ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B076 เพื่อการเคลือบเมล็ดและพ่นทางใบ เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

Formulation of bacterial antagonist *Bacillus subtilis* B076 for seed coating and spraying to control *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*

กุศล ถมมา[1,2*] และ พิศาล ศิริธร[2]

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

บทคัดย่อ : การศึกษาประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B076 ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ไอโซเลต KK9 สาเหตุโรคผลเน่าจากแบคทีเรีย (bacterial fruit blotch) บนอาหาร nutrient agar (NA) ณ ห้องปฏิบัติการกลางศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้ดี โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง 1.94 ซม. เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ในอาหาร nutrient broth (NB) ที่เติมกลูโคส (glucose) 2% พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเซลล์ทนร้อนได้ในสัดส่วนมากที่สุด (61%) ในวันที่ 5 ของการเลี้ยง เมื่อนำตะกอนเซลล์ไปผ่านกระบวนการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer ทำให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลง 42.7% โดยผงแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้สามารถผสมกับสารเคลือบ BS-coat2 ได้ดี โดยมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ติดอยู่ที่ผิวเมล็ดหลังเคลือบเฉลี่ย $7x10^5$ cfu/เมล็ด และเริ่มลดลงตั้งแต่ปลายเดือนที่ 3 - 5 ของการเก็บรักษา ซึ่งในเดือนที่ 5 มีแบคทีเรียคงเหลือ $1.2x10^5$ cfu/เมล็ด เมื่อนำผงแห้งของแบคทีเรีย *B. subtilis* B076 มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรน้ำจำนวน 3 สูตร คือสูตรผสมน้ำ สูตรผสม NB และสูตรผสมสารจับใบ (polyoxyethylene alkyl aryl ether + organic sulfonate sodium salt 62%) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 บนใบแตงแคนตาลูป พบว่ากรรมวิธีที่พ่นชีวภัณฑ์ก่อนพ่นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถลดการเกิดโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีที่พ่นเชื้อสาเหตุโรคก่อน โดยชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร สามารถลดการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Aac-KK9 ได้ดีใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ: แบซิลลัส การเคลือบเมล็ด โรคผลเน่าจากแบคทีเรีย แคนตาลูป

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

[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, Thailand

* Corresponding author: kuson_th@hotmail.com

ABSTRACT: Antagonistic activity of bacterium *B. subtilis* B076 on nutrient agar medium (NA) to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) isolate KK9 causal agent of bacterial fruit blotch, in the laboratory of Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy Khon Kaen University. The results revealed that the *B. subtilis* B076 could exhibit the inhibition zone of diameter 1.94 cm. When cultured the bacterium antagonist in nutrient broth (NB) added with 2% glucose, the maximum ratio of heat tolerant cells production (61%) was obtained five days of incubation. The pellets of antagonistic bacteria were freeze dried by lyophilizer, the number of bacterial cell declined by 42.7%. The dust of bacterium after homogenizing with seed coating formulation BS-coat2, contain number of viable cells $7x10^5$ cfu/seed and started reducing after the late of three month, in the late of five month had $1.2x10^5$ cfu/seed. Three aqueous formulations of *B. subtilis* B076 biomass that mixed with water, NB and sticking agent (polyoxyethylene alkyl aryl ether + organic sulfonate sodium salt 62%) were conducted to test for efficacy to control Aac KK9 in cantaloupe leaf. The results showed that, in all treatments, spraying antagonistic bacterium formulation before pathogenic bacterium were more effective to reduce disease incidence than application of pathogenic bacterium prior, while all formulations of antagonistic bacteria were similar efficiency to control Aac-KK9.
Keywords: Bacillus, seed treatment, seed coating, bacterial fruit blotch, cantaloupe

