

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารทุติยภูมิ และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวของแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* S20A1

Optimal Conditions for Secondary Metabolites Production and Control Efficacy on Bacterial Blight Disease of Rice of *Bacillus amyloliquefaciens* S20A1

พัชรภรณ์ หอมกรุ่น¹ และ สุพจน์ กาเซ็ม¹
Patcharapon Homkrun¹ and Supot Kasem¹

บทคัดย่อ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* S20A1 ที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว ได้จึงได้นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิ พบว่าสารกรองเซลล์แบคทีเรีย (cell-free filtrate; CFF) ของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 ที่เลี้ยงในอาหาร half yeast extract peptone broth (half YPB) นาน 60 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Xoo*, *X. axonopodis* pv. *glycines* (Xag) และ *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) สร้างบริเวณยับยั้ง 37.82 mm 30.86 mm และ 34.68 mm ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร CFF ในการควบคุมแบคทีเรียสาเหตุโรค (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) อยู่ที่ 20% สำหรับแบคทีเรีย Xag Xcc ได้และ 10% สำหรับแบคทีเรีย Xoo การทดสอบประสิทธิภาพของสาร CFF ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีการพ่นสาร CFF หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคสามารถลดการเกิดโรคลงได้ดีที่สุด (68.56%) แสดงประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้เซลล์สด เซลล์แขวนลอย และสารเคมี gentamicin sulfate+copper hydroxychloride ชนิดอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปปรับใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์และสารทุติยภูมิของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) และสารกรองเซลล์แบคทีเรียที่ได้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืชพร้อมใช้ต่อไป

คำสำคัญ: โรคขอบใบแห้งของข้าว *Bacillus amyloliquefaciens* การควบคุมโรคโดยชีววิธี อาหารเลี้ยงเชื้อ สารทุติยภูมิ

Abstract

An antagonistic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* S20A1 isolated from rice rhizosphere performed the antagonistic activity chiefly by producing the effective secondary metabolites (SM) against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Maximum population and SM production of *B. amyloliquefaciens* S20A1 achieved when culture in half yeast extract peptone broth (half YPB) incubated for 60 hours on the rotary shaker with 150 rpm at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. CFF of *B. amyloliquefaciens* S20A1 capable to inhibits various plant pathogenic bacteria including Xoo, *X. axonopodis* pv. *glycines* (Xag) and *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) with 37.82 mm, 30.86 mm and 34.68 mm of inhibition zone respectively. MIC of CFF was 20% for Xag and Xcc and 10% for Xoo. Rice seedlings sprayed with 100% CFF after Xoo inoculation exhibited the best disease reduction (68.56%) which better than treated with fresh cell and cell suspension of

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

B. amyloliquefaciens S20A1 and chemical bactericide, gentamicin sulfate+copper hydroxychloride. Culture medium and conditions obtained from this study can be used for cell mass and SM production of *B. amyloliquefaciens* S20A1 by bioreactor Furthermore, this CFF can be an efficient eradicated agent to control the bacterial blight of rice, leading to the bio-bactericide production.

Keywords : bacterial blight of rice, *Bacillus amyloliquefaciens*, biocontrol, culture medium, secondary metabolites

