

การใช้ Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) เพื่อตรวจสอบชนิดสาร ทุติยภูมิในต้นกล้าพริกที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* B01

Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) data detect on metabolites in chilli seedlings induced by *Bacillus subtilis* B01

กัญญาณัฐ คุณคำ¹, ชัยณรงค์ รัตนกริทากุล^{1*}, รติยา พงศ์พิสุทธิ¹, พิสุทธิ เขียวมณี¹,
สรรเสริญ รังสุวรรณ¹ และ สันธิติ บินคาเดอร์²

Kanyanat Koonkum¹, Chainarong Rattanakreetakul^{1*}, Ratiya Pongpisutta¹,
Pisut Keawmanee¹, Sansern Rangsuwan¹ and Santiti Bincader²

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

² คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา 13000

² Faculty of Agriculture and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya 13000

บทคัดย่อ: ข้อมูลสารทุติยภูมิในพืชที่เกิดจากการกระตุ้นโดยเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถใช้สนับสนุนแนวทางชีววิถีการใช้จุลินทรีย์จัดการโรคพืช งานวิจัยนี้ใช้เชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท B01 ทำการระบุชนิดด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีในระบบ VITEK-2 ร่วมกับ BCL card พบเป็นเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเชื่อมั่น 91% เชื้อแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Colletotrichum truncatum* และ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ได้ 69.17% และ 60.00% เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* พบว่า มีผลต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดพริกที่แช่ด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท B01 งอกได้ 90% ชุดควบคุมงอก 84% เมื่อต้นกล้าพริกมีใบจริงสองใบหรืออายุ 16 วัน พบความสูงลำต้น และความยาวรากมากกว่าชุดควบคุม ส่งผลให้ค่าดัชนีความแข็งแรงเมล็ดพริกของเชื้อแบคทีเรียมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (690.58 และ 514.42 ตามลำดับ) การตรวจองค์ประกอบข้อมูลสารทุติยภูมิในต้นกล้าพริกที่ได้รับเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท B01 อายุ 16 วัน ด้วย Gas chromatography mass spectrometry เทียบข้อมูลการแตกตัวของสารกับฐานข้อมูล National Institute of Standards and Technology และข้อมูลประโยชน์ของสารจาก PubChem พบพื้นที่ได้กราฟของสารทุติยภูมิที่เพิ่มมากกว่าสองเท่าจากชุดควบคุม เป็นสารในกลุ่มที่มีรายงานฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์และจุลินทรีย์ ได้แก่ 1H-Imidazole, 4-methyl-, 6-Ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4-trimethylquinoline; Cyclodecanamine; Heneicosane และ Eicosane, 1-iodo- กลุ่มสารทุติยภูมิที่เกี่ยวกับการกระตุ้นการเจริญและการสร้างสารในพริก ได้แก่ Hexadecane; Piperidine, 2-propyl-, Undecane 3,8-dimethyl-, 2-Bromo dodecane และ Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl- และกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพในเชิงอุตสาหกรรม คือ Iron pentacarbonyl

คำสำคัญ: บาซิลลัส ซับทิลิส; พริก; สารประกอบทุติยภูมิ; การกระตุ้นความต้านทาน

ABSTRACT: Secondary metabolites data of genus *Bacillus* induced plant can support the evidence of plant response to the biological control agent for plant disease management. In this study, *Bacillus subtilis* isolates B01 were identified by VITEK-2 system with BCL card and a good identity level at 91% probability. The causal of anthracnose fungi, *Colletotrichum truncatum* and *C. gloeosporioides* were tested by dual culture method. The result showed fungal inhibition at 69.71% and 60%. *B. subtilis* gave the higher seed germination rate with 90%, while 84% in nontreated chilli seeds. During the stage of true leaves at 16 days-old chilli seedlings, height and root length were

* Corresponding author: chainarong.r@ku.th

Received: date; December 27, 2022 Accepted: date; March 27, 2023 Published: date; May 10, 2023

longer than the control. Consequently, the result leads to the seed vigor index of bacterial treated was higher than the control (690.58 and 514.42 respectively). The induction result of secondary metabolite chilli after seed soaking with *B. subtilis* isolate B01 at 16 days-old was analyzed by Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The compound fragment and mass were compared with data from the National Institute of Standards and Technology database. The compound information was referred from PubChem database. The induced secondary metabolites from chilli seedlings were compared to the control. The result showed that the cell and microorganism growth inhibited substances were 1H-Imidazole, 4-methyl-; 6-Ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4-trimethylquinoline; Cyclodecanamine; Heneicosane and Eicosane, 1-iodo-. Furthermore, the secondary metabolites related to growth-promoting and volatile oil-forming groups were Hexadecane; Piperidine, 2-propyl-; Undecane 3,8-dimethyl-; 2-Bromo dodecane and Nonane, 2,2,4,4,6,6,8,8-heptamethyl-. Lastly, we can observe an essentially industrial bioactive compound as Iron pentacarbonyl.

