2020) นอกจากนี้มีรายงานว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Pseudomonas* sp. มีความสามารถในการครอบครองพื้นที่บริเวณรากพืชโดยสามารถสร้างสารที่ช่วยทำให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยึดเกาะกับพื้นผิวของพืชได้ดีและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังสามารถสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Wang และคณะ, 2020) โรคที่เกิดกับพืชหลังจากการเก็บเกี่ยวจะนิยมใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถอื่นอาจทำให้มีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (Whipps, 2001) การควบคุมโรคทางชีวภาพโดยอาศัยความสามารถในการแข่งขันจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ด้วย เช่น ปริมาณสารอาหารในดิน ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่ต้องเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Kohl และคณะ, 2019)

การหลั่งสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (antibiosis) เป็นลักษณะซึ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคโดยการหลั่งสารออกมานอกเซลล์ แล้วสารนั้นมีผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite), สารปฏิชีวนะ (antibiotic) และเอนไซม์ (enzyme) เป็นต้น (Sunpapao และคณะ, 2018) การควบคุมโรคด้วยวิธีนี้ประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรคมามากที่สุด เนื่องจากสารต้านจุลชีพที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิตนั้น มีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่กว้าง (broad-spectrum activity) ทำให้สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหลั่งสารนี้ เช่น *Streptomyces* sp. ซึ่งสามารถผลิตสารหลายชนิดที่ต้าน

การเจริญของจุลินทรีย์ เช่น นาทามัยซิน (natamycin) จาก *S. natalensis*, เตตราไซคลิน (tetracycline) จาก *S. aureofaciens* เป็นต้น (Gopalakrishnan และคณะ, 2020), *Bacillus* sp. ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ เช่น อีทูริน (iturin), เซอร์แฟคติน (surfactin) และเฟนโจซิน (fengycin) และ *Pseudomonas* sp. ซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น DAPG, ไพร์โรลนิตริน (pyrolnitrin) และฟีนาซีน (phenazine) เป็นต้น (Kohl และคณะ, 2019) แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ ยกตัวอย่างมานั้นพบว่ามีประสิทธิภาพสามารถควบคุมโรคพืชได้หลายโรคจึงนิยมนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ในการควบคุมทางชีวภาพบ่อยครั้ง (Gopalakrishnan และคณะ, 2020; Li และคณะ, 2016)

ภาวะปรสิต (parasitism) ของจุลินทรีย์ เป็นลักษณะซึ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถเข้าทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้เนื่องจากมีสมบัติเป็นปรสิตกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเข้าไปเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคได้ เช่น ไคตินเนส, เซลลูเลส และบีตา-1,3-กลูคาเนส เป็นต้น (Giovannoni และคณะ, 2020; Li และคณะ, 2016; Tanvir และคณะ, 2016) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นปรสิต เช่น *Trichoderma* sp. ที่อาศัยในดินบริเวณรากพืชและอาศัยร่วมกับพืช มีความสามารถในการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีการเป็นปรสิตต่อเชื้อก่อโรค เช่น *R. solani* (Sunpapao และคณะ, 2018)

การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการต้านทาน (induce systemic resistance) คือ การเหนี่ยวนำโดยสารที่ผลิตจากจุลินทรีย์และสารนั้นกระตุ้นให้พืชเกิดการต้านทานโรคได้ โดยสามารถเกิดได้จากการกระตุ้นจากเชื้อที่ไม่ก่อโรค เมื่อพืชถูกกระตุ้นจะทำให้เซลล์พืชเกิดการตายอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response) จากนั้นจะมีการส่งสัญญาณทางชีวเคมีไปยังส่วนต่าง ๆ เพื่อไปกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานของพืชให้ตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อก่อโรคต่อไป (Choudhary และคณะ, 2007) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคที่สามารถกระตุ้นให้พืชเกิดการต้านทานได้ เช่น แบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะอาศัยอยู่ร่วมกับพืชในบริเวณรากพืชหรือจุลินทรีย์ที่เป็นเอนโดไฟต์กับพืช (Sunpapao และคณะ, 2018) โดยจุลินทรีย์ไม่ก่อโรคจะไปกระตุ้นการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืชทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืช เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคต่อไป ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มาจากเอนโดไฟต์ของพืช เช่น *Bacillus thuringiensis* ที่มีความสามารถในการควบคุมโรคแคงเกอร์ที่เกิดจาก *Xanthomonas citri* subsp. *citri* และยังสามารถส่งเสริมการเจริญของส้มได้ (Islam และคณะ, 2019)

สารควบคุมทางชีวภาพจากจุลินทรีย์

ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมราก่อโรคมียากมาย เช่น การใช้สารระเหย การใช้สารเมทาบอลิต์ปฐมภูมิ และสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิ และการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรค เป็นต้น ตัวอย่างงานวิจัยสำหรับการใช้ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรคมี่ ดังนี้

การใช้สารเมทาบอลิตรีหะเหยได้ที่ผลิตจาก *Trichoderma longibrachiatum* EF5 ในการยับยั้งการเจริญของรา *Sclerotium rolfsii* และ *Macrophomina phaseolina* ที่ทำให้เกิดโรคในข้าว จาก การทดสอบผลของสารระเหยโดย Tripartite plate assay พบว่า *T. longibrachiatum* EF5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* ได้และเมื่อตรวจสอบลักษณะสายใยราพบว่าสายใยราที่มีลักษณะที่บางและเล็กมากขึ้นเมื่อเทียบกับสายใยราปกติ ผู้วิจัยจึงสกัดสารระเหยโดยใช้ Tenax-coated stainless-steel column แล้วระบุชนิดของสารโดย GC-MS-TD ผลจากการศึกษาชนิดของสารพบว่าสารที่ระเหยได้เหล่านี้ประกอบด้วย longifolene, caryophyllene, 1-butanol 2-methyl, cedrene และ cuprenene โดยที่สารระเหยที่ผลิตจากจุลินทรีย์นี้มีความสามารถยับยั้งรา *S. rolfsii* ทั้งนี้ *T. longibrachiatum* EF5 เป็นเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นข้าว และพบว่ามีสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวได้ด้วย (Sridharan และคณะ, 2020)