คำนำ

ปัญหาการต้านทานสารเคมีของเชื้อสาเหตุโรคพืช มีสาเหตุมาจากการใช้สารเคมีอย่างไม่เหมาะสมของเกษตรกรและใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานาน (Lübbertstedt and Varshney, 2013) โดยเฉพาะแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เช่น *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว (Khan *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นโรคข้าวสำคัญที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อการผลิตข้าวทั่วโลก และยังสามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะกล้า แตกกอ ออกกรวง รวมถึงสามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ได้อีกด้วย (Wonni *et al.*, 2014) สำหรับประเทศไทย กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรปลูกข้าวพันธุ์ต้านทานเพื่อควบคุมโรคขอบใบแห้ง เช่น สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 และ กข 23 เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2552) การใช้สารเคมี เช่น 2014 พบว่าสาร copper hydroxide (Parthasarathy *et al.*, 2014) kanamycin sulfate และ streptomycin sulfate (Naqvi *et al.*, 2014) เป็นต้น แต่การจัดการโรคด้วยการใช้ข้าวพันธุ์ต้านทานและสารเคมียังมีข้อจำกัด เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคพืชมีความหลากหลาย และสามารถเกิดความต้านทานต่อสารเคมีได้ง่าย ดังนั้นการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี (biocontrol) โดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ (Gangwar, 2013) จึงเป็นวิธีการที่เกษตรกรให้ความสนใจกันมากขึ้น สามารถลดการใช้สารเคมี รักษาสมดุลสภาพแวดล้อม และเป็นแนวทางในการทำการเกษตรแบบยั่งยืน กลไกสำคัญในการควบคุมโรคของแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ การเจริญแข่งขันและการผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งสารทุติยภูมิประกอบด้วยสารหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเชื้อในสภาวะกดดัน เช่น สารปฏิชีวนะ สารพิษ รงควัตถุ และเอนไซม์ต่างๆ เป็นต้น (Herbert, 2012) ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตสารทุติยภูมิมีปัจจัยที่สำคัญหลายปัจจัย เช่น ชนิดและอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ระดับความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และอุณหภูมิ เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละชนิดจะมีการตอบสนองที่ต่างกัน (Davati *et al.*, 2013) การนำสารทุติยภูมิของแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มศักยภาพการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธีได้โดยตรง และแก้ปัญหาการมีชีวิตรอดของ แบคทีเรียปฏิปักษ์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารทุติยภูมิของแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* S20A1 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียและราสาเหตุโรคพืชได้หลายสายพันธุ์ (Homkrun *et al.*, 2016) ประสิทธิภาพและแนวทางการประยุกต์ใช้สารกรองเซลล์แบคทีเรียในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว เพื่อเป็นต้นแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ศึกษาชนิดอาหารและสภาวะที่เหมาะสม (ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ) ต่อการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิของแบคทีเรียปฏิบัณช์ *B.amyloliquefaciens* S20A1 (ศึกษาและยืนยันการเป็นแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีและอนุพันธุศาสตร์ (พัชรภรณ์, 2560) ด้วยวิธี One-Variable-At-A-Time (OVAT) (Singh *et al.*, 2014) คัดเลือกชนิดอาหารโดยเลี้ยงแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 ในอาหารต่างชนิด คือ nutrient broth (NB), Luria-Bertani broth (LB), tryptone yeast broth (TYB) และ yeast extract peptone broth (YPB) ปริมาตร 5 ml บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm นาน 12 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นเซลล์แขวนลอยตั้งต้นที่ 0.2 OD_{A600} ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารทดสอบชนิดเดิมปริมาตร 20 ml ในอัตราส่วน 1% v/v กรรณวิธีละ 3 ข้ำ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบอัตราการเพิ่มปริมาณของเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี plate count และเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 ml มาตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาทีที่สภาพอุณหภูมิ 4°C กรองส่วนใส (supernatant) ด้วย cellulose membrane (0.45 µm) นำสาร CFF ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xoo* ด้วยวิธี agar well diffusion (Beric *et al*, 2012) เลือกชนิดอาหารที่ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณเซลล์และสารทุติยภูมิได้ดีที่สุดมาปรับความเข้มข้นอาหารลง และปรับปริมาณอาหารเหลวทดสอบเป็น 100 ml สำหรับตรวจสอบอัตราการเพิ่มปริมาณของเซลล์แบคทีเรียและการผลิตสารทุติยภูมิที่อายุการเลี้ยง 60 72 84 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงเชื้อ คือ ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่ 150 และ 200 rpm ในสภาพอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิ 25±2 37 และ 40°C

ศึกษาขอบเขตการออกฤทธิ์และปริมาณความเข้มข้นสารต่ำสุดในการควบคุมแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่น ๆ โดยนำสาร CFF ของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 มาปรับระดับความเข้มข้นที่ 1-100% เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว *X. axonopodis* pv. *glycines* (Xag) สาเหตุโรคใบจุดของถั่วเหลืองและ *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคขอบใบทองของพืชตระกูลกะหล่ำสาเหตุโรคเป้าหมายด้วยวิธี agar well diffusion

ทดสอบประสิทธิภาพของสาร CFF ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในระดับโรงเรือนทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่พ่นใบด้วยสารทดสอบก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค และชุดการทดลองที่พ่นใบด้วยสารทดสอบหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค แต่ละชุดการทดลองมี 8 กรรณวิธี กรรณวิธีละ 5 ข้ำ พ่นใบด้วยสารทดสอบแต่ละชนิด ได้แก่ สาร CFF ที่ระดับความเข้มข้น (1)100% (2)75% และ (3)50% (4)เซลล์สด และ(5)เซลล์แขวนลอยที่ 0.2 OD_{A600} มีกรรณวิธีที่พ่นใบด้วย (6)สารเคมี gentamicin sulfate+copper hydroxychloride (2g/L) (7)น้ำกลั่นหนึ่งข้ำเชื้อ (positive control) และ (8)เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย *Xoo* เพียงอย่างเดียว (negative control) เป็นกรรณวิธีควบคุม พ่นสารทดสอบ 2 ครั้งห่างกัน 3 วัน ก่อนหรือหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 24 ชั่วโมงด้วยวิธีพ่นใบ ประเมินพื้นที่ใบเกิดโรค (percent of diseased leaf area) ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop (Adobe System Inc. Released 2016. Adobe Photoshop CC, Version 2017.01. San Jose, CA: Adobe System Inc.) หลังพ่นเชื้อครั้งที่ 2 ไปแล้ว 5 วัน นำข้อมูลความรุนแรงของโรคในแต่ละกรรณวิธีมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.)

ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อนำสาร CFF ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวต่างชนิดมาทดสอบ พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวต่างชนิดกันส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 อย่างชัดเจน โดยพบประชากรสูงสุดอยู่ที่ 2.94×10^9 cfu/ml ซึ่งตรวจนับได้จากอาหาร YPB และสาร CFF ที่ได้จากอาหารชนิดนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเป้าหมายได้กว้างถึง 20.04 mm รองลงมาคือ สาร CFF ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร TYB LB และ NB มีบริเวณยับยั้ง 17.12 13.09 และ 6.50 mm ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Effect of culture medium on bacterial population and secondary metabolites production.

Culture medium	Bacterial population (cfu/ml) ^{1/}	Inhibition zone (mm) ^{2/}
NB	1.67×10^8	6.50 ^d
LB	2.51×10^8	13.09 ^c
TYB	2.73×10^8	17.12 ^b
YPB	2.94×10^9	20.04 ^a

^{1/}Bacterial population was detected at 48h after incubation using plate count method.

^{2/}Inhibition zone obtained from average of diameter from three replications for each treatment. Data followed by the same letter are not significantly different ($P = 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

ในทุกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบนี้มีส่วนผสมหลักคือ peptone และ/หรือ yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สมบูรณ์ ประกอบไปด้วยคาร์บอน ไนโตรเจน กรดอมิโน แร่ธาตุ และวิตามินต่าง ๆ ที่สำคัญต่อการเจริญและความแข็งแรงของเซลล์แบคทีเรีย (Mezghanni *et al.*, 2012) มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างโคเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมตาบอลิซึม ส่งผลให้แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ดีขึ้น (Velu, 2013) แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของธาตุอาหารแตกต่างกัน ความเข้มข้นอาหารที่สูงเกินไป จะเร่งกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียทำให้มีการเจริญและตายอย่างรวดเร็ว (Frank, 2010) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อความเป็นกรด-ด่างของอาหารซึ่งเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ทำให้สภาพอาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิ (Elsayed *et al.*, 2014) จากการทดสอบปรับความเข้มข้นของอาหาร YPB ที่สามารถส่งเสริมการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 ได้ดีในเบื้องต้น พบว่าเมื่อปรับความเข้มข้นของ yeast extract เป็น 0.5% w/v และ peptone 1%w/v (half YPB) ประชากรแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น (2.15×10^{10} cfu/ml) และสาร CFF ที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารชนิดนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเป้าหมายได้ดีขึ้น (22.33 mm) (Table 2)

Table 2 Effect of YPB and modified mediums on bacterial population and secondary metabolites production.

Culture medium	Bacterial population (cfu/ml) ^{1/}	Inhibition zone (mm) ^{2/}
YPB (yeast extract 1% w/v, peptone 2% w/v)	2.77 x 10 ⁹	19.75 ^b
Half YPB (yeast extract 0.5% w/v, peptone 1% w/v)	2.15 x 10 ¹⁰	22.33 ^a
Modified yeast extract-PB (yeast extract 0.5% w/v, peptone 2% w/v)	1.91 x 10 ⁹	18.50 ^b
Modified peptone-YB (yeast extract 1% w/v, peptone 1% w/v)	1.65 x 10 ⁹	15.16 ^c

^{1/}Bacterial population was detected at 48h after incubation using plate count method.

^{2/}Inhibition zone obtained from average of diameter from three replications for each treatment. Data followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05) according to Duncan's multiple range test.