Keywords: *Bacillus subtilis*; chilli; secondary metabolites; induced resistance

บทนำ

พริก (*Capsicum annuum* L.) มีความสำคัญในการใช้บริโภคผ่านกระบวนการทางอุตสาหกรรมด้านอาหาร ด้านเภสัชกรรม และด้านการแพทย์ พริกมีส่วนสร้างสีสันและรสชาติในการประกอบเป็นอาหาร ทำให้ความต้องการของผลผลิตพริกมีเพิ่มขึ้น ในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยมีพื้นที่การปลูกพริก 133,847 ไร่ จัดอยู่อันดับที่ 3 ของโลก ในการส่งออกพริกแห้งมีผลผลิตรวม 307,593 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) ถึงแม้ว่าพริกเป็นพืชที่ปลูกได้ตลอดปี และเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ แต่ปัญหาและข้อจำกัดในการปลูกพริกให้มีคุณภาพมีอุปสรรคสำคัญเนื่องจากโรคพืช โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนสในประเทศไทยพบเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* และ *C. siamense* ที่เป็นสาเหตุโรครดดังกล่าว (รติยา และคณะ, 2553) คำแนะนำและแนวทางในการจัดการโรคพืชสามารถใช้วิธีเขตกรรมจนถึงการใช้สารเคมี จากแนวคิดการจัดการโรคพืชตามแนวทางเกษตรยั่งยืน ได้มีการนำชีวภัณฑ์ร่วมในการผลิต โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สามารถครอบครองพื้นที่บริเวณราก หรือ plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ซึ่งมีกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย PGPR ที่นิยมใช้ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติเด่นในด้านการปรับตัวได้ดีในสภาวะเครียด เช่น การคงทนในความร้อน ความเค็ม สภาพแห้งแล้ง (กัญญาณัฐ และคณะ, 2565; Mahapatra et al., 2022) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชอันเนื่องมาจากการละลายโพแทสเซียมในดิน การตรึงไนโตรเจน การดูดซึมสารอาหารในพืช (Radhakrishnan et al., 2017) คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่สามารถหลั่งเอนไซม์เพื่อการจับผนังเซลล์ และทำลายผนังเซลล์ โดยการหลั่งเอนไซม์ในกลุ่มของ chitinase, protease, cellulase, glucanase และ siderophores ทำให้เกิดการรั่วไหลของ protoplast และ vacuole เชื้อรา (Heshem et al., 2019) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บางชนิดสามารถสังเคราะห์สารประกอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เช่น iturin, fengycin, mixirin, pumilacidin และ surfactin (Han et al., 2015; Yamamoto et al., 2015) คุณสมบัติโดยรวมของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช หรือผลต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช (Yu et al., 2002; Rahman et al., 2016) และมีการศึกษาถึงความสามารถในการกระตุ้นความต้านทานในพืชได้ (Zhou et al., 2016; Zhao et al., 2016; Massave et al., 2018; Riu et al., 2022) เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B01 เป็นเชื้อที่แสดงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. truncatum* ได้ดีเมื่อเทียบกับ *Bacillus* ไอโซเลทอื่น ๆ (กัญญาณัฐ และคณะ, 2565) งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* และการตอบสนองของพริกภายหลังการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 ด้วยการสร้างสารประกอบทุติยภูมิเพื่อใช้ประโยชน์ในการติดตามหรือตรวจสอบพริกที่ได้รับการกระตุ้นความต้านทาน

วิธีการศึกษา

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและศักยภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท B01

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท B01 ได้ผ่านการระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุลในส่วนของ 16S ribosomal RNA ด้วยไพรเมอร์ 27F/1492R มาก่อนหน้านี้ (กัญญาณัฐ และคณะ, 2565) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการยืนยันคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค VITEK-2 system เพิ่มเติมเพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรีย โดยทำการ streak เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 ลงบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ย single colony ไปเลี้ยงต่อในอาหาร nutrient broth (NB) เขย่าบน rotary shaker ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความเข้มข้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer (GENESYS 30, Thermo science) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) เท่ากับ 0.2 ก่อนนำไปใช้ทดสอบ สำหรับระบุชนิดของเชื้อทำการตรวจข้อมูลกิจกรรมทางชีวเคมี 46 ชนิดของเชื้อทดสอบ ด้วยชุด BCL card เทียบกับฐานข้อมูลในระบบ VITEK-2 system (bioMérieux, Inc., NC, USA) เพื่อการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท B01 ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากสภาพทดสอบ dual culture

เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B01 มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. truncatum* (กัญญาณัฐ และคณะ, 2565) เมื่อนำมาศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญในพริก คือ *C. gloeosporioides* ที่ได้รับการอนุเคราะห์มาจากห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำเส้นใยที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาทดสอบด้วยวิธี dual culture (Morton and Stroube, 1955) วางเชื้อราที่ขอบจานเลี้ยงเชื้อด้านหนึ่ง และขีดเชื้อแบคทีเรียทดสอบห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อด้านตรงข้ามห่างกัน 3 ซม. ทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ ตรวจสอบผลขนาดโคโลนีเชื้อราที่ถูกยับยั้งจากเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท B01 เปรียบเทียบกับขนาดโคโลนีในชุดควบคุม คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา (%) ตามสมการของ Kabir et al. (2012)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\%)} = ((R1 - R2)/R1) \times 100$$

เมื่อ R1 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* (syn. *capsici*) หรือ *C. gloeosporioides* ในจานอาหารควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* (syn. *capsici*) หรือ *C. gloeosporioides* ในจานอาหารทดสอบ

การส่งเสริมการเจริญเติบโต (plant growth promoting) ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท B01 ในต้นกล้าพริก

นำเมล็ดพริกจินดา กำแพงแสน จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มาแช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 ที่ OD600 เท่ากับ 0.2 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดพริกให้แห้งหมาดบนผ้าขาวบาง 30 นาที ก่อนนำไปวางบนกระดาษกรองด้วยวิธี blotter จำนวน 6 ซ้ำ ซ้ำละ 25 เมล็ด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ในแสงมืดและสว่าง 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด 16 วันหรือต้นกล้าพริกมีใบจริงสองใบ ทำการตรวจสอบต้นกล้าพริกเพื่อตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การงอก (%) ความสูงต้น ความยาวราก และคำนวณหาดัชนีความแข็งแรง (seed vigor index) (Abdul-Baki et al., 1973) เทียบกับชุดควบคุมที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งชั่วโมง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (\%)} = (\text{จำนวนของเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}) \times 100$$

$$\text{ดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า} = [\text{ค่าเฉลี่ยของความยาวราก (ซม.)} + \text{ค่าเฉลี่ยของความยาวลำต้น (ซม.)}] \times \text{เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (\%)}$$

การตรวจสอบสารพิษภูมิคุ้มกันกระตุ้นด้วย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท B01 ในต้นกล้าพริก