การใช้สารเมทาบอลิตรีหะเหยที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย โดยเมื่อเพาะเลี้ยง *Trichoderma* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Solid wheat และ Liquid STP เป็นระยะเวลา 4 วัน และสกัดสารเมทาบอลิตรีหะเหยโดยวิธี solvent partitioning method โดยใช้เอธิลอะซิเตตในการสกัดและนำมาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคโดยวิธี agar well diffusion และ disk diffusion เมื่อตรวจสอบลักษณะของแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าสารสกัดที่ได้จาก *Trichoderma pseudoharzianum* T113 มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas compestris* และสารสกัดเมทาบอลิตรีหะเหยที่ได้จาก *Trichoderma viridae* มีความสามารถในการฆ่าตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* และมีความสามารถในการยับยั้งการฟักตัวของไข่ไส้เดือนฝอยได้ (Khan และคณะ, 2020)

การใช้สารเมทาบอลิตรีหะเหยที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 ในการควบคุมโรคมกมโมซิส (gummosis) ในพืชที่เกิดจากรา *Botryoshaeria dothidae* เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* SYBC H47 ที่แยกได้จากน้ำผึ้งพบว่ามี ความสามารถในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดได้แก่ *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, *Candida albicans* และ *B. dothidae* เมื่อสกัดสารเมทาบอลิตรีหะเหยโดยผสมน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์กับกรดไฮโดรคลอริกที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 2.0 ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 7.0 และสกัดด้วยเมทานอล 100% แล้วนำสารเมทาบอลิตรีหะเหยไปทำให้บริสุทธิ์โดย HPLC LC/ESI-MS/MS พบสารหลายชนิด ได้แก่ bacillomycin L, fengycin และ surfactin เมื่อนำสารที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคมกมโมซิสโดยวิธี agar diffusion assay พบว่า bacillomycin L มีความในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียของ *B. dothidae* และ surfactin มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของสายใยรา นอกจากนี้แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* SYBC H47 ยังมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ด้วย (Li และคณะ, 2016)

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการต่อจากงานวิจัยของ ญัฐมณ วาจรัส (2562) ซึ่งได้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ที่ทำให้เกิดโรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมันจากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากตัวอย่างดิน และพบว่าผลที่ได้ทั้งจากการทำ dual culture และการนำน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ โดยแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย M27, M25 และ M22 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ในงานวิจัยดังกล่าวยังทำการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารควบคุมทางชีวภาพ โดยทดสอบหาค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งและควบคุมรา ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เท่ากับ 7 และในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB สามารถให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด สำหรับงานวิจัยที่จะดำเนินต่อไปนั้น ได้นำแบคทีเรียดังกล่าวทั้ง 3 ชนิดที่ให้ผลการควบคุมราที่ดีที่สุดมาพิสูจน์เอกลักษณ์, ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตสารแอนติไบโอติก, ทดสอบความสามารถในการผลิตสารระเหยจากแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp., ทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารแอนติไบโอติกได้ดี และทดสอบเบื้องต้นเพื่อสกัดสารประกอบแอนติไบโอติกที่ผลิตจากแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp. นอกจากนี้เพื่อให้ร่าก่อโรค *Marasmius* sp. ซึ่งเป็นราในไฟลัม Basidiomycota ที่ใช้ในการศึกษานี้สร้างเบสิดิโอสปอร์ได้มากขึ้น จึงศึกษาหาภาวะเบื้องต้นที่สามารถชักนำให้ *Marasmius* sp. สามารถสร้างเบสิดิโอสปอร์ได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

งานวิจัยนี้ศึกษาหาภาวะที่ชักนำให้เกิดการสร้างเบสิดิโอสปอร์ของ *Marasmius* sp. การทดสอบผลสารระเหยของแบคทีเรียในการยับยั้งร่าก่อโรค การหาภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาในการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตสารแอนติไบโอติกจากแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ในการยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคทะลายเน่าในปาล์มน้ำมัน การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ การสกัดสารแอนติไบโอติกและทดสอบผลการควบคุมโรคเบื้องต้นเพื่อพัฒนาต่อยอดการใช้สารควบคุมทางชีวภาพจากแบคทีเรียในการยับยั้งโรคพืชที่เกิดจากจุลินทรีย์แทนการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย

บทที่ 2

เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1 เครื่องมือที่ใช้

1. กระจกบดยิปซัมพลาสติก ขนาด 5 มิลลิเมตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. เครื่องแก้วขนาด 250 และ 1000 มิลลิเมตร ของบริษัท Pyrex, USA
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
4. เครื่องซั่งละเอียด รุ่น A200s 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. จานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
10. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
11. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น j2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
12. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
13. ไมโครปิเปตและทิปรุ่น P200 และ P1000 มิลลิเมตร ของบริษัท Nichiryo, Japan
14. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore, USA
15. cock Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
16. เครื่องอบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo cycler PCR) รุ่น MyCycler Thermal Cycler ของบริษัท Bio-rad Laboratories, USA
18. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) รุ่น N-100 ของบริษัท Eyela, Japan

2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
2. ทริปโตเน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Productora de Agar SA, Chili
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
5. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท Himedia, India
6. สีย้อมดีเอ็นเอความเข้มข้น 6 เท่า (6X loading dye) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
7. ผงวุ้นอะกาโรส (agarose) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
8. เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) ของบริษัท Merck, Germany
9. SERVA DNA stain G ของบริษัท Serva Electrophoresis GmbH, Germany
10. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

2.3 ชุดทดลองสำเร็จรูป

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit ของบริษัท Geneaid Biotech, Taiwan
2. ชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit ของบริษัท Thermo Scientific, USA
3. GoTaq® Green Master Mix ของบริษัท Promega, USA

2.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
9F	5'-GAGTTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1510R	5'-GGCTACCTTGTTACGA-3'

(Hayat และคณะ, 2013)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมแบคทีเรียและรา *Marasmius* sp.