แบคทีเรียจะผลิตสารทุติยภูมิเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดและผลิตได้มากที่สุดในช่วงท้ายของระยะ stationary ซึ่งเป็นช่วงที่มีอัตราการเจริญสูงสุดและเริ่มมีอัตราการตายมากขึ้นเนื่องจากปริมาณสารอาหารถูกจำกัด (Al-Saraireh *et al.*, 2015) นอกจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแล้ว ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า และอุณหภูมิ ยังเป็นปัจจัยทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้แบคทีเรียผลิตสารทุติยภูมิ จากการทดสอบประสิทธิภาพของสาร CFF ที่เก็บจากระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน พบว่าสาร CFF ที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 ในอาหาร half YPB นาน 60 ชั่วโมงสามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเป่าหมายได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 35.63 mm (Table3) และประสิทธิภาพของสาร CFF มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่นานขึ้น ทำให้มีการสะสมของของเสียและสารพิษจากเซลล์เพิ่มสูงขึ้น รวมถึงคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ในการคงทนต่อแสง อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารทุติยภูมิที่เชื้อผลิตขึ้นด้วย (da Silvar *et al.*, 2012)

Table 3 Effect of incubation time on bacterial population and secondary metabolites production.

Incubation time (hour)	Bacterial population (cfu/ml) ^{1/}	Inhibition zone (mm) ^{2/}
60	4.05x10 ¹¹	35.63 ^a
72	2.04x10 ¹⁰	30.47 ^b
84	3.10x10 ⁸	29.19 ^c
96	1.12x10 ⁶	27.51 ^d

^{1/}Bacterial population was detected using plate count method.

^{2/}Inhibition zone obtained from average of diameter from three replications for each treatment. Data followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05) according to Duncan's multiple range test.

ในการเลี้ยงแบคทีเรียแบบเบตส์ (batch culture) บนเครื่องเขย่า ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่มีอยู่อย่างจำกัด ถูกควบคุมด้วยปริมาตรอาหารใน flask ซึ่งไม่ควรเกิน 25% ของปริมาตร flask เพื่อเพิ่มพื้นผิวสัมผัสอากาศกับอาหารเหลว และความเร็วรอบของเครื่องเขย่าช่วยให้ออกซิเจนละลายอยู่ในอาหารเหลว (dissolved oxygen; DO) แบคทีเรียจึงนำออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณเซลล์และการผลิตสารทุติยภูมิได้ (Tian *et al.*, 2016) ผลของการทดสอบเลี้ยงแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 ในอาหาร half YPB นาน 60 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 rpm พบว่าสาร CFF ที่ได้จากการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเป่าหมายได้ 36.91 mm ในขณะที่สาร CFF ที่ได้จากความเร็วรอบ 200 rpm ยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเป่าหมายได้เพียง 30.03 mm และจากข้อมูลจำนวนประชากรแบคทีเรีย พบว่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ประชากรแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 – 48 ชั่วโมง (Table 4) ซึ่งมีสาเหตุมาจากความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่ไม่เหมาะสม ทำให้แบคทีเรียเกิดสภาวะ oxidative stress ส่งผลต่อความมีชีวิตรอด และความสมบูรณ์ของเซลล์ทำให้ปริมาณสารทุติยภูมิที่ได้นั้นลดลงด้วย (Munna *et al.*, 2014)

Table 4 Effect of agitation speed on bacterial population and secondary metabolites production.

Incubation time	Bacterial population (cfu/ml) ^{1/}	
	150 rpm	200 rpm
0	ND ²	ND ²
12	2.86×10 ⁷	4.57×10 ⁸
24	8.50×10 ¹²	1.92×10 ¹³
36	1.42×10 ¹⁴	3.41×10 ¹⁵
48	1.85×10 ¹³	2.27×10 ¹¹
60	5.45×10 ¹⁰	3.07×10 ⁹
Inhibition zone (mm) ^{2/}	36.91 ^a	30.03 ^b

^{1/}Bacterial population was detected using plate count method. ND = null data.

^{2/}Inhibition zone obtained from average of diameter from three replications for each treatment. Data followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05) according to Duncan's multiple range test.

ผลการทดสอบการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 ในสภาพอุณหภูมิต่างกัน พบว่าแบคทีเรีย S20A1 สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์และผลิตสารทุติยภูมิได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C และสาร CFF ที่ได้จากช่วงเวลาดังกล่าวสามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเป่าหมายได้ 37.18 mm (Table 5) ซึ่งอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตและส่งสารออกนอกเซลล์ (Bajwa and Bishnoi, 2015) Monteiro *et al.* (2016) ได้ศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* 629 ที่อุณหภูมิต่างกันและพบว่าเชื้อสามารถผลิตสารทุติยภูมิออกมาได้แตกต่างกันแม้ว่าสารเหล่านี้นจะเป็นสารในกลุ่มเดียวกันก็ตาม

Table 5 Effect of incubation temperature on bacterial population and secondary metabolites production.

