ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ในการเคลือบเมล็ดเพื่อควบคุมเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* สาเหตุโรคยางไหลของแตง

Effect of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* B006 as seed coating for control of *Botryosphaeria rhodina*, cause of gummosis disease in cucurbit

กุศล ถมมา[1,2] และ พิศาล ศิริธร[2*]

Kuson Thomma[1,2] and Pisan Sirithorn[2*]

บทคัดย่อ: การศึกษาประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ต่อเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* สาเหตุโรคยางไหล (gummosis) จำนวน 14 ไอโซเลต พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. rhodina* แบ่งได้เป็น 9 ระดับ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ในอาหาร nutrient broth ที่เติมกลูโคส 2% ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์การสร้างเซลล์ทนร้อน (heat tolerant cells) โดยจุ่มเชื้อที่เลี้ยงไว้ลงน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ในวันที่ 5 ถึง 7 มีการสร้างเซลล์ทนร้อนสูงสุด คือ 46 และ 47% ของเซลล์ทั้งหมด เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ที่เลี้ยงในอาหารและอุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 5 วัน มาผสมเป็นสารเคลือบเมล็ด จำนวน 4 สูตร ได้แก่ BS-coat1, BS-coat2, BS-coat3 และ BS-coat4 เมื่อทดสอบการคงความมีชีวิตและประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย B006 และผลกระทบของสารเคลือบชีวภัณฑ์ B006 ต่อคุณภาพของเมล็ดหลังการเคลือบโดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °ซ นาน 4 เดือน พบว่า เมล็ดที่เคลือบด้วยสารเคลือบทั้ง 4 สูตร มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ที่ยังคงมีชีวิตอยู่บนผิวเมล็ดแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีปริมาณแบคทีเรียอยู่ตั้งแต่ 7-10^5 cfu/เมล็ด และแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ที่ได้จากเมล็ดที่เคลือบด้วยสารเคลือบแต่ละสูตร ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. rhodina* ไม่แตกต่างกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ดั้งเดิม พร้อมทั้งไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและไม่พบความผิดปกติของต้นกล้า

คำสำคัญ: แบคทีเรียปฏิปักษ์, แบซิลลัส ซับทิลิส, การเคลือบเมล็ด, แตง, *Botryosphaeria rhodina*

ABSTRACT: The study was conducted to test find out the efficiency of the antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* B006 against to *Botryosphaeria rhodina* cause of gummosis disease of cucurbit. The bacterium was determined its inhibition capability on the growth of *B. rhodina* 14 isolates. The results revealed that the antagonistic capability was significantly different into 9 groups. This bacterium was cultured in nutrient broth (NB) added 2% glucose and

[1] สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Plant Pathology Division, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand and Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University.

* Corresponding author: pissir@kku.ac.th

incubated at 28°C for 3, 5, 7 and 9 days and then, treated at 80°C for 30 min for heat tolerance cells. The maximum heat tolerant cells production (46-47%) was obtained 5-7 days of incubation. Hence the antagonistic bacterium B006 was cultured on such medium and temperature for 5 days and used to incorporate into four seed coating formulations; BS-coat1, BS-coat2, BS-coat3 and BS-coat4. The viability and antagonistic activity of the bacterium B006, and its effect on seed performance after storage at 5°C for 4 months were determined. The result showed the number of viable cells varied statistically were significant difference among the formulations ranging from 7-10^5 cfu/seed. The bacterium B006 obtained from seed wash of each formulation could inhibit growth of *B. rhodina* as same as the original isolate. No adverse effect on seed germination and seedling performance was observed.
Keywords: antagonistic bacterium, *Bacillus subtilis*, seed coating, cucurbit, *Botryosphaeria rhodina*