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ M22, M25 และ M27 ที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. จากงานวิจัยก่อนหน้า (ณัฐมณ วาจรัส, 2562) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-bertani broth (LB) (ภาคผนวก ก1) และบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที

นำชิ้นวุ้น (agar plug) ขนาด 0.5 เซนติเมตร ของ *Marasmius* sp. ที่แยกได้จากปาล์มที่เกิดโรคทะลายเน่า เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก2) โดยวางชิ้นวุ้นไว้ที่กลางเพลท และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน

2. การตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของ *Marasmius* sp.

นำชิ้นวุ้นของ *Marasmius* sp. วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% Water agar (ภาคผนวก ก3) (Pong และคณะ, 2012) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยใช้สีย้อม Lactophenol cotton blue (ภาคผนวก ข1)

3. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารระเหยที่สามารถยับยั้งรา

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และเตรียมรา *Marasmius* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำจานอาหารส่วนที่มีราและแบคทีเรียประกบกัน และพันด้วยพาราฟิล์ม (Dennis และ Webster, 1971) จากนั้นบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน และวัดขนาดของโคโลนีราเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ตามสูตรด้านล่าง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญได้}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราชุดควบคุม}} \times 100$$

4. การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแอนติบิโอติกจากแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.50 นำแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีค่า pH 7 บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา

10 นาที เพื่อแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ กรองน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวกรองปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion โดยวางชิ้นส่วนของรากับอาหารแข็ง PDA ที่มีสน้ำเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ 2 ส่วนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ส่วน บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน ตรวจสอบการเจริญของเส้นใยราและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราที่เจริญ แล้วนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตร (Sunpapao และคณะ, 2018) เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับชุดควบคุมที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรีย

5. การหาระยะเวลาที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของรา *Marasmius* sp.

นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งราสูงที่สุดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร pH 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.5 นำแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร pH 7 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4 ที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง โดยติดตามการเจริญและตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราทุก ๆ 4 ชั่วโมง ดังนี้

สำหรับการติดตามการเจริญ นำตัวอย่างที่แต่ละช่วงเวลามาวัดค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร ส่วนการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งรา นำตัวอย่างที่แต่ละช่วงเวลามาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ จากนั้นกรองน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในอัตราส่วน 2:10 แล้วรอให้อาหารแข็งตัว จากนั้นวางชิ้นวันรา *Marasmius* sp. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LB แทนน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ ตรวจสอบผลการทดลองโดยดูการเจริญของรา *Marasmius* sp. และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญจากสูตรข้างต้น

6. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารประกอบแอนติบิโอติกจากแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.5 นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่มีค่า pH 7 (Tanvir และคณะ, 2016) บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิและระยะเวลาบ่มที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ กรองน้ำเลี้ยงเซลล์ผ่านตัวกรองปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ไปสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยตัวทำละลาย ซึ่งประกอบด้วย สารละลาย 100% เอธิลอะซีเตตและสารละลาย 100% อะซีโตน ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นเขย่าสารผสมไว้ข้ามคืน แล้วปล่อยให้แยกในกรวยแยก ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะละลายอยู่ในตัวทำละลายในชั้น

บนของกรวยแยก นำสารสกัดชั้นบนที่ได้มาจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) (Rajaram และคณะ, 2020) จากนั้นนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้ไปทดสอบการยับยั้งราโดยวิธี agar diffusion และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ โดยชุดควบคุมเป็นสารละลายที่ใช้ในการสกัดซึ่งคือ เอธิลอะซีเตตและสารละลายอะซีโตน และน้ำกลั่น (Chairin และ Petcharat, 2017) จากนั้นนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC LC/ESI-MS/MS เพื่อให้ทราบชนิดของสารต่อไป

7. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27

7.1) ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย ได้แก่ การย้อมแกรม และลักษณะสมบัติภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x100 เท่า

7.2) ทดสอบระดับชีววิทยาโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐาน 9F และ 1510R เทียบกับฐานข้อมูล

7.2.1) เตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียโดยใช้สารละลายของชุดสกัดดีเอ็นเอ Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) ดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียปริมาตรรวม 3 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเติมสารละลาย Gram positive bacteria buffer ที่เติม Lysozyme แล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที โดยเขย่าสารละลายทุก ๆ 10 นาที เติม 20 ไมโครลิตรของ Proteinase K ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 10 นาที โดยเขย่าสารละลายทุก ๆ 3 นาที จากนั้นเติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน และบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 10 นาที โดยเขย่าทุก ๆ 3 นาที จากนั้นเติม RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเขย่าสารให้เข้ากัน เทสารละลายที่ได้ลง GD column และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 นาที เปลี่ยน collection tube แล้วเติมสารละลาย W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ และเติม 600 ไมโครลิตรของ Wash buffer ที่เติมเอทานอลแล้ว จากนั้นปั่นเหวี่ยงระยะเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลาย และปั่นเหวี่ยงคอลัมน์ต่ออีก 3 นาที นำคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Elution buffer ที่อุ่น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 30 วินาที และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7.2.2) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 7.2.1) มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ดังนี้

2X GoTaq® Green Master Mix	25 ไมโครลิตร
10 µM 9F ไพรเมอร์	1.0 ไมโครลิตร
10 µM 1510R ไพรเมอร์	1.0 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5.0 ไมโครลิตร
Nuclease-Free Water	18 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่อง PCR และปรับอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนดดังนี้ (Kaewklom และคณะ, 2014)

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

7.2.3) ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก 7.2.2) มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลโดยใช้บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE) (ภาคผนวก ข2) โดยเตรียมอะกาโรสเจล 0.1% แล้วโหลดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนไปจนเกือบสุดทาง นำเจลออกและนำไปส่องภายใต้ UV และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