Incubation time	Bacterial population (cfu/ml) ^{1/}		
	25±2°C	37°C	40°C
0	ND ²	ND ²	ND ²
12	7.12×10 ⁷	7.23×10 ⁷	1.64×10 ⁸
24	2.03×10 ¹²	6.22×10 ¹⁰	6.45×10 ¹²
36	4.01×10 ¹⁴	5.67×10 ¹²	5.13×10 ¹³
48	1.52×10 ¹⁶	1.50×10 ¹⁴	2.20×10 ¹⁰
60	6.67×10 ¹⁰	6.12×10 ¹⁰	1.85×10 ⁸
Inhibition zone (mm) ^{2/}	37.18 ^a	35.22 ^b	25.97 ^c

^{1/}Bacterial population was detected using plate count method. ND = null data.

^{2/}Inhibition zone obtained from average of diameter from three replications for each treatment. Data followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05) according to Duncan's multiple range test.

การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร CFF ในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช พบว่าสาร CFF ที่ได้จากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้หลายสายพันธุ์โดยสาร CFF ที่ระดับความเข้มข้น 100% สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Xag* *Xcc* และ *Xoo* ได้ 34.86 30.86 และ 37.82 mm ตามลำดับ ค่า MIC สำหรับแบคทีเรีย *Xag* และ *Xcc* *Xoo* เท่ากับ 20% และ 10% สำหรับแบคทีเรีย *Xoo* มีบริเวณยับยั้ง 0.22 mm 0.31 mm และ 0.65 mm และ ตามลำดับ (Table 6)

Table 6 Effect of CFF at different concentration to inhibit various plant pathogenic bacteria.

CFF concentration (%)	Inhibition zone (mm) ^{1/}		
	<i>Xag</i>	<i>Xcc</i>	<i>Xoo</i>
100	30.86 ^a	34.68 ^a	37.82 ^a
90	28.69 ^b	28.95 ^b	36.97 ^a
80	25.90 ^c	28.30 ^b	35.38 ^a
70	23.74 ^c	26.11 ^c	34.77 ^a
60	21.51 ^d	24.86 ^c	32.66 ^a
50	19.14 ^e	19.21 ^d	31.58 ^a
40	10.24 ^f	12.82 ^e	26.14 ^b
30	7.85 ^f	8.17 ^f	22.61 ^c
20	0.22 ^g	0.31 ^g	10.84 ^d
10	0 ^g	0 ^g	0.65 ^e
1	0 ^g	0 ^g	0 ^f

^{1/}Inhibition zone obtained from average of diameter from three replications for each treatment. Data followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to Duncan's multiple range test.

การทดสอบประสิทธิภาพของสาร CFF ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับเรือนทดลองพบว่าการพ่นสาร CFF ที่ความเข้มข้น 100% และ 75% บนกล้าข้าวชาวดอกมะลิ 105 อายุ 30 วันหลังการปลูกแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวสามารถลดการเกิดโรคได้สูงสุด 68.56 และ 53.38% ตามลำดับ ในขณะที่การพ่นสาร CFF ที่ความเข้มข้น 100 และ 75% ก่อนการปลูกแบคทีเรียสาเหตุโรคนำมาลดการเกิดโรคได้ 62.05 และ 45.85% ตามลำดับ โดยสาร CFF ที่ศึกษามีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารเคมีที่ลดความรุนแรงของโรคได้เพียง 38.80 และ 50.03% เมื่อใช้พ่นหลังและก่อนการปลูกแบคทีเรียสาเหตุโรคเป้าหมายตามลำดับ สำหรับการใส่เซลล์สดและเซลล์แขวนลอยมีประสิทธิภาพดีเมื่อใช้ก่อนการปลูกแบคทีเรียสาเหตุโรคเป้าหมาย ลดการเกิดโรคได้ 72.12 และ 68% ตามลำดับ (Table 7 และ Figure 1) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเข้าทำลายของแบคทีเรียสาเหตุโรคเป้าหมายแล้ว การใช้สาร CFF จากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 สามารถควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีกว่าการใช้สารเคมี เซลล์สดและเซลล์แขวนลอย ซึ่งสารทุติยภูมิที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้ทันที (Chung *et al.*, 2015) ในขณะที่การใช้เซลล์สด และเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิกรณ์จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาและอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม แบคทีเรียปฏิกรณ์จะสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้เพียงพอ และผลิตสารทุติยภูมิออกมายับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเป้าหมาย ดังนั้นการใช้เซลล์สดและเซลล์แขวนลอยจึงเหมาะกับการใช้ในลักษณะของการป้องกันโรค ในขณะที่การใช้สาร CFF เหมาะกับการใช้ในลักษณะของการควบคุมการเกิดโรคมากกว่า (Zhang *et al.*, 2016)

Table 7 Percent of bacterial blight disease severity and disease reduction under greenhouse condition using different control treatments.