บทนำ

ปัจจุบัน การผลิตพืชตระกูลแตงในประเทศไทย นอกจากเป็นการผลิตเพื่อบริโภคผลสดแล้ว ยังรวมไปถึงการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก ในระดับแปลงผลิตมักประสบปัญหาการระบาดของโรคพืชหลายชนิด เช่น โรคยางไหล (gummosis) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* เชื้อราดังกล่าว สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลแตงได้ตลอดระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะกล้าจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลผลิต พัชราภรณ์ และพิศาล (2554) พบว่า 67% ของตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการใบไหม้ ลำต้นแตกยางไหล จากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในเขตจังหวัดขอนแก่น เกิดจากเชื้อรา *B. rhodina* และเมื่อทดสอบการต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ benomyl, chlorothalonil, pyraclostrobin และ mancozeb จาก *B. rhodina* 37 ไอโซเลต พบว่า 21 ไอโซเลต ต้านทานต่อสาร benomyl 4 ไอโซเลต ต้านทานต่อสาร chlorothalonil และ 28 ไอโซเลต ต้านทานต่อสาร pyraclostrobin แต่ไม่พบการต้านทานต่อสาร mancozeb ในทุกไอโซเลตที่ทดสอบ (พัชราภรณ์, 2554) การต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อรา *B. rhodina* อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดไม่ได้ผลเท่าที่ควร แปลงผลิตพืชตระกูลแตงจึงมีโอกาสที่โรคต้นแตกยางไหลจะระบาดได้ตลอดฤดูการผลิต การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonists) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดการระบาดและการใช้สารเคมี แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช เพราะสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทนต่อสภาพแวดล้อม ทั้งสารเคมี รังสี และความร้อน ได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (Kloepper et al., 2004) แม้ในที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงประมาณ 55 °ซ *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Botryodiplodia* sp. (โรคผลเน่าของลำใย), *Sphaerotheca fuliginea* (โรคราแป้งของแตงกวา), *Pythium* spp. (โรคโคนเน่า), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (โรคเหี่ยวของพืชตระกูลพริกมะเขือเทศ), *Sclerotium rolfsii* (โรคโคนเน่า), *Colletotrichum gloeosporiodes* (โรคแอนแทรคโนส), *Didymella bryoniae* (โรคต้นแตกยางไหลของพืชตระกูลแตง), *Ralstonia solanacearum* (โรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ) *Macrophomina phaseolina* (โรคเน่าดำของถั่วเหลือง ถั่วเขียวและงา), *F. oxysporum* f. sp. *lentil* (โรคเหี่ยวของถั่วแขก) (El-Hassan and Gowen, 2006), *C. falcatum* และ *F. moniliforme* (โรคเน่าแดงของอ้อย) (ชลิดา และ นัฐพร, 2550) เป็นต้น

การที่ *B. subtilis* เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด จึงเหมาะที่จะพัฒนารูปแบบชีวภัณฑ์ที่หลากหลาย ตามเชื้อโรคเป้าหมายที่แตกต่างกันไป (Schisler et al., 2004) การพัฒนาชีวภัณฑ์ *B. subtilis* เพื่อการคลุกหรือเคลือบเมล็ดก็เป็นอีกรูปแบบหนึ่ง Manjula และ Podile (2005) ใช้เซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* AF1 ผสมกับตัวพา (carrier) ต่างๆ ได้แก่ พีท (peat) พีทผสมไคติน (peat+chitin) พีทผสมเส้นใยของ *Aspergillus niger* (peat+mycelium) ก้อนเชื้อเห็ดเก่า (spent compost) และอัลจิเนต (alginate) ทำให้ชีวภัณฑ์ที่ได้เก็บได้นานกว่า 4 เดือน เมื่อนำมาใช้คลุกเมล็ดถั่วมะแฮะ (pigeon pea) เพื่อทดสอบในสภาพแปลง พบว่า ชีวภัณฑ์ที่ใช้พีทผสมไคติน เป็น

