

ผลของแมกนีเซียมร่วมกับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
Rigidoporus microporus สายพันธุ์ NK6 ในระดับห้องปฏิบัติการ

Effect of Magnesium and Antagonistic Bacteria *Bacillus subtilis* SM1 on Controlling
Rigidoporus microporus NK6 in Vitro

จุฑามาศ สังข์ทอง¹ และอัสชรา เพ็งหนู^{2*}

Jutamas Sangtong¹ and Ashara Pengnoo^{2*}

¹ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

²สาขาวิชานวัตกรรมเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110

¹Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900, Thailand

²Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, 90110, Thailand

*Corresponding author, e-mail: ashara.p@psu.ac.th

(Received: Oct 14, 2022; Revised: Jan 18, 2023; Accepted: Feb 23, 2023)

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันพบว่าพื้นที่ปลูกยางพาราภาคใต้ในประเทศไทยมีแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ต่ำกว่าระดับเหมาะสมความเข้มข้น 0.30 เซนติโมลประจุต่อกิโลกรัม แมกนีเซียมที่ไม่เพียงพอส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยางพาราและทำให้อ่อนแอต่อการเกิดโรครากขาวที่เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นการควบคุมโรคโดยชีววิธีที่มีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของแมกนีเซียมและแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ร่วมกับแมกนีเซียม และผลของแมกนีเซียมต่อการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญได้ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่มีแมกนีเซียม แต่พบว่าแมกนีเซียมที่ระดับ 0.3 และ 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร ทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยมีลักษณะผิดปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่มีแมกนีเซียม (ชุดควบคุม) การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ โดยวิธี dual culture พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ 75.29 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และร่วมกับแมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0.1-0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร ในอาหาร PDA พบว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับที่ไม่มีแมกนีเซียม (ชุดควบคุม)

คำสำคัญ : *Bacillus subtilis* *Rigidoporus microporus* แมกนีเซียม การควบคุมโรคโดยชีววิธี

Abstract

Nowadays, the exchangeable magnesium status, in rubber plantation areas in Southern Thailand, was mostly below the optimum range at 0.30 cmol_c kg⁻¹. Magnesium deficiency in soil has negative effects on plant growth process and sensitivity to plant disease infection by white root disease caused by *Rigidoporus microporus*. Biological control by using antagonistic bacteria such as *Bacillus* spp. has become an effective option for controlling plant disease. Therefore, this research aimed to study the effect of the antagonistic bacteria *B. subtilis* SM1 strain to prohibit *R. microporus* NK6 strain together with magnesium and its effect on growth of *R. microporus*. The result showed that, *R. microporus* NK6 strain was able to grow on potato dextrose agar (PDA) with magnesium but magnesium at concentrations of 0.3 and 0.5 cmol_c L⁻¹ occurred the change of mycelia morphology compared with no magnesium (control). *B. subtilis* SM1 strain was inhibited growth of *R. microporus* NK6 strain at 75.29 % by dual culture test for the antagonistic evaluation. Consequently, using *B. subtilis* SM1 strain combined with magnesium at

concentrations of 0.1 to 0.5 cmol $\cdot$ L $^{-1}$ in PDA exhibited significantly reduced the growth of *R. microporus* NK6 strain compared with no magnesium (control).

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Rigidoporus microporus*, Magnesium, Biological control

บทนำ

ในประเทศไทยเกษตรกรมีการใช้พื้นที่ปลูกยางพาราอย่างต่อเนื่อง ขาดการจัดการธาตุอาหารอย่างเหมาะสม โดยเฉพาะในช่วงราคายางพาราทดต่ำและราคาปุ๋ยที่ปรับตัวสูงขึ้น ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ไม่ใส่ปุ๋ยให้แก่ต้นยางพารา (Nualkaew *et al.*, 2013) โดยแมกนีเซียมเป็นธาตุอาหารรองที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของยางพารารวมทั้งมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน จากรายงานวิจัยพบว่า ดินปลูกยางพาราภาคใต้ในประเทศไทยมีปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 0.18 เซนติโมลประจุต่อกิโลกรัม ต่ำกว่าระดับเหมาะสมและความต้องการของยางพาราที่ต้องการแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มากกว่า 0.30 เซนติโมลประจุต่อกิโลกรัม (Kungpisdan *et al.*, 2013) จึงทำให้เกิดปัญหาต้นยางพาราชขาดแมกนีเซียมส่งผลต่อสุขภาพของต้นยางพาราทำให้อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรครากขาว (White root rot disease) สาเหตุจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ที่อาศัยอยู่ในดิน เชื้อราจะเข้าทำลายระบบรากของต้นยางพารา (Nandris *et al.*, 1987) ซึ่งระดับความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับความแข็งแรงตามธรรมชาติของต้นยางพารา พันธุ์ต้านทานสภาพภูมิอากาศ และการจัดการสวนยางของเกษตรกรที่เป็นปัจจัยในการส่งเสริมหรือจำกัดโรค เช่นเดียวกับต้นปาล์มน้ำมันที่ได้รับแมกนีเซียมต่ำกว่า 0.25 เซนติโมลประจุต่อกิโลกรัม ทำให้อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Ganoderma* spp. โรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน (Nur *et al.*, 2016) และมีรายงานว่า ต้นข้าวที่ได้รับแมกนีเซียม 0.02 เซนติโมลประจุต่อกิโลกรัม พบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าว แต่เมื่อต้นข้าวได้รับแมกนีเซียมเพิ่มเป็น 0.40 เซนติโมลประจุต่อกิโลกรัม กลับพบการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคที่ลดลง (Wiler *et al.*, 2015)