Foliar spray of treatment after Xoo inoculation			Foliar spray of treatment before Xoo inoculation		
Application treatment ^{1/}	%DS ^{2/}	%DR ^{3/}	Application treatment ^{1/}	%DS ^{2/}	%DR ^{3/}
100%CFF	27.14 ^a	68.56 ^b	100%CFF	32.58 ^c	53.38 ^b
75%CFF	32.78 ^d	62.05 ^c	75%CFF	39.11 ^c	45.85 ^c
50%CFF	40.90 ^c	52.68 ^d	50%CFF	46.67 ^b	37.12 ^c
fresh cell	43.33 ^c	49.87 ^e	fresh cell	16.34 ^d	72.12 ^a
Cell suspension	52.11 ^b	39.74 ^f	Cell suspension	19.91 ^d	68.00 ^a
Chemical agent	43.19 ^c	50.03 ^d	Chemical agent	45.22 ^b	38.80 ^c
Positive control	11.12 ^f	NA	Positive control	9.89 ^e	NA
Negative control	86.55 ^a	NA	Negative control	78.84 ^a	NA

^{1/} Application treatments were applied on 30 days-old rice seedlings. Gentamicin sulfate+copper hydroxychloride served as chemical agent (positive control). Negative control treatment was treated with suspension of Xoo only whereas the positive control treatment was treated with sterilized water only.

^{2/} %DS = (diseased leaf area/ total leaf area) × 100

^{3/} %DR = disease reduction calculated by compared with highest percent disease severity (%DS) of negative control. Data followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05) according to Duncan's multiple range test. NA = data was not analyzed.