การสกัดสารพิษภูมิคุ้มกันจากต้นกล้าพริก

นำเมล็ดพริกพันธุ์จินดา กำแพงแสน ที่แช่ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 ระยะเวลา 3 ชั่วโมง และชุดควบคุม (แช่ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ) ตามวิธีการของ Naziya et al. (2019) หลังจากการเพาะบนพีทมอส ทำการสุ่มตัวอย่างต้นกล้าพริกจำนวน 20 ต้น เมื่อมีใบจริงสองใบที่อายุ 16 วัน สับให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืช 0.5 ก. ย้ายลงหลอดแก้ว สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (RCI Labscan; pesticide grade) 3,000 มล. บ่มไว้ในที่มืด 5 วัน ดูดสารละลายที่สกัดได้ปริมาตร 2,500 มล. นำไประเหยด้วย Reacti-Vap™ evaporators และละลายกลับด้วย สารละลายผสม acetonitrile : ethyl acetate : chloroform (AEC; 1:1:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1,000 มล. ย้ายลงในหลอด vial ก่อนนำไปตรวจด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ทำการฉีด 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์สารประกอบด้วยเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์สารประกอบในตัวอย่างต้นกล้าพริก ตามวิธีของ Madla et al. (2012) โดยใช้เครื่อง GC-MS รุ่น GC 7890B กำหนดให้ฉีดสารที่สกัดปริมาตร 1 ไมโครลิตร ด้วยระบบการฉีด splitless โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิที่ 260°C ใช้คอลัมน์ชนิด HP 5 MS 30 ม. x 0.25 มม. ก๊าซฮีเลียมไหลเข้าคอลัมน์ 1.0 มล./นาที่ อุณหภูมิคอลัมน์เป็นโปรแกรมเริ่มต้นที่ 45°C คงไว้ 1 นาที เพิ่มขึ้นอัตรา 10°C/นาที่ จนถึงอุณหภูมิ 280°C คงไว้ 5 นาที ในส่วนของ MS รุ่น 7000D Triple Quad detector เป็น MS Quadrupole ที่ต่อกับ GC โดยตรง และอุณหภูมิ ion source เป็น 230°C ในระบบ electron ionization (EI) ตั้งค่า electron energy 70 eV ตรวจผลการแยกองค์ประกอบเป็น total ion chromatogram (TIC) ในระบบ scan mode ใช้ช่วงของ Mass 10 ถึง 600 AMU (Atomic Mass Unit) ประมวลผลด้วย Agilent Mass Hunter Unknowns Analysis เทียบกับฐานข้อมูล The NIST Mass Spectrometry Data Center นำข้อมูลมาคัดเลือกชนิดสารประกอบที่พบในตัวอย่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ โดยใช้เกณฑ์ค่าพื้นที่ใต้กราฟมากกว่า 150,000 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณค่า fold change เทียบกับชุดควบคุม คัดเลือกค่า fold change ที่มากกว่า 2 คัดเลือกข้อมูลสารประกอบจากพริกที่มีการตอบสนองเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 นำไปตรวจสอบข้อมูลชนิดของสารและรายละเอียดประสิทธิภาพของสารที่มีรายงาน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การตรวจสอบกิจกรรมทางชีวเคมีของแบคทีเรียด้วย VITEK-2 system

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท B01 ที่ใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการยืนยันชนิดของแบคทีเรียโดยใช้การตรวจกิจกรรมทางชีวเคมีด้วย VITEK-2 system (bioMérieux, Inc., NC, USA) ร่วมกับ BCL card ซึ่งใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ตระกูล Bacillaceae ด้วยการทดสอบทางชีวเคมีทั้งหมด 46 รายการ ในส่วนของแหล่งคาร์บอน กิจกรรมของเอนไซม์ ผลการทดสอบจากระบบ VITEK-2 system ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Biochemical properties data of *Bacillus subtilis* isolate B01 with BCL card by VITEK-2 system

Biochemical test details	Result ^{1/}	Biochemical test details	Result ^{1/}	Biochemical test details	Result ^{1/}
Beta-xylosidase	+	Myo-inositol	+	Pyruvate	+
L-lysine-Arylamidase	-	Methyl-A-D-glucopyranoside-acidification	+	Alpha-glucosidase	-
L-Aspartate-arylamidase	-	Ellman	+	D-Tagatose	-
Leucine- arylamidase	+	Methyl-D-xyloside	-	D-Trehalose	+
Phenylalanine arylamidase	+	Alpha-mannosidase	-	Inulin	+
L-proline arylamidase	-	Maltotriose	+	D-Glucose	+
beta-galactosidase	+	Glycine arylamidase	-	D-Ribose	-
L-pyrrolydonyl-arylamidase	+	D-Mannitol	+	putrescine assimilation	-
alpha-galactodidase	+	D-Mannose	+	growth in 6.5% NaCl	+
Alanine arylamidase	-	D-Melezitose	-	Kanamycin resistance	-
Tyrosine arylamidase	+	N-acetyl-D-glucosamine	-	Oleandomycin resistance	-
Beta-N-acetyl-glucosaminidase	-	Palatinose	+	Esculin hydrolysis	+
Ala-Phe-Pro-arylamidase	+	L-Rhamnose	-	Tetrazolium red	+
Cyclodextrin	+	Beta-glucosidase	+	Polymycin_B resistance	+
D-Galactose	-	Beta-mannosidase	-		
Glycogen	+	Phosyl choline	-		

^{1/} Presence of Biochemical test; represent (+) and absence of biochemical test; represent (-)

ข้อมูลของระบบ VITEK-2 ร่วมกับ BCL card ระบุว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* B01 จัดอยู่ในกลุ่มของ *B. subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus* ที่ระดับความเชื่อมั่น 91% (probability) มีคุณภาพการระบุชนิดเชื้อในระดับดี (good identification) โดยระบบ VITEK-2 เป็นระบบที่ใช้ยืนยันชนิดของแบคทีเรียโดยไม่ต้องอาศัยการอ่านลำดับเบส เป็นการนำข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์ และการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจสอบ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของเชื้อต้นแบบ ซึ่งเป็นพื้นฐานหนึ่งในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์หรือโรงงาน จากงานของ Halket et al. (2009) ที่ใช้ VITEK-2 ร่วมกับ BCL card เพื่อ

จำแนก *Bacillus* sp. สามารถจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างเอนโดสปอร์ (aerobic endospore former) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* ได้อย่างถูกต้องทั้งหมด แต่เนื่องจากเป็นข้อจำกัดของชุด BCL card ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* ได้ ทางผู้วิจัยได้ใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S ribosomal RNA (กัญญาณัฐ และคณะ, 2565) เพื่อเป็นการยืนยันชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองว่าเป็น *B. subtilis*

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท B01 ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides*

เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *C. truncatum* ได้ที่ 69.17% (Figure 1A และ 1B) (กัญญาณัฐ และคณะ, 2565) และการศึกษาเพิ่มเติมในงานวิจัยนี้คือ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสพริก บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี dual culture พบว่า *B. subtilis* ไอโซเลท B01 สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราได้ 60.00% ตามลำดับ (Figure 1C, 1D และ Table 2) โดยลักษณะการยับยั้งโคโลนีเชื้อราโดยเชื้อแบคทีเรียเป็นแบบการสร้างสารยับยั้งหรือ antibiotic โดยสังเกตเห็นช่องว่างระหว่างสิ่งทดสอบทั้งสองชนิด (Elshakh et al., 2016) ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในการควบคุมโรคพืช พบในรายงานหลายฉบับ เช่น การศึกษาของ Prapagdee et al. (2012) ที่ใช้สารสกัดหยาบเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SSE4 เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในกล้วยไม้สกุลหวาย Ashwini and Srividya (2014) กล่าวว่า *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้จากการทดสอบแบบ dual culture และยืนยันได้ว่ากิจกรรมดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ beta 1,3-glucanase และ chitinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อราในกลุ่ม ascomycota ที่มีผนังเป็น beta glucan และ chitin เป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับงานของ Kumar et al. (2021) ที่ใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ AKP เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. truncatum* (syn. *capsici*) และมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี

Table 2 Plant pathogenic *Colletotrichum* sp. mycelium inhibition by *Bacillus subtilis* isolate B01

Isolates	Plant pathogenic mycelium inhibition (%)	
	<i>C. truncatum</i> ^{1/}	<i>C. gloeosporioides</i>
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Bacillus subtilis</i> isolate B01	69.17 ± 0.09	60.00 ± 1.00
Sig. (between treatment) ^{2/}	*	*

^{1/} Plant pathogenic mycelium inhibition of *C. truncatum* was published by กัญญาณัฐ และคณะ (2565)

^{2/} * Significant difference between treatment at p<0.05 using t-test (n = 6)

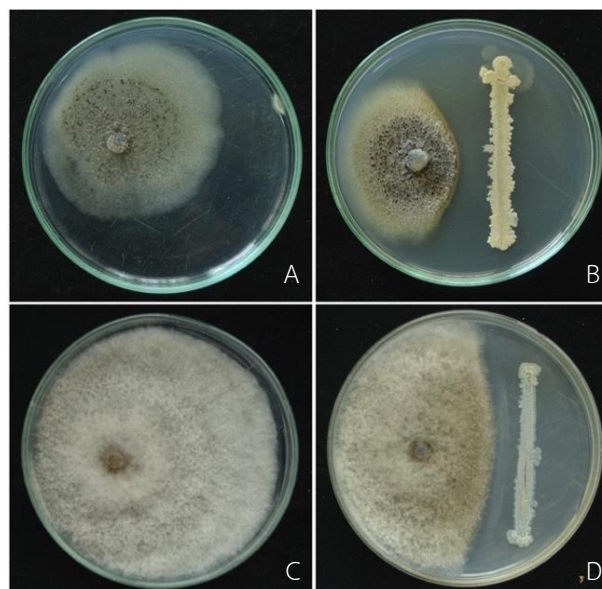


Figure 1 Efficacy of *Bacillus subtilis* isolate B01 to inhibit *Colletotrichum* mycelium after 7 days treated A) Nontreated of *Colletotrichum truncatum* B) *C. truncatum* and *B. subtilis* B01 C) Nontreated of *C. gloeosporioides* D) *C. gloeosporioides* and *B. subtilis* B01. (Figure A and B were published by กัญญาณัฐ และคณะ, 2565)

ผลของเชื้อแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริก

การทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 โดยการชุบเมล็ดพริก เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริกที่ระยะเวลา 16 วัน พบว่า ต้นกล้าพริกมีความงอกในชุดควบคุมและกรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 อยู่ที่ 84.00% และ 90.00% มีค่าความสูงลำต้นเฉลี่ย 3.92 ซม. ความยาวรากเฉลี่ย 3.64 ซม. ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีความยาวลำต้นและความยาวรากเฉลี่ย 3.01 และ 3.11 ซม. ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณค่าดัชนีความแข็งแรงของเมล็ดพบว่ามีความเท่ากับ 690.58 ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมที่มีดัชนีความแข็งแรงของเมล็ดที่มีความเท่ากับ 514.42 (Table 3) เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B01 เมื่อนำไปใช้ในการแช่เมล็ด (bio-priming) ของพริกจินดา กำแพงแสน สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือ plant growth promoting กับต้นกล้าพริกอายุ 16 วันได้ และจากงานของกัญญาณัฐ และคณะ (2565) พบ ต้นกล้าพริกอายุ 28 วันมีการเจริญเติบโตได้ดี ลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าต้นกล้าพริกอายุ 16 วันเริ่มแสดงผลการตอบสนองการแช่ด้วย *B. subtilis* B01 ที่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมในทางที่ดีขึ้น การพิสูจน์ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ได้พิสูจน์ให้เห็นศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Jardin (2015) กล่าวถึง แนวคิดการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลักษณะของการกระตุ้นพืชทางชีวภาพ (plant biostimulant) เพื่อเสริมการใช้ประโยชน์ของพืชจากธาตุอาหาร ทำให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ผลงานของ Li et al. (2019) ที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* HX-2 ชุบเมล็ดข้าวโพดก่อนปลูก ส่งผลต่อการเจริญทั้งความสูงลำต้น ความยาวราก และอัตราการงอกของเมล็ด มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ในลักษณะ bio-priming กับเมล็ดข้าวโพดก่อนนำไปปลูก (Li et al., 2021) สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวโพดในสภาวะดินเค็ม ดังเห็นผลในการยกระดับการงอกของเมล็ด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของข้าวโพดได้เพิ่มขึ้น

คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์โดย plant growth promoting rhizobacteria เป็นคุณสมบัติหนึ่งที่น่าสนใจ การยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เป็นผลจาก การแย่งแย่งอาหารในพื้นที่กับเชื้อโรคพืช การปลดปล่อยสารเพื่อยับยั้งเชื้อโรคพืช และการกระตุ้นการตอบสนองของพืช ทั้งนี้ข้อมูลสารประกอบของพริกที่ตอบสนองจากการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สามารถนำมาพิจารณาเพื่อใช้ติดตามการกระตุ้นความต้านทานในพริกได้

Table 3 Chilli seedling growth after 16 days of stimulation by *Bacillus subtilis* isolate B01

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Seed germination (%)	Seed vigor index
Control	3.01 ± 1.12	3.11 ± 1.12	84.00	514.42
Treated by <i>Bacillus subtilis</i> isolate B01	3.92 ± 0.93	3.64 ± 1.13	90.00	680.58
Sig. (between treatment) ^{1/}	*	*	-	-

^{1/} * Significant difference between treatment at p<0.05, using t-test (n = 150).