ตัวพา มีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดได้ นอกจากนี้ El-Hassan และ Gowen (2006) ได้นำชีวภัณฑ์ที่ใช้ *B. subtilis* ผสมลงในตัวพาชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ผงแทลคัม และพีทมอส โดยมี carboxy methyl cellulose (CMC) เป็นสารเพิ่มการยึดเกาะ มาใช้เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของถั่วแขก ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentil* พบว่า รูปแบบชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการคลุกเมล็ด คือ รูปแบบสปอร์ในกลูโคส และสปอร์ในผงแทลคัม เนื่องจากสามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรคได้ดีกว่ารูปแบบอื่นๆ

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* B006 ต่อเชื้อรา *P. rhodina* ทั้งก่อนและหลังการเคลือบเมล็ดด้วยสารเคลือบชีวภัณฑ์แบคทีเรีย B006 และศึกษาผลกระทบของสารเคลือบชีวภัณฑ์ต่อการมีชีวิตของแบคทีเรีย B006 และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพันธุ์แตง เพื่อเป็นแนวทางในการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดนี้ มาใช้ประโยชน์ในการป้องกันเชื้อสาเหตุโรคพืชในอนาคตต่อไป

วิธีการศึกษา

ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการกลางศูนย์ความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยร่วมมหาวิทยาลัยขอนแก่น ห้องปฏิบัติการ โรงงานปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ หมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2552 ถึงเดือน มีนาคม 2554

การศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ต่อเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina*

เลี้ยงเชื้อรา *B. rhodina* จำนวน 14 ไอโซเลต ได้แก่ Ph-1, CUS-B-9, MS-DB028, MS-A-6, CUS-DB037, CUS-DB038, SQL-B-1, MS-DB030, SQL-B-6, MS-A-7, MS-DB043, WL-DB033, MS-DB052 และ CUS-DB044 บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3 วัน ตัดส่วนปลายของเส้นใย นำไปวางตรงจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหาร PDA แล้ววางกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม. โดยห่างจากจุดศูนย์กลาง 2 ซม. จำนวน 4 จุด แล้วหยดสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ มล. ลงบนกระดาษกรอง 3 จุดๆ ละ 5 ไมโครลิตร อีก 1 จุด หยด NB เพื่อเป็นกรรมวิธีควบคุม โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ซึ่งมี *B. rhodina* แต่ละไอโซเลตเป็นกรรมวิธี (treatment) แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3 วัน บันทึกการเจริญของเส้นใยเชื้อรา แล้วแปลค่าผลการบันทึกเป็นพื้นที่ยับยั้ง (inhibition zone) และนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การผลิตมวลชีวภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ในอาหาร NB ที่เติมกลูโคส 2% วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน ตรวจนับเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธี serial dilution plating technique โดยเปรียบเทียบระหว่างการนำสารแขวนลอยแบคทีเรียแต่ละระยะเวลาการบ่ม ให้ความร้อนที่ 80 °ซ เป็นเวลา 1 ชม. ใน hot water bath กับเซลล์แขวนลอยที่ไม่ได้รับความร้อน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเลือกเวลาเลี้ยงแบคทีเรีย ที่มีสัดส่วนการสร้างเซลล์ทนร้อน (heat tolerant cells) สูงสุด เพื่อการผลิตมวลชีวภาพ จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ที่เลี้ยงในอาหารดังกล่าวมาตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง Avanti® J-25 I ที่ความเร็ว 10,000 rpm (15344xG) เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 8 °ซ แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 รอบ ตกตะกอนอีกครั้ง แล้วนำตะกอนไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นละลายตะกอนใน skim milk 10% อัตราส่วนตะกอน B006 1 กรัม ต่อ skim milk 5 มล.(w/v) แบ่งใส่ภาชนะเพื่อเข้าสู่กระบวนการระเหิดแห้ง ด้วยเครื่อง Lyophilizer เพื่อให้ได้ผงแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 นำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง ด้วยวิธี serial dilution

plating technique แล้วเก็บรักษาไว้เพื่อใช้เป็นมวลชีวภาพผสมกับสารเคลือบต่อไป

การศึกษาความเหมาะสมของสารเคลือบเมล็ดแตงกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006