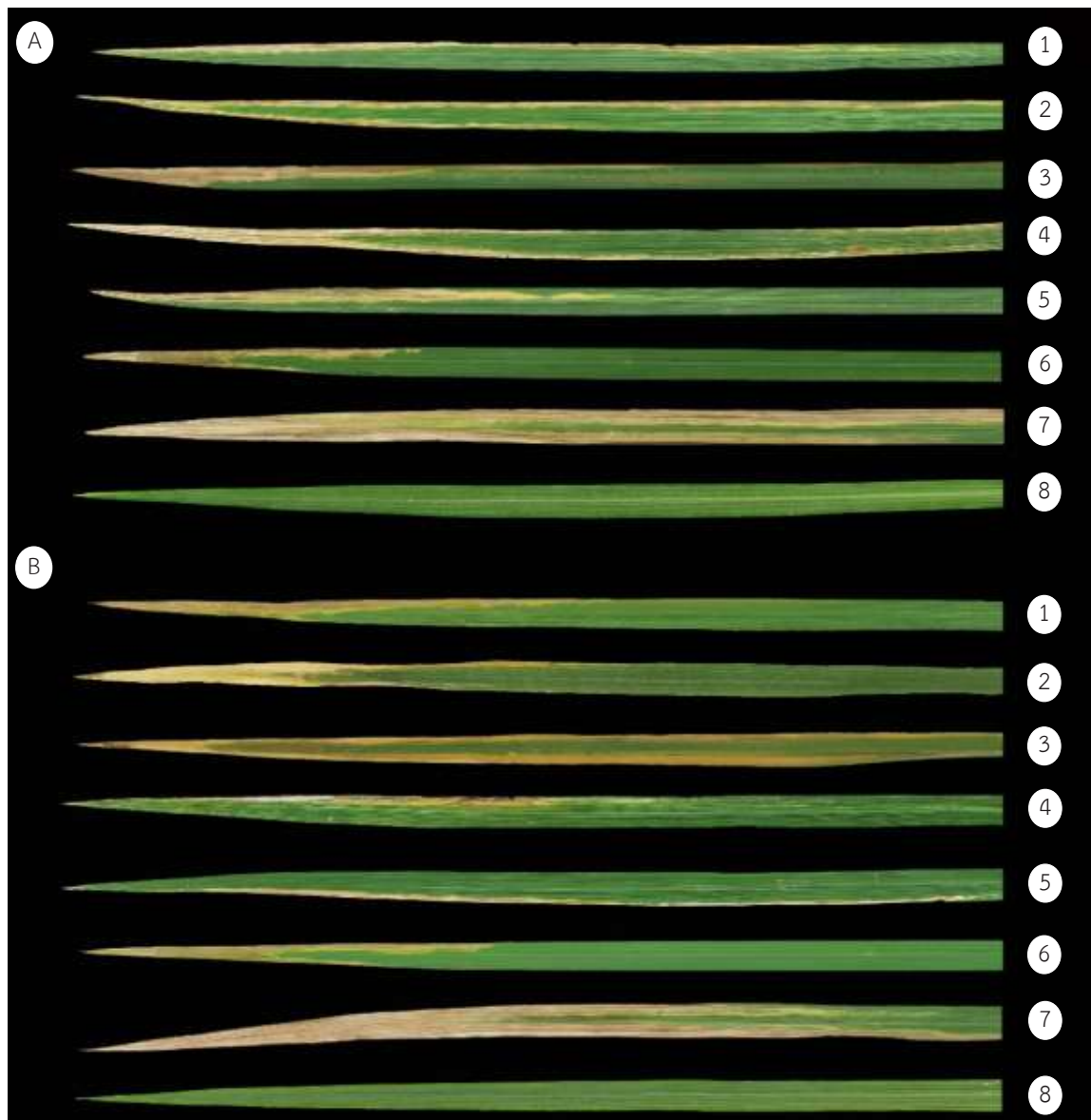


Figure 1 Efficacy of treatment applications to control bacterial blight disease under greenhouse condition; (1) 100% concentration of CFF (2) 75% concentration of CFF (3) 50% concentration of CFF (4) fresh cell (5) cell suspension (6) chemical agent (positive control) (7) negative control and (8) positive control, treatments were applied (A) after *Xoo* inoculation and (B) before *Xoo* inoculation.

สรุป

แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPB ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สมบูรณ์ ประกอบด้วย คาร์บอน ไนโตรเจน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญ ความแข็งแรงของเซลล์ และการผลิต

สารทุติยภูมิ เมื่อปรับความเข้มข้นส่วนของอาหารพบว่าอาหาร half YPB (yeast extract 0.5% w/v, peptone 1% w/v) สามารถชักนำให้แบคทีเรียทดสอบมีการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิเพิ่มมากขึ้น เมื่อเลี้ยงนาน 60 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ สาร CFF ที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S20A1 ในสภาวะข้างต้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในสกุล *Xanthomonas* ได้หลายสายพันธุ์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 100% สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Xag* *Xcc* และ *Xoo* ได้ 30.86 34.68 และ 37.82 mm ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร CFF ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้อยู่ที่ 20% สำหรับแบคทีเรีย *Xag* *Xcc* และ 10% สำหรับแบคทีเรีย *Xoo* ในระดับโรงเรือนทดลองพบว่าสาร CFF ที่ความเข้มข้น 100% และ 75% สามารถลดการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีกว่าการใช้เซลล์สด เซลล์แขวนลอย และสารเคมี เมื่อพ่นสารทดสอบ หลังการเข้าปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป้าหมาย สอดคล้องกับสมมติฐานเบื้องต้นว่าสารทุติยภูมิของแบคทีเรียปฏิปักษ์ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและควบคุมการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้เซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาและสภาพแวดล้อมในการเพิ่มปริมาณเซลล์เพื่อผลิตสารทุติยภูมิในสภาพธรรมชาติ งานวิจัยนี้สามารถแก้ปัญหาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์เมื่อใช้ควบคุมโรคในสภาพธรรมชาติ และส่งเสริมการควบคุมโรคโดยชีววิธีให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ผู้ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย ประเภททุนบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2560 ระดับปริญญาโท และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ผู้ให้การสนับสนุนสายพันธุ์แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สำหรับใช้ในงานวิจัยและงบประมาณงานวิจัยบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2552. ข่าวเตือนการระบาดของศัตรูพืชประจำสัปดาห์. แหล่งที่มา: <http://www.agriqua.doae.go.th/forecast/week/week52/240752bacleafblight/bacleafblight240752.html>, 15 ธันวาคม 2559.
- พัชราภรณ์ หอมกรุ่น. 2560. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารทุติยภูมิของแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับใช้ควบคุมแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Al-Saraireh, H., W. A. Al-Zereini and K. A. Tarawneh. 2015. Antimicrobial activity of secondary metabolites from a soil *Bacillus* sp. 7B1 isolated from South Al-Karak, Jordan. JJBS. 8(2): 127-132.
- Bajwa, K. and N. R. Bishnoi. 2015. Screening, characterization and optimization of lipase producing *Bacillus* sp. isolated from petroleum hydrocarbons contaminated site. J. Environ. Res. Develop. 10(2): 324-332.
- Beric, T., M. Kojic, S. Stankovic, L. Topisirovic, G. Degrassi, M. Myers, V. Venturi and D. Fira. 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. Food Technol. Biotechnol. 50(1): 25-31.
- Chung, E. J., M. T. Hossain, A. Khan, K. H. Kim, C. O. Jeon, and Y. R. Chung. 2015. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. Plant Pathol. J. 31(2):152-164.
- Davati, N., M. H. Najafi. 2013. Overproduction strategies for microbial secondary metabolites: a review. Life Sci. 3: 23-37.
- da Silvar, I. R., M. K. Martins, C. M. Carvalho, J. L. de Azevedo and R. E. de Lima Procópio. 2012. The effect of varying culture conditions on the production of antibiotics by *Streptomyces* spp., isolated from the Amazonian soil. Ferment. Technol. 1:1-5.
- Elsayed, A. E., N. Z. Othman, R. Malek, T. Tang and H. A. Enshasy. 2014. Improvement of cell mass production of *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC-B-02: a newly isolated probiotic strain from mother's milk. JAPS. 4(11): 8-14.