ข้อมูลสารประกอบจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ในต้นกล้าพริกที่ผ่านการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *B. Subtilis* ไอโซเลท B01

การตรวจสอบด้วย GC-MS ของสารประกอบทุติยภูมิจากส่วนลำต้นของต้นกล้าพริกพันธุ์จินดา กำแพงแสน ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. Subtilis* ไอโซเลท B01 เป็นเวลา 16 วัน พบลักษณะ GC-MS profile มีการกระจายตัวตามโครมาโตแกรมที่แสดงใน Figure 2 ข้อมูลการแตกตัวและมวลของสารประกอบเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NIST ทำให้ทราบชนิดของสาร คัดเลือกพื้นที่ได้กราฟของสารประกอบที่มีการเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม พบสารประกอบจำนวน 25 สาร ดังแสดงใน Table 4

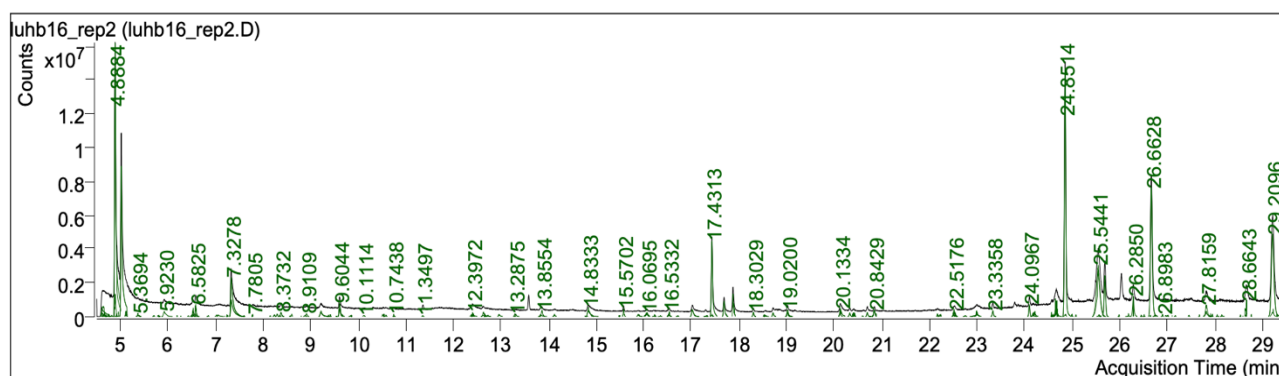


Figure 2 GC-MS chromatogram of bioactive compounds from the *Bacillus subtilis* isolate B01 treated chilli.

Table 4 List of GC-MS analysis identified bioactive compounds from chilli seedlings extracted after *Bacillus subtilis* isolate B01 treated for 16 days

RT (min)	Compound name	Formular	Molecular weight	Average peak area	
				control	treated
4.8883	Cyclohexanol	C ₆ H ₁₂ O	100.16	32,594,065	33,991,288
5.0186	1H-Pyrrole-2,5-dione	C ₄ H ₃ NO ₂	97.07	18,988,287	22,414,479
5.0187	Cyclohexanone	C ₆ H ₁₀ O	98.14	18,837,192	22,084,508
6.5823	Undecane, 4,6-dimethyl-	C ₁₃ H ₂₈	184.36	1,004,168	1,191,074
6.5825	Vigabatrin	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.16	1,054,147	1,109,712
7.3278	1H-Imidazole, 4-methyl-	C ₄ H ₆ N ₂	82.1	4,031,962	8,285,965
7.3280	Sulfurous acid, dicyclohexyl ester	C ₁₂ H ₂₂ O ₃ S	246.37	6,258,743	8,542,935
8.3741	p-Cresidine	C ₈ H ₁₁ NO	137.18	447,297	461,889
9.6023	Boraneamine, N-ethyl-1,1-dipropyl-	C ₈ H ₂₀ BN	141.06	875,937	894,525
9.6044	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226.44	851,350	1,823,722
9.6046	Octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine	C ₇ H ₁₄ N ₂	126.2	652,104	1,154,752
9.6048	Piperidine, 2-propyl-, (S)-	C ₈ H ₁₇ N	127.23	7,418,350	14,992,026
13.8662	6-Ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4-trimethylquinoline	C ₁₄ H ₂₁ NO	219.32	137,295	696,177
15.5700	5-Aminosilicic acid, N,O,O'-tris(trimethylsilyl)-	C ₁₆ H ₃₁ NO ₃ Si ₃	369.68	319,664	587,640
17.0182	Undecane, 3,8-dimethyl-	C ₁₃ H ₂₈	184.36	176,181	998,934
18.7150	2-Bromo dodecane	C ₁₂ H ₂₅ Br	249.23	161,660	630,793
19.0159	2-Ethylpiperidine	C ₇ H ₁₅ N	113.2	771,670	1,191,269
22.9987	Cyclodecanamine, N-methyl-	C ₁₁ H ₂₃ N	169.31	631,121	1370406
24.8508	Iron pentacarbonyl	C ₅ FeO ₅	195.9	1,112,510	21,881,515
24.8512	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	380.73	29,737,137	30,854,530
25.6859	Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-	C ₁₆ H ₃₄	226.44	1,270,496	3,082,363
25.6860	Hentriacontane	C ₃₁ H ₆₄	436.84	2,206,043	3,672,762
26.6628	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	296.57	1,465,838	18,197,325
27.8159	Eicosane, 1-iodo-	C ₂₀ H ₄₁ I	408.44	384,356	1,432,163
29.4937	4-Methyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)pent-1-ene, 2TMS derivative	C ₂₄ H ₃₆ O ₂ Si ₂	412.71	201,649	253,941

ข้อมูล GC-MS โครมาโตแกรม ดังแสดงใน **Figure 2** และ **Table 4** เมื่อนำมาคิดสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของชุดทดสอบที่เพิ่มขึ้น เทียบกับชุดควบคุม หรือค่า fold change คัดเลือกค่า fold change ที่มากกว่า 2 ผลดังสรุปใน **Table 5** พบสารประกอบทุติยภูมิ จำนวน 11 สาร ที่ถูกกระตุ้นได้เพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม สารดังกล่าวได้แก่ 1H-Imidazole, 4-methyl-; Hexadecane; Piperidine, 2-propyl-; 6-Ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4- trimethylquinoline; Undecane 3,8-dimethyl-; 2-Bromo dodecane; Cyclodecanamine; Iron pentacarbonyl; Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-; Heneicosane และ Eicosane, 1-iodo- ทั้งนี้ สารทุติยภูมิดังกล่าวพบมีความสำคัญในกระบวนการทางชีววิทยา และการกระตุ้นความต้านทานในพืช ดังนี้