3.1 การเตรียมสารเคลือบเมล็ด

ใช้สารเคลือบเมล็ด 4 สูตร ผสมกับผงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ที่ได้จากการทดลองที่ 2 เป็นสารเคลือบชีวภัณฑ์ 4 สูตร ได้แก่ BS-coat1, BS-coat2, BS-coat3 และ BS-coat4 แล้วนำไปเคลือบเมล็ดแตงเทศ(melon) โดยแช่เมล็ดแตงเทศใน sodium hypochlorite 0.6 % เป็นเวลา 5 นาที ล้างตามด้วยน้ำกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 รอบ ผึ่งให้แห้ง แล้วเคลือบด้วยสารเคลือบแต่ละสูตร และผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 ชม. เก็บรักษาเมล็ดที่เคลือบแล้วที่อุณหภูมิ 5 °ซ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 การประเมินความมีชีวิตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 หลังการเคลือบเมล็ดแตง

การประเมินนี้วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ โดยสุ่มเมล็ดแตงที่เคลือบด้วยสารเคลือบชีวภัณฑ์แต่ละสูตรในแต่ละช่วงเวลาของการเก็บรักษาหลังการเคลือบ 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยสุ่มจำนวน 10 เมล็ด แต่ละเมล็ดใส่ลงใน micro centrifuge tube ที่เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 มล. เขย่าให้เมล็ดเปียกน้ำ ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเขย่าต่อเนื่อง 1 นาที แล้วนำสารละลายไปทำ serial dilution plating technique บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 48 ชม. แล้วนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ที่ติดอยู่กับเมล็ดแต่ละเมล็ด พร้อมทั้งสุ่มเก็บโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 แต่ละสูตรสารเคลือบที่เก็บไว้ 4 เดือน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์หลังการเคลือบเมล็ด

3.3 การประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ต่อเชื้อรา *B. rhodina* หลังการเคลือบเมล็ดแตง

นำโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ที่ได้จากเมล็ดแตงที่เคลือบและเก็บรักษาไว้นาน 4 เดือน มาเลี้ยงในอาหาร NB วางบนเครื่องเขย่า 120 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^6 cfu/ml จากนั้นนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *B. rhodina* 6 ไอโซเลต โดยเลือกจาก 5 ไอโซเลตที่ถูกยับยั้งการเจริญได้ดี (จากผลการทดลองที่ 1) ได้แก่ CUS-B-9, MS-DB028, CUS-DB037, CUS-DB038, SQL-B-1 และ อีก 1 ไอโซเลต คือ CUS-DB044 ที่ถูกยับยั้งได้ไม่ดี โดยทดสอบด้วยวิธีเดียวกับการทดลองที่ 1

3.4 การประเมินผลกระทบของสารเคลือบชีวภัณฑ์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและคุณลักษณะของต้นกล้า

ทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดแตงที่เคลือบด้วยชีวภัณฑ์ทั้ง 4 สูตร กับเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบ (control) ด้วยวิธี rolled paper โดยเพาะเมล็ดแตงบนกระดาษเพาะที่ชุ่มน้ำ ปิดทับด้วยกระดาษเพาะอีกชั้นแล้วม้วนกระดาษ นำไปวางในกล่องพลาสติกปิดฝา แล้วบ่มในตู้เพาะความงอกที่มีอุณหภูมิสลับที่ 20 °ซ เป็นเวลา 16 ชม. และ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชม. ทำการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ตรวจนับความงอกหลังเพาะ 8 วัน โดยทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกหลังเคลือบ 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยในเดือนที่ 4 จะนำต้นกล้ามาวัดการเจริญ โดยวัดความยาวราก ความยาวต้น น้ำหนักรากและน้ำหนักต้นกล้า จำนวน 20 ซ้ำต่อกรรมวิธี