7.2.4) ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้สารละลายของชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA) โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเติม Binding bufer ในอัตราส่วน 1:1 และผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร มาใส่ใน GeneJet purification column ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30-60 วินาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ แล้วเติม Wash buffer ที่เติมเอทานอลแล้ว ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30-60 วินาที และทิ้งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ จากนั้นนำคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที

เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์โดยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

7.2.5) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

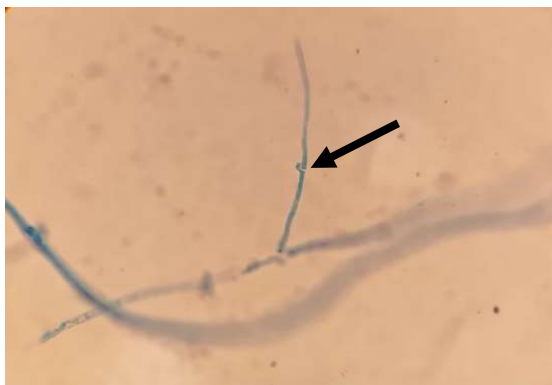
ส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 7.2.4 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้บริการของบริษัท ATGC (ประเทศไทย) เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จากฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การหาลักษณะเบื้องต้นของ *Marasmius* sp.

จากการเพาะเลี้ยงรา *Marasmius* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% Water agar จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำสายใยราที่ได้มาข้อมด้วยสีย้อม Lactophenol cotton blue เมื่อส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบโครงสร้างของลักษณะสายใยราที่มีลักษณะเป็นเส้นยาวแตกแขนง มีผนังกั้นในลักษณะโครงสร้างของ clamp connection บนสายใยราคล้ายปุ่มบนสายใย และที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะกลมรีที่บริเวณปลายสายใยราดังรูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2 ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 : ลักษณะของสายใย *Marasmius* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า บริเวณลูกศรแสดงลักษณะของ clamp connection บนสายใยรา















รูปที่ 4.2 : ลักษณะโครงสร้างของสปอร์ของ *Marasmius* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า บริเวณลูกศรแสดงลักษณะของสปอร์ที่พบ

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารระเหยที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp.

จากการนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ประกอบกับจานเพาะเลี้ยงรา *Marasmius* sp. พันด้วยพาราฟิล์ม และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นตรวจสอบการเจริญโดยวัดขนาดโคโลนีของราเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ประกอบด้วยเพลทอาหารที่ไม่มีแบคทีเรีย

พบว่าทั้งสามสายพันธุ์สามารถผลิตสารระเหยที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้ โดยแบคทีเรีย M22 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ได้ดีที่สุดโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 40.41% และแบคทีเรีย M25 และ M27 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 16.23% และ 7.28% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ด้วยสารระเหยจากแบคทีเรีย M22, M25 และ M27













แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ			เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
M22					40.41%
M25					16.23%
M27					7.28%

3. การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแอนตะโกนีสติกจากแบคทีเรีย













จากการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ pH 7 โดยบ่มเขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง แล้วนำน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในอัตราส่วน 2:10 และนำชิ้นส่วนของ *Marasmius* sp. วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้ววัดขนาดโคโลนีของราที่เจริญเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ในอัตราส่วนที่เท่ากันได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.2 ถึงตารางที่ 4.5

เมื่อเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ของ *Marasmius* sp. ที่เจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย พบว่าสำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ 65.67%, 62.10%, 61.84% และ 16.04% ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ 32.30%, 56.14% และ 35.24% ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ได้ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ 59.44%, 44.20% และ 10.34% ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ จากผลการทดลองที่ได้เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27 สามารถผลิตสารแอนตะโกนีสติกได้ดีเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น เช่นที่ 45 องศาเซลเซียส สารแอนตะโกนีสติกสูญเสียแอกทิวิตีในการยับยั้งรา ทั้งนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ M22 สามารถผลิตสารแอนตะโกนีสติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่ 30 องศาเซลเซียส จึงเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ที่เจริญที่อุณหภูมินี้เพื่อศึกษาต่อไป













ตารางที่ 4.2 การยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ			เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญ
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
M22					65.67%
M25					32.30%
M27					59.44%













ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ			เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญ
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
M22					62.10%
M25					56.14%
M27					44.20%

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ			เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญ
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
M22					61.83%
M25					35.24%
M27					10.34%

ตารางที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส










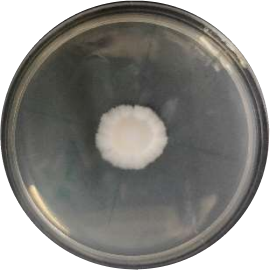

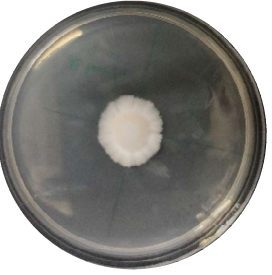
แบคทีเรีย	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ			เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญ
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
M22					16.04%
M25					0%
M27					0%

4. การหาระยะเวลาที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp.


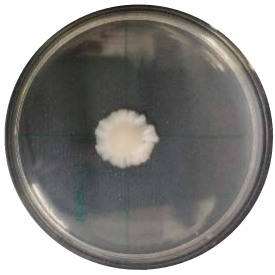










จากการทดลองก่อนหน้าได้คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มาทดสอบหาระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้สามารถผลิตสารแอนติบิโอติกที่สามารถยับยั้ง *Marasmius* sp. ได้สูงที่สุด พร้อมกับติดตามการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีค่า pH 7 และบ่มเขย่าที่ 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง มาติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และติดตามประสิทธิภาพการยับยั้งโดยนำน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในอัตราส่วน 2:10 แล้ววางขึ้นวุ้นราเพื่อดูผลการยับยั้งการเจริญของรา *Marasmius* sp. โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเทียบกับชุดควบคุม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.3

สำหรับผลการยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. พบว่าน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ที่ระยะเวลาตั้งแต่ 8 ชั่วโมงขึ้นไป แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งมากกว่า 60% โดยที่ระยะเวลา 16 และ 20 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้ 65.67% และ 65.75% ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดที่เวลา 28 ชั่วโมง ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 69.93% จากการติดตามการเจริญพบว่าแบคทีเรียเข้าสู่ช่วง stationary phase ในช่วงชั่วโมงที่ 8 จนถึงชั่วโมงที่ 20 และแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ช่วง death phase เมื่อผ่านไป 20 ชั่วโมง โดยจากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย M22 สามารถแบคทีเรียผลิตสารควบคุมทางชีวภาพได้ดีเมื่อเริ่มเข้าสู่ช่วง stationary phase และสามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเข้าสู่ระยะปลายของ stationary phase จนถึงช่วง death phase


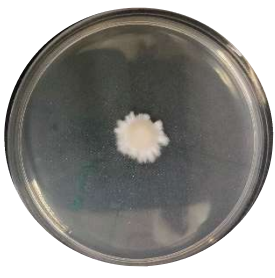










ตารางที่ 4.6 การยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน

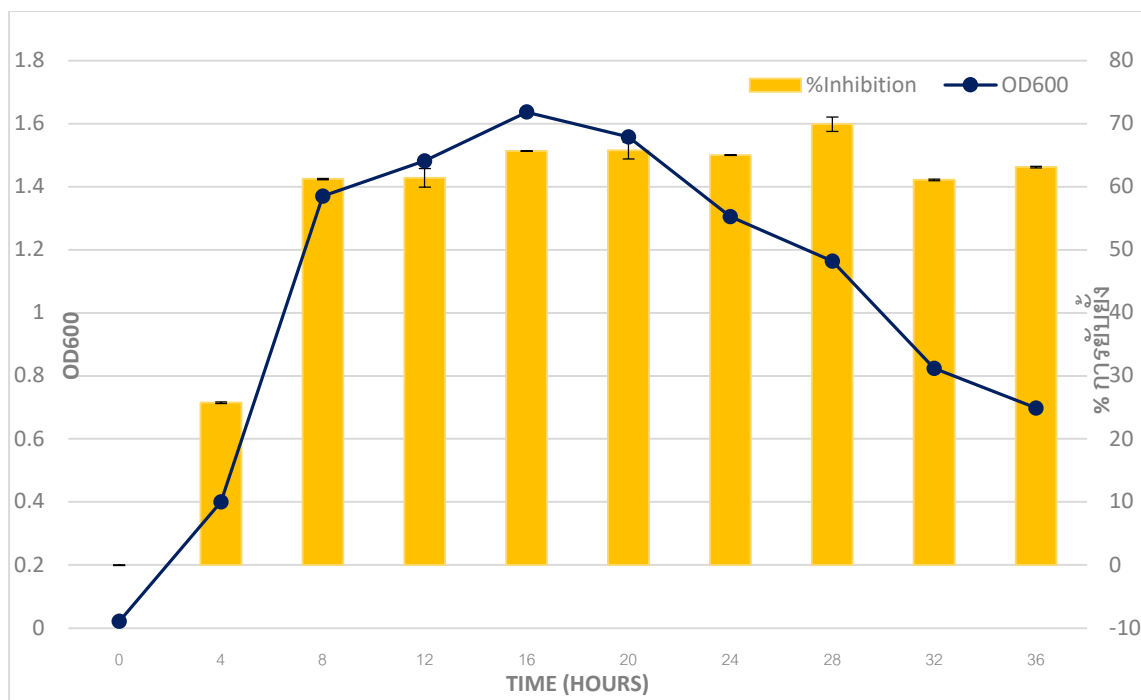
ระยะเวลา	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ			เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญ
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
4 ชั่วโมง					25.76%
8 ชั่วโมง					61.25%
12 ชั่วโมง					61.42%

ตารางที่ 4.6 การยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน (ต่อ)

ระยะเวลา	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ			เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญ
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
16 ชั่วโมง					65.67%
20 ชั่วโมง					65.75%
24 ชั่วโมง					65.03%

ตารางที่ 4.6 การยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย M22 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน (ต่อ)

ระยะเวลา	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ			เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญ
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
28 ชั่วโมง					69.93%
32 ชั่วโมง					61.11%
36 ชั่วโมง					63.14%



รูปที่ 4.3 : การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 (OD_{600}) และผลการยับยั้งราต่อเวลา

5. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารประกอบแอนติไบโอติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ M22

เลี้ยงแบคทีเรีย M22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่า OD_{600} ประมาณ 0.5 แล้วนำแบคทีเรียปริมาณ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 rpm เป็นระยะเวลา 28 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ผสมกับ 100% เอทิลอะซิเตต ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในกรวยแยกสาร แล้วตั้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นเป็นระยะเวลา 1 คืน จากนั้นนำส่วนใสที่อยู่ชั้นบนของกรวยแยกไปขจัดตัวทำละลายด้วย rotary evaporator แล้วละลายตะกอนในสารละลายเมทานอล เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา

*****ยังไม่ได้ทดสอบการยับยั้งเนื่องจากสถานการณ์โควิด-19*****

6. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27

6.1) การศึกษาลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย

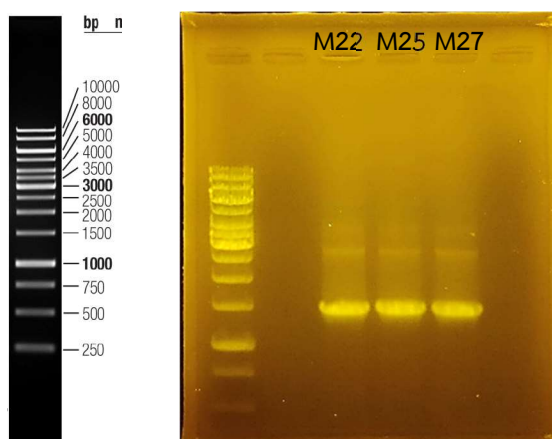
จากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27 โดยย้อมสีแบคทีเรีย และตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 : ลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่าของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 (ซ้าย), M25 (กลาง) และ M27 (ขวา)

6.2) การทดสอบระดับชีวโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA

จากการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐาน 9F และ 1510R จากนั้นทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ผลดังรูปที่ 4.5 ซึ่งพบว่าเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ Thermo Scientific GeneJET PCR Purification kit (Thermo Scientific, USA) แล้วตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ก่อนส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4.5 : ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27 เปรียบเทียบกับ 1kb DNA Ladder (ซ้าย)

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA เทียบกับฐานข้อมูล ได้ผลดังแสดงไว้ในภาคผนวก ค. ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 มีความเหมือน 100% กับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CAB1111 (KJ194590.1), แบคทีเรียสายพันธุ์ M25 มีความเหมือน 100% กับ *Bacillus velezensis* สายพันธุ์ T18 (KY307917.1), และแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 มีความเหมือน 99.87% กับ *Bacillus velezensis* สายพันธุ์ R-QL-120-24 (MT078637.1)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของ *Marasmius* sp. พบว่าเมื่อเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% Water Agar บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า *Marasmius* sp. สามารถสร้างสปอร์ที่มีลักษณะกลมรีขนาดเล็กได้โดยจะพบการสปอร์ที่ปลายสายใยของรา และสายใยรา *Marasmius* sp. พบว่ามีลักษณะยาว มีผนังกันแบบ clamp connection ซึ่งเป็นโครงสร้างจำเพาะของราในไฟลัม Basidiomycota

การทดสอบความสามารถในการผลิตสารระเหยจากแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 เพื่อดูการยับยั้งการเจริญของรา *Marasmius* sp. ทำการทดลองโดยวิธี face to face plate พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 40.41% ตามด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 และ M27 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 16.23% และ 7.28% ตามลำดับ

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแอนติไบโอติกของแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสารแอนติไบโอติกที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ 65.67% สารแอนติไบโอติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ 56.14% สารแอนติไบโอติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีเมื่อบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ 59.44% จากผลการทดลองที่ได้พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตสารแอนติไบโอติกได้ดีเมื่อเจริญในอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่เรียกว่าอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สารแอนติไบโอติกที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา *Marasmius* sp. จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสารแอนติไบโอติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดจึงเลือกแบคทีเรีย M22 ในการศึกษาต่อไป

จากการติดตามการเจริญและหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารแอนติไบโอติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 พบว่าสารแอนติไบโอติกจากแบคทีเรีย M22 เมื่อบ่มเขย่าเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงขึ้นไป หรือเมื่อแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase จะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ดี และจะดีที่สุดเมื่อเข้าสู่ระยะท้ายของ stationary phase ที่ระยะเวลา 28 ชั่วโมง โดยที่ระยะเวลาบ่มนี้สารแอนติไบโอติกที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Marasmius* sp. ได้ 69.93% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยผลการทดสอบที่ได้พบว่าสารเมทาบอลิต์ที่ได้จากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ดี

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย M22, M25 และ M27 เมื่อย้อมสีแกรมดูลักษณะการติดสีของแบคทีเรียพบว่าทั้งสามสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งยาว เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 มีความคล้ายคลึง 100% กับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CAB1111 (KJ19450.1) แบคทีเรียสายพันธุ์ M25 มีความคล้ายคลึง 100% กับแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* สายพันธุ์ T18 (KY307917.1) และแบคทีเรียสายพันธุ์ M27 มีความคล้ายคลึง 99.87% กับแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* สายพันธุ์ R-QL-120-24 (MT078637.1) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* สามารถระบุได้อย่างแม่นยำมากขึ้นด้วยการตรวจสอบยีนที่ตำแหน่งอื่น ๆ เพิ่มเติม (Kunst และคณะ, 1997)

B. subtilis และ *B. velezensis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในดินทั่วไป และมีความสามารถในการควบคุมโรคพืชได้ (Jayakumar และคณะ, 2019) เช่นในการทดลองของ Arroyave-Toro และคณะ (2017) ได้ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* EA-CB0015 ซึ่งเป็นเอนโดไฟติกแบคทีเรียในการควบคุมโรคที่เกิดจากราช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยว โดยจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของ *Botrytic cinerea* และ *Colletotrichum acutatum* ได้

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 คือ *Bacillus subtilis* ที่มีความสามารถในการผลิตสารแอนติไบโอติกเพื่อยับยั้งการเจริญของรา *Marasmius* sp. ได้เมื่อแบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสารแอนติไบโอติกจะมีประสิทธิภาพเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 28 ชั่วโมง จากผลการทดลองที่ได้สามารถนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ต่อเพื่อระบุชนิดของสารที่แบคทีเรียผลิตได้ แบคทีเรียและสารที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคทะลายเน่าในปาล์ม และเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อการใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพโดยแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจูลินทรีย์ได้

เอกสารอ้างอิง

- Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., & Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, 114, 195-200.
- Chairin, T., & Petcharat, V. (2017). Induction of defense responses in longkong fruit (*Aglaia dookoo* Griff.) against fruit rot fungi by *Metarhizium guizhouense*. *Biological Control*, 111, 40-44.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289-297.
- Deka, H., Deka, S., & Baruah, C. K. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Value Addition: Mechanism of Action. In D. Egamberdieva, S. Shrivastava, & A. Varma (Eds.), *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants* (pp. 305-321). Cham: Springer International Publishing.
- Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 41-48.
- Dick, B. (2015). A resource for pests and disease of cultivated palm symptoms of diseases and disorders. Retrieved from <http://idtools.org/id/palms/symptoms/index.php>. 20 April 2021.
- Elliott., M. L. (2015). A resource for pests and disease of cultivated palm symptoms of diseases and disorders. Retrieved from <http://idtools.org/id/palms/symptoms/index.php>. 20 April 2020.
- Giovannoni, M., Gramegna, G., Benedetti, M., & Mattei, B. (2020). Industrial use of cell wall degrading enzymes: The fine line between production strategy and economic feasibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 356.
- Gopalakrishnan, S., Sharma, R., Srinivas, V., Naresh, N., Mishra, S. P., Ankati, S., . . . Simic, N. (2020). Identification and characterization of a *Streptomyces albus* strain and its secondary metabolite organophosphate against charcoal rot of sorghum. *Plants*, 9(12), 1727.
- Hayat, R., Sheirdil, R. A., Iftikhar-ul-Hassan, M., & Ahmed, I. (2013). Characterization and identification of compost bacteria based on 16S rRNA gene sequencing. *Annals of Microbiology*, 63(3), 905-912.