1H-Imidazole, 4-methyl- มีค่า fold change 2.06 มี Imidazole ring เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นสารสำคัญในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และมะเร็ง นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบสำคัญของยาด้านมาลาเรีย (Orhan et al., 2019; Rani et al., 2013) สารประกอบมีการนำมาใช้ในทางเภสัชกรรม เป็นส่วนประกอบของยาฆ่าเชื้อ (antiseptic agent) ในทางการเกษตรมีการใช้เป็นส่วนประกอบของสารเคมีกำจัดโรคพืชชนิดโปรคลอราซ (prochloraz) (Rodríguez-Ortega et al., 2019) ข้อมูลของ PubChem (2022) สามารถพบในพืชตระกูลถั่วชนิด *Sophora flavescens* ที่มีรายงานสรรพคุณเป็นสารต้านมะเร็งได้

Hexadecane มีค่า fold change 2.14 สารดังกล่าวเป็นสารประกอบ alkane สายตรง มีคาร์บอน 16 อะตอม เป็นกลุ่มของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพริกกลุ่ม long pepper (Hexadecane; Pubchem, 2022)

Piperidine, 2-propyl-, (S)- มีค่า fold change ที่ 2.02 สารนี้พบในพืชบริเวณ cytoplasm และ ช่องว่างระหว่างเซลล์ สารดังกล่าวเป็นสารประกอบอินทรีย์กลุ่มของอัลคาลอยด์ และอนุพันธ์ (United States Department of Agriculture, 2004) ข้อมูลในฐาน PucChem (2022) มีเอกสารอ้างอิงการใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ในระบบส่งประสาท และระบบลำเลียงโลหิต

6-Ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4- trimethylquinoline มีค่า fold change ที่ 5.07 มีรายงานคุณสมบัติในการเป็นสาร antioxidant ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับไขมัน (Bbaszczyk et al., 2013)

Undecane, 3,8-dimethyl- มีค่า fold change ที่ 5.67 เป็นสารประกอบในกลุ่ม alkane ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่ methyl group ที่ตำแหน่ง 3 และ 8 และเป็นสารเมแทบอไลต์ที่สามารถพบได้ในมะเร็ง (cancer metabolite) (Vermeersch et al., 2014)

2-Bromo dodecane มีค่า fold change ที่ 3.90 Garruti et al. (2013) ได้รายงานไว้ถึงการเป็นสารระเหยที่พบในพริก

Cyclodecanamine, N-methyl- มีค่า fold change ที่ 2.17 สารดังกล่าวเป็นองค์ประกอบสารที่มีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลงสกัดมาจากพืช *Morinda tinctoria* ซึ่งสามารถกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) ได้ โดยมีพืชต่อระบบหายใจของแมลง (Praveena et al., 2016)

Iron pentacarbonyl มีค่า fold change ที่ 20.259 เป็นสารที่พบการกระตุ้นเพิ่มได้มากที่สุด มีการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเหล็กเส้น นอกจากนี้ยังเป็นสารที่ใช้เติมในเชื้อเพลิง และมีการนำมาใช้ในกระบวนการ reduction ของสารเคมีอื่น ๆ (Lask and Wagner, 1962; NIOSH, 2022)

Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl- มีค่า fold change ที่ 2.43 มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับระบบการส่งข้อมูลในพืชตระกูล solanaceae (Cui et al., 2019)

Heneicosane มีค่า fold change อยู่ที่ 12.41 มีรายงานฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *Aspergillus fumigatus* และ *Streptococcus pneumoniae* ได้ สารประกอบดังกล่าวมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี (Rhetso et al., 2020) Vanitha et al. (2020) ได้มีการนำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางการแพทย์ เพื่อลดการดื้อยาของจุลินทรีย์

Eicosane, 1-iodo- มีค่า fold change ที่ 3.73 สารประกอบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ และ antioxidant ที่สกัดได้จาก *Allium chinense* จากรายงาน Rhetso et al. (2020) พบว่าเป็นสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนี้สารดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้

Table 5 Details of Induced substances compound in chilli after treated with *Bacillus subtilis* B01

Component compounds	Fold-change	Details	References
1H-Imidazole, 4-methyl-	2.06	A natural product found in <i>Sophora flavescens</i> , used to make pharmaceuticals, antiseptic agents. Target site to cytochrome P450 family. Relate to the fungicide product as procloraz.	PubChem, 2022, Rani et al., 2013; Orhan et al., 2019; Rodriguez-Ortega et al., 2019; Richaud et al., 2021
Hexadecane	2.14	It is a component of essential oil isolated from long pepper. It has a role as a plant metabolite.	PubChem, 2022; Chayabutra and Ju, 1999
Piperidine, 2-propyl-, (S)-	2.02	Composed of a membrane-enclosed mass of protoplasm.	PubChem, 2022; FOODB, 2020
6-Ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4-trimethylquinoline	5.07	Antioxidant agent against with lipid peroxidation	BBaszczuk, et al., 2013
Undecane, 3,8-dimethyl-	5.67	Metabolite observed in cancer and found essential oil composition in <i>Hibiscus sabdariffa</i>	PubChem, 2022., Vermeersch et al., 2014
2-Bromo dodecane	3.90	Volatile profile in <i>Capsicum chinense</i>	Garruti. et al., 2013
Cyclodecanamine, N-methyl-	2.17	Component which essential as botanical insecticide.	Praveena et al., 2016
Iron pentacarbonyl	19.67	Role as reduction of other chemicals.	Lask and Wagner, 1962; NIOSH, 2022
Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-	2.43	Played a role in providing information to e-nose system on the infestation on the tomato plants.	Cui et al. 2019
Heneicosane	12.41	Role as a pheromone, a plant metabolite. promote to the growth of plants.	Vanitha et al., 2020; Rhetso et al., 2020;
Eicosane, 1-iodo-	3.73	Alkane which has high antioxidant and cell inhibition	Rhetso et al., 2020

สารทุติยภูมิในต้นกลัฟริกที่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 สารทุติยภูมิที่ถูกกระตุ้นขึ้นมีโอกาสดังแสดงประสิทธิภาพหลายประการเช่น กลุ่มสารทุติยภูมิอาจออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์และออกฤทธิ์ต่อเซลล์ ได้แก่ 1H-Imidazole, 4-methyl-; 6-Ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4- trimethylquinoline; Cyclodecanamine; Heneicosane และ Eicosane, 1-iodo- กลุ่มสารทุติยภูมิที่มีเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเจริญ และการสร้างน้ำมันหอมระเหยในพริก ได้แก่ Hexadecane; Piperidine, 2-propyl-; Undecane 3,8-dimethyl-; 2-Bromo dodecane และ Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl- และกลุ่มสารที่มีความสำคัญกับอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น Iron pentacarbonyl