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ต่อเชื้อรา *Physalospora rhodina*

จากการศึกษา พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. rhodina* ได้ทั้ง 14 ไอโซเลต โดยสามารถยับยั้งได้แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม ตั้งแต่ 9.6 -24.6 มม. มีระดับการยับยั้งต่างกัน 9 ระดับ โดยสามารถยับยั้งได้ดี ในไอโซเลต Ph-1, CUS-B-9, MS-DB028, MS-A-6, CUS-DB037, CUS-DB038, SQL-B-1, MS-DB030, SQL-B-6, MS-A-7, MS-DB043, WL-DB033, MS-DB052 และ CUS-DB044 ตามลำดับ (Figure 1) (Table 1)

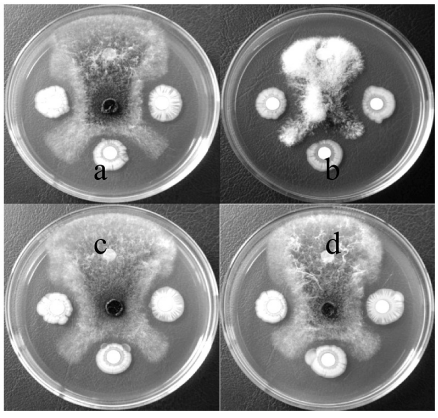

Figure 1 Suppression of mycelium growth of *B. rhodina* by antagonistic bacteria B006
a. *B. rhodina* (MS-DB028) b. *B. rhodina* (CUS-B-9)
c. *B. rhodina* (CUS-DB037) d. *B. rhodina* (SQL-B-1)

Table 1 Antagonist capability of B006 on radial growth of *B. rhodina* on potato dextrose agar plates

Isolate of *B. rhodina*	Mycelium inhibition (mm)[1/]	Isolate of *B. rhodina*	Mycelium inhibition (mm)[1]
Ph-1	24.75 a	MS- DB030	20.58 ef
CUS-B-9	24.75 a	SQL-B-6	20.08 f
MS- DB028	24.00 b	MS-A-7	19.41 g
MS-A-6	23.00 c	MS-DB043	19.00 g
CUS-DB037	22.66 cd	WL-DB033	15.66 h
CUS- DB038	22.33 d	MS-DB052	15.33 h
SQL-B-1	21.00 e	CUS-DB044	9.66 i
C.V. (%) 3.71			

[1/] Mean of 12 replications. Mean in a column followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$) by LSD

การผลิตมวลชีวภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006

การเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ในอาหาร NB ที่เติมกลูโคส 2% ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 5 และ 7 วัน มีสัดส่วนการสร้างเซลล์ทนร้อน สูงที่สุด คือ 46 และ 47 % ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน แม้จะได้ปริมาณเซลล์มีชีวิตรวมและเซลล์ทนร้อนสูงสุด แต่ให้สัดส่วนเพียง 28 % (Table 2) และมีเมือกมาก ซึ่งเป็นปัญหาในกระบวนการล้างและตกตะกอนเซลล์ ดังนั้น การผลิตมวลชีวภาพจึงเลือกระยะเวลาที่เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 °ซ แล้วตกตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนด้วย skim milk 10% ในอัตราส่วนตะกอน B006 1 กรัม ต่อ skim milk 5 มล.(w/v) แล้วผ่านกระบวนการระเหิดแห้ง จนได้ผงแห้งของ B006 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ $2.8x10^{10}$ cfu/กรัม แล้วใช้เป็นมวลชีวภาพในการศึกษาต่อไป

การศึกษาความเหมาะสมของสารเคลือบเมล็ดกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006

จากการเคลือบเมล็ดแตงด้วยสารเคลือบเมล็ดที่ผสมผงแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 4 สูตร พบว่า สารเคลือบชีวภัณฑ์ทุกสูตรให้ผลการเคลือบเมล็ดที่ดี หลังจากทำให้แห้งแล้ว ได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นเวลา 4 เดือน พร้อมทั้งทำการสุ่มตัวอย่าง เพื่อทำการศึกษาทุกเดือน ดังนี้

3.1 การประเมินความมีชีวิตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 หลังเคลือบบนผิวเมล็ดแตง

หลังการเก็บรักษาเมล็ดแตงที่เคลือบด้วยสารเคลือบแต่ละสูตรไว้นาน 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน พบว่า เมล็ดที่เคลือบด้วยสารเคลือบ BS-coat3 มีปริมาณ *B. subtilis* B006 ติดอยู่ที่ผิวเมล็ดเฉลี่ยสูงสุดในทุกๆ เดือน ตั้งแต่ 10.08-12.49x10^5 cfu/ เมล็ด รองลงมาคือ BS-coat4, BS-coat1 และ BS-coat2 ซึ่งมีปริมาณ B006 เฉลี่ย 8.86-9.75 x10^5, 7.06-8.31 x10^5 และ 5.21-7.43 x10^5 cfu/ เมล็ด ตามลำดับ **(Table 3)**

3.2 การประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ต่อเชื้อรา *B. rhodina* หลังการเคลือบเมล็ด

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. rhodina* ทั้ง 6 ไอโซเลต พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ที่ได้จากน้ำล้างเมล็ดแตงที่เคลือบด้วยสารเคลือบชีวภัณฑ์ทั้ง 4 สูตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. rhodina* ไอโซเลต CUS-DB037 และ CUS-DB044 ได้โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากประสิทธิภาพของ B006 ดั้งเดิม อีก 4 ไอโซเลต มีความแตกต่างทางสถิติบ้างเล็กน้อย **(Table 4)**

3.3 การประเมินผลกระทบของสารเคลือบชีวภัณฑ์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกและคุณลักษณะของต้นกล้า

หลังการเคลือบเมล็ดด้วยสารเคลือบทั้ง 4 สูตร ได้แก่ BS-coat1, BS-coat2, BS-coat3 และ BS-coat4 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน พบว่า เมล็ดที่เคลือบด้วยสารเคลือบทุกสูตรมีอัตราการงอกของเมล็ดไม่แตกต่างทางสถิติจากเมล็ดที่ไม่เคลือบในชุดควบคุม โดยมีการงอกเฉลี่ย 95-100 % **(Table 5)** นอกจากนั้นยังพบว่า ต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่เคลือบด้วยสารเคลือบ BS-coat1 มีความยาวต้นกล้าและความยาวรากเฉลี่ย 6.5 และ 12.4 ซม. มากกว่าต้นกล้าจากสูตรอื่น โดยมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบสาร แต่มีน้ำหนักรากและน้ำหนักต้นต่ำกว่าต้นกล้าที่ได้จากสูตร BS-coat2, BS-coat3, BS-coat4 และชุดควบคุม สูตร BS-coat2 ให้น้ำหนักต้นกล้าและน้ำหนักรากสูงกว่าต้นกล้าจากสารเคลือบสูตรอื่นๆ คือ 170 และ 52 มก. ตามลำดับ และให้ค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับเมล็ดชุดควบคุม **(Table 6)** สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pengnoo และคณะ (2006) ที่เคลือบเมล็ดถั่วลิสงด้วย *B. firmus* เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ (*Rhizoctonia solani*) พบว่า การเคลือบเมล็ดไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่เคลือบด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีความผิดปกติของต้นกล้าน้อยกว่าเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบ

Table 2 Number of viable cell of B006 at 3, 5, 7 and 9 days in NB (2% glucose) and treated at 80°C 1 hour

	Number of viable cell (cfu/ml x10^5)			
	3 days	5 days	7 days	9 days
Non-treat	6.60	0.50	3.40	91.00
Treat 80 °C	0.18	0.23	1.60	26.00
Heat tolerant cells (%)	2.7	46	47	28