บทนำ

พืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) มีจำนวนกว่า 850 ชนิด (spicies) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมปลูกทั่วโลก โดยมีความสำคัญทั้งด้านอาหาร ยารักษาโรค เวชสำอางและเป็นเครื่องใช้ในครัวเรือน (Ali and Pandey, 2006) การผลิตพืชตระกูลแตงในประเทศไทย นอกจากเป็นการผลิตเพื่อการบริโภคแล้ว ยังมีการผลิตเพื่อเป็นเมล็ดพันธุ์ ซึ่งมีมูลค่ารวมหลายร้อยล้านบาทต่อปี กรมวิชาการเกษตร (2553) รายงานว่า ในปี พ.ศ. 2550-2552 มีปริมาณการส่งออกเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงจำนวน 226.86, 288.68 และ 340.74 ตัน คิดเป็นมูลค่า 529, 587 และ 805 ล้านบาท ตามลำดับ ทั้งยังมีแนวโน้มการผลิตเพิ่มขึ้นทุกปี ดังนั้น พืชตระกูลแตงจึงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย แต่ในระดับแปลงผลิตมักประสบปัญหาการระบาดของโรคพืชหลายชนิด ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตระกูลแตงที่สำคัญได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) สาเหตุโรคผลเน่าจากแบคทีเรีย (bacterial fruit blotch) โดยแบคทีเรีย Aac สามารถทำลายพืชได้ตลอดระยะการเจริญเติบโตจนถึงระยะเก็บเกี่ยว นอกจากนั้นยังมีรายงานการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ ซึ่งนับว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ทำความเสียหายอย่างมากต่อการผลิตพืชตระกูลแตง (Bahar et al., 2009) ปัจจุบัน การใช้เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยม โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มที่ได้รับความนิยมในอันดับต้นๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ที่ทนทานต่อ สารเคมี รังสี และความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (Kloepper et al., 2004) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีความทนต่ออุณหภูมิช่วงกว้างตั้งแต่ -5 ถึง 75 °ซ สามารถเจริญได้ใน pH 2-8 ทนความเค็มของเกลือ NaCl ได้ถึง 25% และสามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิสูงถึง 55 °ซ (El-Hassan and Gowen, 2006) นอกจากนี้ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ยังมีกลไกการเป็นปฏิปักษ์ที่สำคัญหลายรูปแบบ เช่น สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ได้ (Shoda, 2000) โดยสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ นอกจากนั้นยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ glucanase ที่สามารถย่อยสลาย glucans และ chitinase ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้ (กฤติกา, 2549; นิตยา, 2549) แบคทีเรียสกุล *Bacillus* บางชนิด เมื่ออยู่ในสภาพที่ขาดธาตุเหล็ก จะสามารถสร้างสาร siderophore ได้ ซึ่งสารดังกล่าวจะไปจับกับ ferric iron แล้วเคลื่อนย้ายเข้าสู่ตัวรับ (receptor) ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ (Hu and Boyer, 1996) ซึ่งจะรบกวนกระบวนการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อยู่บริเวณเดียวกัน ทำให้การเกิดโรคของพืชลดลง (Shoda, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรีย

Bacillus หลายชนิด เป็น Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ข้าวฟ่าง พริก และมะเขือเทศ เป็นต้น (Raj et al., 2003; Domenech et al., 2006) นอกจากนี้แล้ว แบคทีเรียสกุล *Bacillus* หลายชนิดสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (Induce Systemic Resistant: ISR) ต่อเชื้อสาเหตุโรคที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Kloepper et al., 2004)

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ต่อเชื้อแบคทีเรีย Aac ในระดับห้องปฏิบัติการ การทำผงแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อการผลิตชีวภัณฑ์เคลือบเมล็ด ความมีชีวิตของแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผิวเมล็ดหลังการเคลือบและเก็บรักษา ตลอดไปถึงประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียชนิดน้ำ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Aac บนใบแตงแคนตาลูปในระดับเรือนทดลอง