ข้อมูลของสารทุติยภูมิที่เพิ่มขึ้น สามารถชี้ให้เห็นว่า การตอบสนองของพริกอาจเกิดจากกิจกรรมปกติที่พืชมีอยู่แล้ว แต่ได้รับการกระตุ้นให้เพิ่มมากขึ้น ข้อมูลสารทุติยภูมิสามารถใช้เพื่อการอ้างอิงในการตอบสนองของพริกที่อาจส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อโรคโดยตรง หรือการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชทดสอบ ซึ่งเป็นพื้นฐานของแนวทางการกระตุ้นความต้านทานในพืชต่อไป

สรุป

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีการแนะนำการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในทางด้านการเกษตร เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี ในการทดลองครั้งนี้ นำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 ที่ผ่านการระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุลด้วยไพรเมอร์ 27F/1492R มาตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยเทคนิค VITEK-2 system พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เปอร์เซ็นต์ความเชื่อมั่น 91% เมื่อทดสอบด้วยวิธีการยับยั้งของเส้นใยสาเหตุโรคพืชบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* (syn. *capsici*) ที่ 60% และ 69.17% ตามลำดับ การนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท B01 มาแชร์ร่วมกับเมล็ดพริกก่อนนำมาเพาะเป็นต้นกล้า พบว่า มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริก และยังพบการกระตุ้นสารทุติยภูมิของต้นกล้าพริกที่มีฤทธิ์ทางเภสัชกรรม และอุตสาหกรรม 11 สารสำคัญ ได้แก่ 1H-Imidazole, 4-methyl-; Hexadecane; Piperidine, 2-propyl-; 6-Ethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4-trimethylquinoline; Undecane 3,8-dimethyl-; 2-Bromo dodecane; Cyclodecanamine; Iron pentacarbonyl; Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-; Heneicosane และ Eicosane, 1-iodo- ซึ่งฤทธิ์ของสารประกอบเป็นไปได้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หรือเซลล์ และสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการสร้างน้ำมันระเหยในพริกได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2565 และขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน สำหรับสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กัญญาณัฐ คุณคำ, ชัยณรงค์ รัตนกริชากุล และรติยา พงศ์พิสุธา. 2565. การตรวจสอบเอนไซม์และสภาพความคงทนของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกสำหรับการผลิตพริก. น. 67 - 76. ใน: ประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 60. วันที่ 21 - 23 กุมภาพันธ์ 2565. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รติยา พงศ์พิสุธา, วรานันท์ วิญญรัตน์, โชติรส รอดเกตุ และเทพพนม แสงเพลิง. 2553. ความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 41(1): 318-321.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. พริก. แหล่งข้อมูล: <http://www.agriman.doae.go.th/home/news/2565/22chili.pdf>. ค้นเมื่อ 20 ตุลาคม 2565.
- Abdul-Baki, A.A., and J.D. Anderson. 1973. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. Crop science. 13: 630-633.
- Ashwini, N., and S. Srividya. 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. 3 Biotech. 4: 127-136.
- Bbaszczyk, A., A. Augustyniak, and J. Skolimowski. 2013. Ethoxyquin: an antioxidant used in animal feed. International Journal of Food Science. 2013: 1-12.

- Begum, I., F. R. Mohankumar, and K. Ramani. 2016. GC–MS analysis of bio-active molecules derived from *Paracoccus pantotrophus* FMR19 and the antimicrobial activity against bacterial pathogens and MDROs. *Indian Journal of Microbiology*. 56(4): 426–432.
- Biomerieux. 2013. BioMérieux announces U.S. FDA clearance for vitek® MS, a revolutionary technology which reduces microbial identification from days to minutes reinforcing medical value of diagnostics. <https://www.biomerieux.com/en/biomerieux-announces-us-fda-clearance-vitekr-ms-revolutionary-technology-which-reduces-microbial>. Accessed Oct. 15, 2022.
- Biomerieux. 2019. Vitek® MS: Healthcare. /<https://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-ms-healthcare>.
- Chayabutra, C., and L. K. Ju. 1999. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and aerobic denitrifying conditions. *Applied and Environment Microbiology*. 66(2): 493–498.
- Cui, S., E. A. A. Inocente, N. Acosta, H. M. Keener, H. Zhu, and P. P. Ling. 2019. Development of fast e-nose system for early-stage diagnosis of aphid-stressed tomato plants. *Sensors*. 19(16): 3480.
- El-Beltagi, H. S., and M. H. Badawi. 2013. Comparison of antioxidant and antimicrobial properties for *Ginkgo Biloba* and rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) from Egypt. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 41 (1): 126–135.
- Elshkh, A. S. A., S.I. Anjum, W. Qiu, A. A. Almonfy, W. Li, Z. Yang, Z. Q. Cui, B. Li, G. Sun, and G. L. Xie. 2016. Controlling and defense-related mechanism of *Bacillus subtilis* strains against bacterial leaf blight of rice. *Journal of Phytopathology*. 164: 534–546.
- Garruti, D. S., N. O. F. Pinto, V. C. C. Alves, M. F. A. PENHA, E. C. Tobaruela, and I. M. S. Araujo. 2013. Volatile profile and sensory quality of new varieties of *Capsicum chinense* pepper. *Food science and Technology* (Campinas). 33(1): 102–108.
- Halket, G., A. E. Dinsdale, and N. A. Logan. 2009. Evaluated of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endospore formers. *Letters in Applied Microbiology*. 50: 120–126.
- Han, T., C. You, L. M. Zhang, C. Feng, C. C. Zhang, J. Wang, and F. Y. Kong. 2015. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. *Biological Control*. doi.org/10.1007/s10526-015-9705-0.
- Hashem, A., B. Tabassum, and E. F. A. Allah. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26: 6.
- Iron pentacarbonyl (as Fe). 2011. NIOSH pocket guide to chemical hazards. Centers for Disease Control and Prevention. Accessed Oct. 20, 2022.
- Jardin, D. 2015. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196(30): 3–14.
- Kabir, L., W. K. Sang, S. K. Yun, and S. L. Youn. 2012. Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on paper. *Mycobiology*. 40: 244–251.
- Kumar, A., J. Rabha, and D. K. Jha. 2021. Antagonistic activity of lipopeptide-biosurfactant producing *Bacillus subtilis* AKP against *Colletotrichum capsici*, the causal organism of anthracnose disease of chilli. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 36. 102133.