- Frank S. A. 2010. The trade-off between rate and yield in the design of microbial metabolism. *J. Evol. Biol.* 23: 609-613.
- Gangwar, G. P. 2013. Efficacy of bioagents application rate against bacterial leaf blight of rice. *Ann. Pl. Protec. Sci.* 21(1): 206-208.
- Herbert, R. B. 2012. *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Springer Science & Business Media, USA.
- Homkrun, P., A. Janseang and S. Kasem. 2016. Biological control activities of different antagonistic bacteria on suppressing various phytopathogenic pathogens. *In 6th KU-UT Student Symposium 2016 "Environmentally Friendly Agriculture and Food Innovative Technologies"*. Faculty of Agriculture, Kasetsart University. Bangkok.
- Khan, J. A., R. Siddiq, H. M. I. Arshad, H. S. Anwar, K. Saleem and F. F. Jamil. Chemical control of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pak. J. Phytopathol.* 24(2): 97-100.
- Lübbertedt, T. and R. Varshney. 2013. *Diagnostics in Plant Breeding*. Springer Science & Business Media. USA.
- Mezghanni, H., S. B. Khedher, S. Tounsi and N. Zouari. 2012. Medium optimization of antifungal activity production by *Bacillus amyloliquefaciens* using statistical experimental design. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 42(3): 267-78.
- Monteiro, F. P., F. H. V. de Medeiros, M. Ongena, L. Franzil P. E. de Souza and J. T. de Souza. 2016. Effect of temperature, pH and substrate composition on production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* 629. *Afr. J. Microbiol. Res.* 10(36): 1506-1512.
- Munna, S., S. Tamanna, R. Afrin, G. A. Sharif, C. Mazumder, K. S. Kana, N. J. Urmi, Aftab Uddin, T. Rahman. R. Noor. 2014. Influence of aeration speed on bacterial colony forming unit (CFU) formation capacity. *Am. J. Microbiol. Res.* 2(1): 47-51.
- Naqvi, S. A. H., R. Perveen and S. Chohan. 2015. Evaluation of virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* against rice genotypes. *Int. J. Agric. Biol.* 17(6): 1186-1192.
- Parthasarathy, R., J. Indira, A. Manikandan and A. Karthikeyan. 2014. To study the antagonistic organisms and new chemicals against the bacterial blight pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) of rice. *IJBB.* 4(1): 6-11.
- Singh, S., V. S. Moholkar and A. Goyal. 2014. Optimization of carboxymethylcellulase production from *Bacillus amyloliquefaciens* SS35. *3 Biotech.* 4(4): 411-424.
- Tian, Y., Y. Fan, J. Lu, X. Zhao and W. Chen. 2016. Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electron. J. Biotechnol.* 19: 41-49.
- Velu, R. K. 2013. *Microbiological Research in Agroecosystem Management*. Springer Science & Business Media. USA.
- Wonni, I., B. Cottyn, L. Determerman, S. Dao, L. Ouedraogo, S. Sarra, C. Tekete, S. Poussier, R. Corral, L. Triplett, O. Koita, R. Koebnik, J. Leach, B. Szurek, M. Maes and V. Verdier. 2014. Analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* population in Mali and Burkina Faso reveals a high level of genetic and pathogenic diversity. *Phytopathology.* 104(5): 520-531.
- Zhang, X., L. Li, S. Cheng and H. Cheng. 2016. Characterizing CMN1308, a Novel Strain of *Bacillus amyloliquefaciens*, for potential biological control application. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj. Napoca.* 44(1): 60-66.