วิธีการศึกษา

ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการกลางศูนย์ความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2553 – มีนาคม 2555 โดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ที่แยกได้จากรากถั่วเขียว (นาตยา, 2545) ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีรายงานการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด (นาตยา, 2545; นิตยา, 2549) นำมาทดสอบกับแบคทีเรีย Aac ไอโซเลต KK9 ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าจากแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง โดยใช้แตงแคนตาลูป พันธุ์ซันเลดี้ 227 เป็นพืชทดสอบ

ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis B076* ต่อเชื้อแบคทีเรีย Aac

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ในอาหาร nutrient broth (NB) ที่เติมกลูโคส 2% บ่มในเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยมาปรับความเข้มข้นให้มีเซลล์แขวนลอย 10^6 cfu/มล. จากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 บนอาหาร nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมเป็นเซลล์แขวนลอย ให้มีความเข้มข้น 10^8 cfu/มล. แล้วนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ โดยใช้ cotton bud ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย Aac KK9 แล้วป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร NA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. จำนวน 6 จุด แล้วหยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *B. subtilis* B076 ลงบนกระดาษกรองแต่ละจุดปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางแนวยับยั้ง (inhibition diameter)

ศึกษาอัตราการสร้างเซลล์ทนร้อนของแบคทีเรียปฏิปักษ์

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ในอาหาร NB ที่เติมกลูโคส 2% วางในเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียมาปรับให้มีปริมาณเชื้อ 10^6 cfu/มล. แล้วดูดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 1 มล. ลงในอาหาร NB ที่ผสมกลูโคส 2% ปริมาตร 150 มล. วางในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน แล้วแบ่งเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่บ่มไว้แต่ละระยะเวลา ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธี serial dilution plating technique ในแต่ละอายุเชื้อ จะเตรียมเซลล์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น 4 ระดับๆ ละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่เป็นเซลล์แขวนลอยที่ไม่ได้รับความร้อน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสร้างเซลล์ทนร้อนจากสูตร

$$\textbf{เซลล์ทนร้อน(\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในชุดที่ได้รับความร้อน} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในชุดที่ไม่ได้รับความร้อน}}$$

การผลิตผงแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ในอาหาร NB ที่เติม 2% glucose วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/ นาที ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 5 วัน แล้วตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง Avanti® J-25 I ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/ นาที ที่อุณหภูมิ 8°ซ เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 รอบ ตกตะกอนอีกครั้ง ก่อนนำตะกอนไปชั่งน้ำหนัก แล้วละลายตะกอนในน้ำนมพร่องไขมัน (skim milk) 10% อัตราส่วนตะกอนแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 กรัม ต่อน้ำนม 5 มล. (w/v) แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำเข้าสู่กระบวนการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer เพื่อให้ได้ผงแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากนั้นสุ่มนับจำนวนเซลล์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งด้วยวิธี serial dilution plating technique แล้วเก็บรักษาไว้เพื่อใช้เป็นมวลชีวภาพตั้งต้น

การเคลือบเมล็ดด้วยชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์

ผสมผงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 เข้ากับสารเคลือบเมล็ด BS-coat2 (กุศล และพิศาล, 2555) แล้วนำไปเคลือบเมล็ดแตง ให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียอยู่ระหว่าง 10^4-10^5 cfu/เมล็ด ผึ่งเมล็ดให้แห้งใน Laminar flow เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วดูดความชื้นด้วยเม็ด silica gel อีกครั้ง ก่อนเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 5 °ซ จากนั้นศึกษาผลกระทบของสารเคลือบเมล็ดต่อความมีชีวิต (viability) ของแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผิวเมล็ดแตง ด้วยการสุ่มตรวจตามระยะเวลาการเก็บรักษา ที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน โดยนำเมล็ดแตงที่เคลือบด้วยสารเคลือบลงแช่ในน้ำกลั่น ใน micro centrifuge tube เขย่าให้สารเคลือบเมล็ดละลาย ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (vortex) นาน 1 นาที แล้วนำน้ำล้างเมล็ดที่ได้มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี serial dilution plating technique บนอาหาร NA วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 8 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Least Significant Different (LSD) โดยใช้โปรแกรม SAS