- Hughes, D. (2014). Leaf spot in secondary oil palm nursery. Retrieved from <https://plantvillage.psu.edu/posts/4047-oil-palm-leaf-spot-in-secondary-oil-palm-nursery>. 20 April 2021.
- Inglis, G. D., & Kawchuk, L. M. (2002). Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(1), 60-70.
- Islam, M. N., Ali, M. S., Choi, S. J., Hyun, J. W., & Baek, K. H. (2019). Biocontrol of citrus canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using an endophytic *Bacillus thuringiensis*. *Plant Pathology Journal*, 35(5), 486-497.
- Jayakumar, A., Krishna, A., Mohan, M., Nair, I. C., & Radhakrishnan, E. K. (2019). Plant growth enhancement, disease resistance, and elemental modulatory effects of plant probiotic endophytic *Bacillus* sp. Fcl1. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 526-534.
- 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(4), 354-368.
- Keswani, C., Singh, H. B., Hermosa, R., Garcia-Estrada, C., Caradus, J., He, Y. W., . . . Sansinenea, E. (2019). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23-24), 9287-9303.
- Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z. C., Ling, J., Yang, Y. H., Li, Y., & Xie, B. Y. (2020). Bioactive Secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. *Microorganisms*, 8(3), 1-15.
- Kohl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 845.
- Konan, E. E., Durand-Gasselín, T., Kouadio, J. Y., Flori, A., & Rival, A. (2006). A modeling approach of the *in vitro* conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84(1), 99-112.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., . . . Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256.

- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2016). Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PLoS One*, 11(9), e0162125.
- Pong, V. M., Zainal Abidin, M. A., Almaliky, B. S. A., Kadir, J., & Wong, M. Y. (2012). Isolation, fruiting and pathogenicity of *Marasmiellus palmivorus* (Sharples) Desjardin (comb. prov.) in oil palm plantations in west Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 35, 37-48.
- Rajaram, S. K., Ahmad, P., Keerthana, S. S. S., Cressida, P. J., Moorthy, I. G., & Suresh, R. S. (2020). Extraction and purification of an antimicrobial bioactive element from lichen associated *Streptomyces olivaceus* LEP7 against wound inhabiting microbial pathogens. *Journal of King Saud University – Science*, 32(3), 2009-2015.
- Sridharan, A. P., Thankappan, S., Karthikeyan, G., & Uthandi, S. (2020). Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiological Research*, 236, 126436.
- Sunpapao, A., Chairin, T., & Ito, S. (2018). The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. *Biological Control*, 123, 36-42.
- Sutarta, E., Santoso, H., & Yusuf, M. A. (2015). Climate change on oil palm : It's impacts and adaptation strategies. Retrieved from https://www.researchgate.net/figure/Symptom-of-bunch-rot-disease-caused-by-Marasmius-palmivorus-in-higher-altitude_fig1_265201096. 20 April 2021.
- Tanvir, R., Sajid, L., Hasnain, S., Kulik, A., & Grond, S. (2016). Rare actinomycetes *Nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydvorans* as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation. *Microbiological Research*, 185, 22-35.
- Trias, R., Baneras, L., Montesinos, E., & Badosa, E. (2008). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11(4), 231-236.
- Turner, P. D. (1965). *Marasmius* infection of oil palms in Malaya. *Planter, Kuala Lumpur*, 1, 387-393.
- Wang, G. F., Meng, J. F., Tian, T., Xiao, X. Q., Zhang, B., & Xiao, Y. N. (2020). Endophytic *Bacillus velezensis* strain B-36 is a potential biocontrol agent against lotus rot

- caused by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1153-1162.
- Wastie, R. (1982). *Oil Palm Diseases and Disorders* (P. D. Turner Ed. Vol. 18). Kuala Lumpur: Oxford University Press.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487-511.
- กรมวิชาการเกษตร. (2019). องค์ความรู้เรื่องปาล์มน้ำมัน. การจัดการความรู้ สวพ.8. Retrieved from <https://www.doa.go.th/oard8/wp-content/uploads/2019/08/km3.pdf>. 26 มีนาคม 2564.
- คลินิกปาล์มน้ำมัน. (2017). โรคทะลายปาล์มเน่า. Retrieved from shorturl.at/dqvDU. 20 เมษายน 2564.
- ชัยวัช โขวเจริญสุข. (2563). แนวโน้มธุรกิจอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน. แนวโน้มธุรกิจอุตสาหกรรม. Retrieved from [https://www.krungsri.com/th/research/industry/industry-outlook/Agriculture/Sugar-\(1\)/IO/io-oil-palm-20-th](https://www.krungsri.com/th/research/industry/industry-outlook/Agriculture/Sugar-(1)/IO/io-oil-palm-20-th). 26 มีนาคม 2564.
- ณัฐมณ วาจรัส. (2562). แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *Marasmius* sp. ที่ก่อโรคในปาล์ม. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นคร สาระคุณ. (2539). การจัดการการผลิตปาล์มน้ำมัน. เอกสารการสอนชุดวิชาการจัดการการผลิตพืชไร่อุตสาหกรรม สาขาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, 1-158.
- ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. (2547). โรคของผลและทะลายปาล์มน้ำมัน. วารสารโรคพืช, 18(1-2), 58-64.
- ศิริชัย มามีวัฒน์. (2532). ปาล์มน้ำมัน: โครงการวิจัยและพัฒนาปาล์มน้ำมัน. ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, 11-15.
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. (2563). การปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทย. คลังข้อมูลสารสนเทศระดับภูมิภาค (ภาคใต้) Retrieved from <https://www.arda.or.th/kasetinfo/south/palm/controller/01-12.php>. 15 ตุลาคม 2563.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB)