- Lask, G., and H. Wagner. 1962. Influence of additives on the velocity of laminar flames. Eighth International Symposium on Combustion. 432–438.
- Li, H., H. Yue, L. Li, Y. Liu, H. Zhang, J. Wang, and X. Jiang. 2021. Seed bio stimulant *Bacillus* spp. MGW9 improve the salt tolerance of maize during seed germination. *AMB express*. 11: 74.
- Li, H., Y. Zhao, and X. Jiang. 2019. Seed soaking with *Bacillus* sp. Strain HX-2 alleviates negative affect of drought stress on maize seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 79(3): 396–404.
- Luo, Y., and J. D. Helmann. 2011. Analysis of the role of *Bacillus subtilis* σ^M in β -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Molecular Microbiology*. 83(3): 623–639.
- Madla, S., D. Miura, and H. Wariishii. 2012. Optimization of extraction method for GC-MS based metabolomics for filamentous fungi. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 4: 005–009.
- Mahapatra, S., R. Yadav, and W. Ramakrishna. 2022. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Journal of Applied Microbiology*. 132: 3543–3562.
- Massave, V. C., A. Hanif, A. Farzand, D. K. Mburu, S. O. Ochola, and L. Wu. 2018. Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*. 108: 1373-1385.
- Morton, D.T., and N. H. Stroube. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of microorganism upon *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 45: 419-420.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem compound summary for CID 11006, Hexadecane. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexadecane>. Accessed Oct. 10, 2022.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem compound summary for CID 12403, Heneicosane. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Heneicosane>. Accessed Oct. 8, 2022.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem compound summary for CID 13195, 4-methylimidazole. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Methylimidazole>. Accessed Oct. 10, 2022.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem compound summary for CID 441072, (S)- 2-propylpiperidine. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/S_-2-Propylpiperidine. Accessed Oct. 12, 2022.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem compound summary for CID 86540, 3,8-dimethylundecane. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_8-Dimethylundecane. Accessed Oct. 12, 2022.
- Naziya, B., M. Murali, and K.N. Amruthesh. 2019. Plant growth-promoting fungi (PGPF) instigate plant growth and induce disease resistance in *Capsicum annuum* L. upon infection with *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby. *Biomolecules*. 10: 41.
- Orhan, E., M. KÖSE, D. Alkan, and L. ÖZTÜRK. 2019. Synthesis and characterization of some new 4-Methyl-5-Imidazole carbaldehyde derivatives. *Journal of the Turkish chemical society section A: Chemistry*. 6(3): 373–382.

- Peter, B. 2010. Chapter 42 - Understanding and optimizing the microbial degradation of olive oil: a case study with the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. 377–386 p.
- Prapagdee, B., L. Tharasaithong, R. Nanthaplot, and C. Paisitwiroj. 2012. Efficacy of crude extract of antifungal compounds produced from *Bacillus subtilis* on prevention of anthracnose disease in dendrobium orchid. *Environment Asia*. 5(1): 32–38.
- Praveena, A., and K. P. Sanjayan. 2016. A bioinformatic approach the insecticidal property of *Morinda tinctoria* Roxb. against the cotton bollworm *Helicoverpa armigra*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 9(11): 1829–1834.
- Radhakrishnan, R., A. Hashem, and E. F. A. Allah. 2017. *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environment. *Frontiers in Physiology*. 8: 667.
- Rahman M. M. E., D. M. Hossain, K. Suzuki, A. Shiya, K. Suzuki, and T. K. Dey. 2016. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. *Australasian Plant Pathology*. 45: 103.
- Rani, N., and R. S. Dahiya. 2013. Imidazoles as promising scaffolds for antibacterial activity: a review. *Mini reviews in Medicinal Chemistry*. 1812–1835.
- Rhetso, T., R. Shubbharani, and V. Sivaram. 2020. Chemical constituents, antioxidant, and antimicrobial activity of *Allium chinense*. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 6: 102.
- Richaud, A., F. Mendez, N. Barba-Behrens, P. Florian, O.N. Medina-Campos, and J. Pedraza-Chaverri. 2021. Electrophilic modulation of the superoxide anion radical scavenging ability of copper (II) complexes with 4-Methyl imidazole. *The Journal of Physical Chemistry*. 125(12): 2394–2401.
- Riu, M., J. S. Son, S. K. Oh, and C. M. Ryu. 2022. Aromatic agriculture: volatile compound-based plant disease diagnosis and crop protection. *Research in Plant Disease*. 28(1): 1–18.
- Rodriguez-Ortega, P. G., R. Casas, A. Marchal-Ingrain, and B. Gilbert-López. 2019. Synthesis and structural characterization of a ubiquitous transformation product (BTS 40348) of fungicide prochloraz. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67(31): 8641–8648.
- Saharan, B., and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Science and Medical Research*. 21: 1-30.
- United States Department of Agriculture. 2004. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Available: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search/list?et=&count=&max=20&sort=&qlookup=%28S%29-2-Propylpiperidine&offset=20&order=desc>. Accessed Nov. 1, 2022.
- Vanitha, V., S. Vijayakumar, M. Nilavukkarasi., V. N. Punitha, E. Vidhya, and P. K. Praseetha. 2020. Heneicosane—A novel microbicidal bioactive alkane identified from *Plumbago zeylanica* L. *Industrial Crops and Products*. 154: 112748.
- Vermeersch, K. A., L. Wang, J. F. McDonald, and M. P. Styczynski. 2014. Distinct metabolite responses of an ovarian cancer stem cell line. *BMC systems biology*. 8: 134.

- Widnyana, I. K., M. Ngga, and P. L. Y. Sapanca. 2014. The effect of seed soaking with Rhizobacteria *Pseudomonas alcaligenes* on the growth of swamp cabbage (*Ipomoeae repants* Poir). The 2nd International Joint Conference on Science and Technology 27 – 28 September 2017. Bali, Indonesia.
- Yamamoto, S., S. Shiraishi, Y. Kawagoe, M. Mochizuki, and S. Suzuki. 2015. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. *Pest Management Science*. 71: 722–727.
- Yu, G. Y., J. B. Sinclair, G. L. Hartman, and B. L. Bertagnolli. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 955–63.
- Zhao, P., P. Li, S. Wu, M. Zhou, R. Zhi, and H. Gao. 2019. Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested litchi fruits. *AMB Express*. 9: 119.
- Zhou, J. Y., X. Li, J. Y. Zheng, and C. C. Dai. 2016. Volatiles released by endophytic *Pseudomonas fluorescens* promoting the growth and volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 101: 132-140.