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรน้ำ ต่อการควบคุมแบคทีเรีย Aac บนใบแตง

เตรียมพืชทดสอบ: เพาะเมล็ดแตงแคนตาลูปในกระถางพลาสติกที่ใช้พีทมอส (peat moss) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุปลูก โดยรดน้ำและให้ปุ๋ยจนต้นกล้ามีใบจริง 4-5 ใบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช: ใช้เชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 เป็นเชื้อทดสอบ โดยนำไปเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย Aac จำนวน 10^8 cfu/มล.

เตรียมชีวภัณฑ์ *B. subtilis* B076: เตรียมชีวภัณฑ์สูตรน้ำ 3 สูตร โดยเติมผงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ลงในน้ำ อาหาร NB และสารจับใบ (poly oxyethylene alkyl aryl ether + organic sulfonate sodium salt 62%) ให้ทุกสูตรมีปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่ประมาณ 10^6 cfu/มล.

ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์สูตรน้ำต่อการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9: เลือกใบแตงใบที่ 3-4 เป็นใบทดสอบ โดยทำแผลด้วยปลายเข็มแทงทะลุใบ จำนวน 2 จุด/ใบ จุดละ 10 แผล ให้อยู่คนละซีกของใบ การทดลองประกอบด้วย 11 กรรมวิธีๆ ละ 16 ซ้ำ โดยทำการพ่นครั้งที่ 1 ด้วยเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 หรือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ อย่างใดอย่างหนึ่ง พักไว้ 1 วัน แล้วทำการพ่นครั้งที่ 2 ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ หรือ แบคทีเรีย Aac KK9 สลับกับครั้งที่ 1 วางต้นแตงในกรงเพาะที่บุด้วยพลาสติกใส รองพื้นด้วยผ้าชุ่มน้ำ พ่นหมอกวันละ 1 ครั้ง ตรวจการเกิดโรคทุกวัน ให้คะแนนการเกิดโรคบนใบแตงในวันที่ 5 โดยแบ่งเป็น 4 ระดับ คือ ใบแตงที่ไม่แสดงอาการเหลือง (no symptom) ใบแตงที่มีอาการวงเหลืองรอบแผลเล็กน้อย (symptomless) ใบแตงที่มีอาการวงเหลืองรอบแผลกว้างไม่เกิน 3 มม. (moderate) และใบแตงที่มีอาการวงเหลืองรอบแผลกว้างกว่า 3 มม. (severe)

ผลการศึกษา

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *B. subtilis B076* ต่อเชื้อแบคทีเรีย Aac

ผลการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ต่อเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 บนอาหารNA พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Aac ได้ดี โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งเฉลี่ย 1.94 ซม.

อัตราการสร้างเซลล์ทนร้อนของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการทดลอง พบว่า ในแต่ละช่วงเวลาของการเลี้ยง แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 มีสัดส่วนการสร้างเซลล์ทนร้อนสูงสุดในวันที่ 5 คือ 61% เทียบกับเมื่ออายุ 3 และ 7 วัน ที่สร้างได้เพียง 1.4 และ 1.2% ตามลำดับ (Table 1)

การผลิตผงแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ในอาหาร NB ที่เติมกลูโคส 2% ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 5วัน เมื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วละลายตะกอนในน้ำนมพร่องไขมัน 10% จะได้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียสีขาวขุ่น ซึ่งเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มล. มีน้ำหนัก 400 มก. มีปริมาณแบคทีเรีย $1.5x10^8$ cfu/มล. เมื่อผ่านกระบวนการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer แล้วจะได้ผงแห้งแบคทีเรีย 100 มก. โดยมีปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* B076 คงเหลือ $8.6x10^7$ cfu/มล. ลดลงจากปริมาณเริ่มต้น 42.7%