<u>ส่วนประกอบ</u>	Tryptone	10 กรัม
	Yeast extract	5 กรัม
	โซเดียมคลอไรด์	10 กรัม
	ผงวุ้น	15 กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับและเติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วย 1M HCl หรือ 1M NaOH ให้มีค่าเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตรสุทธิ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

<u>ส่วนประกอบ</u>	อาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose broth	24 กรัม
	ผงวุ้น	15 กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับและเติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตรสุทธิ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2% Water Agar

<u>ส่วนประกอบ</u>	ผงวุ้น	2 กรัม
-------------------	--------	--------

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับและเติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารละลายและบัฟเฟอร์

1. สีย้อม Lactophenol cotton blue

<u>ส่วนผสม</u>	Lactic acid	20 มิลลิลิตร
	Phenol ที่ละลายแล้ว	20 มิลลิลิตร
	Glycerol	40 มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับให้เข้ากันโดยใช้ไฟอ่อน จากนั้นเก็บสีย้อมที่ได้ในขวดสีชา

1. บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE)

<u>ส่วนผสม</u>	Trizma base	121 กรัม
	กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55 กรัม
	สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	50 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตรสุทธิ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที

2. เตรียม 0.9% อะกาโรสเจล

<u>ส่วนผสม</u>	ผงอะกาโรสเจล	0.18 กรัม
	บัฟเฟอร์ 1X TAE	20 มิลลิลิตร

ชั่งผงอะกาโรสเจลลงในบัฟเฟอร์ นำไปอุ่นให้เจลละลาย และนำไปเทลงถาดแม่พิมพ์สำหรับขึ้นรูปเจล ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว

ภาคผนวก ค

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย M22, M25 และ M27

1. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22

Bacillus subtilis strain CAB1111 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KJ194590.1 Length: 1086

Range 1: 377 to 1042

core: 1230 bits (666), Expect: 0.0,

Identities: 666/666 (100%), Gaps: 0/666 (0%), Strand: Plus/Plus

```

Query 1      CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG 60
          |
Sbjct 377    CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG 436
          |
Query 61     TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC 120
          |
Sbjct 437    TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC 496
          |
Query 121    AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT 180
          |
Sbjct 497    AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT 556
          |
Query 181    GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGA 240
          |
Sbjct 557    GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGA 616
          |
Query 241    GGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG 300
          |
Sbjct 617    GGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG 676
          |
Query 301    CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAG 360
          |
Sbjct 677    CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAG 736
          |
Query 361    GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT TAGGGGTTTCC 420
          |
Sbjct 737    GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT TAGGGGTTTCC 796
          |
Query 421    GCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC 480
          |
Sbjct 797    GCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC 856
          |
Query 481    TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA 540
          |
Sbjct 857    TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA 916
          |
Query 541    AGCAACGCGAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTC 600
          |
Sbjct 917    AGCAACGCGAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTC 976
          |
Query 601    CCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT 660
          |
Sbjct 977    CCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT 1036
          |
Query 661    GGGTTA 666
          |
Sbjct 1037   GGGTTA 1042

```

2. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25

Bacillus velezensis strain T18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KY307917.1 Length: 1138

Range 1: 332 to 967

Score: 1175 bits (636), Expect: 0.0,

Identities: 636/636 (100%), Gaps: 0/636 (0%), Strand: Plus/Plus

```

Query 1   AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT 60
          |||
Sbjct 332  AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT 391

Query 61  TAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGC 120
          |||
Sbjct 392  TAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGC 451

Query 121 CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT 180
          |||
Sbjct 452  CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT 511

Query 181  TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA 240
          |||
Sbjct 512  TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA 571

Query 241  ACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCTCA 300
          |||
Sbjct 572  ACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCTCA 631

Query 301  CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG 360
          |||
Sbjct 632  CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG 691

Query 361  GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT 420
          |||
Sbjct 692  GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT 751

Query 421  AGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCA 480
          |||
Sbjct 752  AGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCA 811

Query 481  GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT 540
          |||
Sbjct 812  GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT 871

Query 541  TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAGAACCT 600
          |||
Sbjct 872  TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAGAACCT 931

Query 601  TACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT 636
          |||
Sbjct 932  TACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT 967

```

3. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M27

Bacillus velezensis strain R-QL-120-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: MT078637.1 Length: 1424

Range 1: 360 to 1107

Score: 1376 bits (745), Expect: 0.0,

Identities: 747/748 (99%), Gaps: 0/748 (0%), Strand: Plus/Plus

```

Query 1      GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGG 60
          |||
Sbjct 360    GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGG 419

Query 61     CACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 120
          |||
Sbjct 420    CACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 479

Query 121    ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTT 180
          |||
Sbjct 480    ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTT 539

Query 181    AAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTG 240
          |||
Sbjct 540    AAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTG 599

Query 241    AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG 300
          |||
Sbjct 600    AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG 659

Query 301    AACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG 360
          |||
Sbjct 660    AACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG 719

Query 361    GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT 420
          |||
Sbjct 720    GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT 779

Query 421    AGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGGAGTA 480
          |||
Sbjct 780    AGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGGAGTA 839

Query 481    CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT 540
          |||
Sbjct 840    CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT 899

Query 541    GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTA 600
          |||
Sbjct 900    GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTA 959

Query 601    GAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG 660
          |||
Sbjct 960    GAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG 1019

Query 661    TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCAAGC 720
          |||
Sbjct 1020   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC 1079

Query 721    ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC 748
          |||
Sbjct 1080   ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC 1107

```