Table 3 Number of viable bacteria B006 assessed after seed-coating and storage at 5 °C for 4 months

	Number of viable bacteria (x10^5 cfu/seed)[1/]				
Formulation	0 Month	1 Month	2 Month	3 Month	4 Month
BS-coat1	8.31 ±1.17 bc	8.24 ±0.79 c	7.73 ±1.48 b	7.60 ±1.72 b	7.14 ±1.17 b
BS-coat2	7.11 ±1.31 c	7.43 ±1.02 c	5.99 ±0.90 c	5.21 ±0.77 c	5.34 ±0.87 c
BS-coat3	10.11 ±1.70 a	12.20 ±1.03 a	12.49 ±0.93 a	12.37 ±1.59 a	10.78 ±1.69 a
BS-coat4	9.55 ±1.61 ab	9.75 ±1.38 b	8.86 ±1.61 b	9.05 ±1.59 b	9.50 ±1.86 a
C.V. (%)	16.70	11.45	14.50	17.15	17.78

[1/] Mean of 8 replications. Mean in a column followed by the same letter are not significantly different (P<0.01) by LSD

Table 4 Antagonistic activity of B006 from seed- wash on growth of *B. rhodina* on potato dextrose agar plates

B006 formulation	Mycelium Inhibition (mm)[1/] Isolate of *B. rhodina*					
	CUS-B-9	MS-DB028	CUS-DB037	CUS-DB038	SQL-B-1	CUS-DB044
BS-coat 1	25.0 bc	24.0 a	23.0 a	22.8 b	25.3 a	9.7 a
BS-coat 2	24.7 c	23.7 ab	23.0 a	23.7 a	24.5 b	9.5 a
BS-coat3	26.7 a	23.0 c	22.8 a	23.2 ab	24.5 b	10.0 a
BS-coat 4	27.0 a	23.3 bc	22.8 a	22.5 b	24.7 ab	9.5 a
B006 (Stock)	25.7 b	23.7 ab	23.0 a	22.6 b	24.5 b	9.7 a
C.V. (%)	1.7	1.5	0.9	1.7	1.7	4.4

[1/] Mean of 3 replications. Mean in a row followed by the same letter are not significantly different by LSD

Table 5 Seed germination(%) after coated with B006 formulations and kept at 5°C for 4 months

Formulation	Seed germination (%)[1/] Month				
	0	1	2	3	4
BS-coat 1	98	99	100	100	98
BS-coat 2	97	98	100	97	97
BS-coat 3	95	97	98	98	95
BS-coat 4	96	97	97	97	96
Control	98	100	98	98	98
	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	4.71	3.54	3.67	2.28	2.52

[1/] Mean of 4 replications. ns= not significant

Table 6 Seedling performance after coated with B006 formulations for 4 months

Formulation	Growth parameter			
	Shoot length (cm) [1/]	Root length (cm) [1/]	Shoot fresh weigh (mg) [2/]	Root fresh weigh (mg) [2/]
BS-coat 1	6.5 a	12.4 a	153.0 b	40.8 b
BS-coat2	5.8 b	11.8 ab	170.4 ab	52.0 a
BS-coat3	5.8 b	11.1 ab	160.2 b	45.3 ab
BS-coat4	5.6 b	8.9 c	151.7 b	48.7 ab
Non-coated	6.9 a	10.9 b	185.0 a	44.3 ab
C.V. (%)	15.02	20.15	14.19	19.44

[1/] Mean of 20 replications. Mean in a row followed by the same letter are not significantly different by LSD

[2/] Mean of 10 replications. Mean in a row followed by the same letter are not significantly different by LSD

สรุป

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* ทั้งหมด 14 ไอโซเลต โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ตั้งแต่ 9.6 -24.6 มม. ซึ่งมีระดับการยับยั้งแตกต่างกันทางสถิติ 9 ระดับ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ในอาหาร NB ที่เติมกลูโคส 2% เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 5 และ 7 วัน มีสัดส่วนการสร้างเซลล์ทนร้อน