การเคลือบเมล็ดด้วยชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์

สารเคลือบเมล็ดที่ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 เข้ากับ BS-coat2 ให้ผลการเคลือบที่ดี ผิวเรียบสม่ำเสมอ เมล็ดแตงที่เคลือบแล้วมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ติดอยู่ที่ผิวเมล็ดเฉลี่ย $7x10^5$ cfu/เมล็ด โดยเริ่มลดลงในปลายเดือนที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และลดลงเรื่อยๆ กระทั่งในเดือนที่ 5 ของการเก็บรักษา ซึ่งเหลือแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คงมีชีวิตอยู่บนผิวเมล็ดเฉลี่ย $1.2x10^5$ cfu/เมล็ด (Table 2)

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรน้ำ ต่อการควบคุมแบคทีเรีย Aac บนใบแตง

ชีวภัณฑ์สูตรน้ำของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ทั้ง 3 สูตรที่ผสมน้ำ ผสม NB และผสมสารจับใบ มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Aac ทั้งก่อนและหลังการปลูกเชื้อ Aac โดยพบว่าในวันที่ 5 ใบแตงบริเวณที่ทำแผลและปลูกเชื้อ เริ่มมีอาการของโรคตั้งแต่อาการวงเหลืองรอบแผล จนถึงอาการแผลไหม้ โดยพบว่าในกรรมวิธีที่พ่นชีวภัณฑ์ก่อนพ่นเชื้อสาเหตุโรค มีความรุนแรงในการเกิดโรคน้อยกว่ากรรมวิธีที่พ่นเชื้อสาเหตุโรคก่อนพ่นชีวภัณฑ์ โดยชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตรสามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 ได้ดี ใกล้เคียงกัน (Table 3)

Table 1 Percent of heat tolerance cell of *Bacillus* spp. that cultured in nutrient broth with 2% glucose for 7 days and treated with 80°C for 1 hour compared with non-treat culture.

	Treatment	Number of Bacillus cell		
		3 days	5 days	7 days
B. subtilis B076	Non-treat	$29x10^5$	$256x10^5$	$212x10^5$
	Treat (80 °C)	$0.4x10^5$	$157x10^5$	$0.3x10^5$
	Heat tolerant cell (%)	1.4	61	1.2

Table 2 Number of viable bacteria assessed after seed-coating with *B. subtilis* B076 and storage at 5 °C.

	Number of *B. subtilis* B076 CFU/seed (x10^5)											
Time	r1	r2	r3	r4	r5	r6	r7	r8	r9	r10	Average[1/]	Std Dev.
0 month	5.2	6.6	5.8	6.2	7.6	5.4	8.2	9.2	9.6	5.8	7.0 a	± 1.59
1 month	8.4	6.5	7.5	9.3	5.9	8.0	5.8	6.0	5.6	5.4	6.8 a	± 1.36
2 month	4.5	7.1	6.4	5.8	6.8	6.0	9.2	7.9	6.4	5.6	6.6 a	± 1.30
3 month	5.2	5.0	4.3	7.5	5.4	6.7	5.3	5.8	4.6	3.8	5.4 b	± 1.10
4 month	3.7	1.8	4.6	2.2	2.8	3.6	3.3	5.0	1.7	4.5	3.3 c	± 1.18
5 month	1.2	0.9	1.4	1.1	1.0	1.3	1.7	1.1	1.3	1.2	1.2 d	± 0.23

[1/] Means in a column followed by the same letter are not significantly different (P<0.01) by LSD C.V.(%) = 23.91

Table 3 Efficacy of *B. subtilis* B076 formulations on protecting of leaf area from Aac KK9 infection.

Treatments	spray 1st	spray 2ed	Number of symptom on leaf area			
			No symptom	Symptomless	Moderate	Severe
1	H2O	-	16	-	-	-
2	Aac-KK9	H2O	-	8	4	4
3	Aac-KK9	B076 -A[1/]	-	14	2	
4	Aac-KK9	B076 -B [2/]	-	14	1	1
5	Aac-KK9	B076 -C [3/]	-	16	-	-
6	B076 -A	Aac-KK9	13	2	1	-
7	B076 -B	Aac-KK9	12	3	1	-
8	B076 -C	Aac-KK9	13	2	1	-
9	B076 -A	-	16	-	-	-
10	B076 -B	-	16	-	-	-
11	B076 -C	-	15	1	-	-

[1/] *B. subtilis* B076+H_2O [2/] *B. subtilis* B076+ NB [3/] *B. subtilis* B076+ sticker

สรุป

แบคทีเรีย *B. subtilis* B076 มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรีย Aac ไอโซเลต KK9 ในระดับห้องปฏิบัติการ และสามารถสร้างเซลล์ทนร้อนได้สูงสุด 61% ในวันที่ 5 เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมกลูโคส 2% กระบวนการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer ทำให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* B076 ลดลง 42.7% ผงแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้สามารถผสมกับสารเคลือบ BS-coat2 ได้ดี ให้ผิวเรียบ

สม่ำเสมอ เมล็ดแตงที่เคลือบแล้วมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ติดอยู่ที่ผิวเมล็ดหลังเคลือบ $7x10^5$ cfu/เมล็ด และเริ่มลดลงตั้งแต่ปลายเดือนที่ 3 ของการเก็บรักษา แต่ปริมาณของแบคทีเรียที่คงอยู่ยังคงไม่ต่ำกว่า 10^5 cfu/เมล็ด นอกจากนั้นชีวภัณฑ์สูตรน้ำของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B076 ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 บนใบแตงแคนตาลูปในระดับเรือนทดลอง โดยในกรรมวิธีที่พ่นชีวภัณฑ์ลงบนใบแตงก่อนพ่นเชื้อสาเหตุโรค ให้ผลในการควบคุมการเกิดโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อสาเหตุโรคก่อน โดยชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร สามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 ได้ดี ใกล้เคียงกัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2553. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้า ปี 2547-2552. แหล่งข้อมูล: http://www.doae.go.th/ewt_news.php? nid=8115. ค้นเมื่อ 20 มกราคม 2553.

กฤติกา จันทรางศุ. 2549. การจำแนกความแตกต่างทาง phenotype และ genotype ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

กุศล ถมมา และพิศาล ศิริธร. 2555. ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ในการเคลือบเมล็ดเพื่อควบคุมเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* สาเหตุโรคยางไหลของแตง. แก่นเกษตร 40: 61-68.

นาตยา ขนันไทย. 2545. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid สาเหตุโรคเน่าดำในถั่วเหลือง ถั่วเขียว และงา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

นิตยา สุขทวี. 2549. การโคลนยีนไคติเนสจากเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Ali, M.A. and A.K. Pandey. 2006. Systematic Studies on the Family Cucurbitaceae of Eastern Bihar, India. Cucurbit Genetics Cooperative Report 28-29: 66-69.

Bahar, O., G. Kritzman and S. Burdman. 2009. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. Eur. J. Plant Pathol. 123: 71-83.

Domenech, J., M.S. Reddy, J.W. Kloepper, B. Ramos and J. Gutierrez-Manero. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. Bio Control. 51: 245-258.

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*. J. Phytopath. 154: 148-155.

Hu, X. and G.L. Boyer. 1996. Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATTCC 19213. Appl. Environ. Microbiol. 11: 4044-4048.

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

Raj, S.N., S.A. Deepak, P. Basavaraju, H.S. Shetty, M.S. Reddy and J.W. Kloepper. 2003. Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. Crop Prot. 22: 597-588.

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. J. Biosci. Bioeng. 89: 515-521.