สูงสุด คือ 46 และ 47 % ตามลำดับ เมื่อผ่านความร้อนที่ 80 °ซ เป็นระยะเวลา 1 ชม. ดังนั้นการผลิตมวลชีวภาพ จึงเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 เป็นเวลา 5 วัน และใช้ผสมกับสารเคลือบเพื่อเคลือบเพื่อเคลือบเมล็ดแตง 4 สูตร เก็บรักษาเมล็ดไว้ที่อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน พบว่า สูตร BS-coat3 มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 เคลือบอยู่ที่ผิวเมล็ด เฉลี่ยสูงสุด คือ 10.08-12.49x10^5 cfu/เมล็ด รองลงมาคือสูตร BS-coat4, BS-coat1 และ BS-coat2 ตามลำดับ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ที่แยกได้จากน้ำล้างเมล็ดที่เคลือบด้วยสารเคลือบชีวภัณฑ์ทุกสูตร สามารถยับยั้งการเจริญของชื้อรา *B. rhodina* ได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับ B006 ดั้งเดิม ใน ไอโซเลต CUS-DB037 และ CUS-DB044 ส่วนอีก 4 ไอโซเลต ได้แก่ CUS-B-9, MS-DB028, CUS-DB038 และ SQL-B-1 มีความแตกต่างทางสถิติเล็กน้อย สารเคลือบเมล็ดที่ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ B006 ทุกสูตร ไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดแตง เมื่อเก็บรักษานาน 4 เดือน โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกตั้งแต่ 95-100 % ไม่แตกต่างทางสถิติกับเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบ นอกจากนี้ต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่เคลือบด้วยสารเคลือบทั้ง 4 สูตร เป็นต้นกล้าที่มีความสมบูรณ์และไม่พบการเจริญที่ผิดปกติของต้นกล้า โดยพบว่า สูตร BS-coat2 ให้น้ำหนักต้นกล้าและน้ำหนักรากสูงกว่าต้นกล้าที่ได้จากสารเคลือบสูตรอื่นๆ โดยค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบสาร

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.บุญมี ศิริ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการโรงงานปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ หมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ นัฐพร จำปี. 2550. ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ต่อการเจริญเติบโตของอ้อย. หน้า 296-302 ใน: เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 20-22 พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน พิษณุโลก.

พัชราภรณ์ บุโฮม. 2554. ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราที่สร้างพิคนิเดียมสาเหตุโรคแตงและไพรเมอร์จำเพาะในการตรวจสอบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

พัชราภรณ์ บุโฮม และพิศาล ศิริธร. 2554. การศึกษาความรุนแรงระดับแปลงปลูกและทดสอบปฏิกิริยาต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราของเชื้อรา *Didymella bryonae* สาเหตุโรคต้นแตกยางไหลของพืชตระกูลแตง. แก่นเกษตร 39 (ฉบับพิเศษ): 190-195.

Bahar, O., G. Kritzman, and S. Burdman. 2009. Bacterial fruit blotch of melon: screen for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. European Journal of Plant Pathology 123:71-83.

El-Hassan, S. A., and S. R. Gowen. 2006. Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. Journal of Phytopathology 154:148-155.

Kloepper, J.W., C.M. Ryu, and S. Zhang, 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. The American Phytopathological Society 94: 1259-1266.

Manjula, K. and A. R. Podile. 2005. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF1. World Journal of microbiology & Biotechnology 21:1057-1062.

Pengnoo, A., R. wiwattanapattapee, A. Chumthong, and M. Kanjanamaneesathian. 2006. Bacterial antagonist as seed treatment to control leaf blight disease of bambara groundnut (Vigna subterranea). World Journal of microbiology & Biotechnology 22: 9-14.

Schisler, D. A., P.J. Slininger, R. W. Behlc, and M. A. Jackson. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant disease. Phytopathology 94:1272-1275.