ในปัจจุบันการป้องกันกำจัดโรครากขาวของยางพารามีหลายวิธีทั้งวิธีกล การเกษตรกรรม รวมถึงการใช้สารเคมีที่ถือว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง (Ieamkheng & Harong, 2014) แต่อาจก่อปัญหาเนื่องจากสารเคมีที่ตกค้างในดินและส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมตามมา ทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological control) ที่มีประสิทธิภาพและไม่ก่ออันตราย ต่อสิ่งแวดล้อม โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นิยมใช้ เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยมีผลงานวิจัยมากมายที่เกี่ยวกับการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โรคโคนเน่าของมะเขือเทศ โรคกาบใบแห้งของข้าว และโรคใบไหม้ของมันฝรั่ง (Zohora *et al.*, 2016; Wiwattanapatapee *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020) โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีกลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคด้วยการสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ต่างๆ เช่น iturin, chitinase, cellulase, β -glucanase และ amylase (Zho *et al.*, 2020) ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะผิดปกติ ขนาดเส้นใยไม่สม่ำเสมอ บริเวณปลายเส้นใยโป่งพอง เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (Pholthaweechai & Pengnoo, 2021) และพบว่าที่บริเวณผนังเซลล์เป็นรู เกิดรอยย่นบริเวณพื้นผิวเซลล์ที่มีแบคทีเรียเกาะติดอยู่ เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Sungtong *et al.*, 2021) ยิ่งไปกว่านั้นแล้ว ยังพบว่า แมกนีเซียมมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการชีวเคมี เป็นตัวควบคุมโปรตีน ควบคุมความคงตัวของหุ้มเซลล์ (Demishtein *et al.*, 2019) และยังเป็นส่วนหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ chitinase (Jholapara *et al.*, 2013) และ proteases (Nisha & Divakaran, 2013) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแมกนีเซียมและแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาใช้วิธีการดังกล่าวในการทดสอบกับต้นยางพาราเพื่อควบคุมและป้องกันโรครากขาวของยางพาราต่อไป ซึ่งเป็นการจัดการโรคโดยไม่ใช้สารเคมีที่อาจตกค้างในสภาพแวดล้อมมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลของแมกนีเซียมและแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ภายในระดับห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1

นำเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สาเหตุโรครากขาวของยางพารา ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติ ภาคใต้ มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร Nutrient Agar (NA) เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปทำการทดสอบ

2. ทดสอบแมกนีเซียมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6

ทดสอบการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา และวางชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุบนอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม แมกนีเซียมในรูปของคิเซอไรต์ ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0 (ชุดควบคุม) 0.1 0.3 และ 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และบันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อรา จากนั้นตัดปลายเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เจริญบนอาหาร PDA เพิ่มแมกนีเซียม เพื่อไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา

3. ทดสอบเชื้อปฏิปักษ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 และแมกนีเซียมในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6

3.1 ทดสอบด้วยวิธีการ dual culture plate

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธีการ dual culture technique (Skidmore & Dickinson, 1976) บนอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียมในรูปของคิเซอไรต์ ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0 0.1 0.3 และ 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร โดยขีดเชื้อแบคทีเรียยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ลงบนอาหาร PDA ข้างต้น ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และในฝั่งตรงข้ามกันวางชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร สำหรับชุดควบคุมวางเฉพาะชิ้นวุ้นเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เช่นเดียวกัน การทดลองมีจำนวน 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ Percent Inhibition of Radial Growth (PIRG) ของเชื้อราสาเหตุ (Morton & Stroube, 1995) จากสูตร

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

R1 คือ ความยาวรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม

R2 คือ ความยาวรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราชุดทดสอบ

จากนั้นตัดปลายเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บริเวณที่ถูกยับยั้งด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา

3.2 ทดสอบด้วยวิธีการ Pour plate

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 เลี้ยงใน Potato Dextrose Broth (PDB) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสและส่วนที่ตกตะกอนออกจากกัน โดยใช้ส่วนที่ตกตะกอนเขย่ากับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้เข้ากัน เพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธีการ Pour plate โดยปิเปตเซลล์ของแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร PDA เพิ่มแมกนีเซียมในรูปของคิเซอไรต์ ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0 0.1 0.3 และ 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร เมื่ออาหารแข็งตัวนำชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางจุดกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ สำหรับชุดควบคุมวางชิ้นเชื้อราสาเหตุไว้

จุดกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เช่นเดียวกัน โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบและชุดควบคุม จากนั้นคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ จากสูตรข้อ 3.1

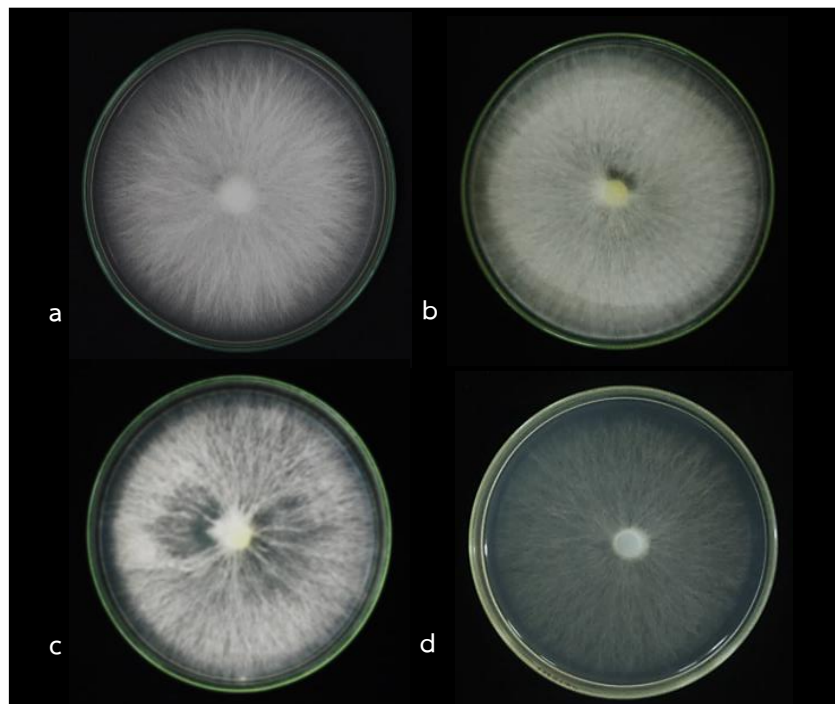
4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

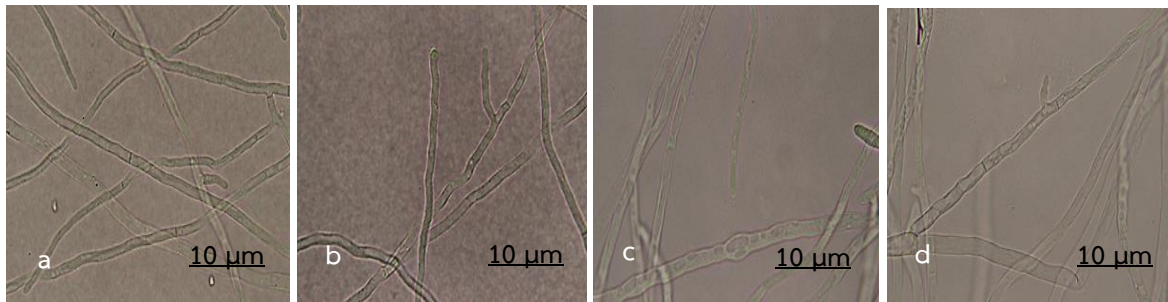
1. การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6

อาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียมทุกระดับความเข้มข้นทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญได้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบความแตกต่างของลักษณะเส้นใย (ภาพที่ 1) โดยพบว่าเส้นใยเชื้อราสาเหตุที่แมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจ่อลิตร (ภาพที่ 1b) มีความหนาแน่นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 1a) ขณะที่อาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม 0.3 เซนติโมลประจ่อลิตร ทำให้เส้นใยเชื้อราสาเหตุมีการเจริญผิดปกติ เส้นใยมีลักษณะหยาบ และขนาดไม่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 1c) และอาหาร PDA ผสมแมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจ่อลิตร เส้นใยมีขนาดเล็กและบาง (ภาพที่ 1d) เส้นใยเมื่อตรวจสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาพบว่า ในอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจ่อลิตร เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญงอกยาวได้ปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 2a และ b) ขณะที่อาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม 0.3 เซนติโมลประจ่อลิตร เส้นใยเชื้อราโป่งพอง และเกิดช่องว่างภายในเซลล์ (ภาพที่ 2c) และอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจ่อลิตร เส้นใยเชื้อรามีขนาดไม่สม่ำเสมอ และเกิดช่องว่างภายในเซลล์ (ภาพที่ 2d)



ภาพที่ 1 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียมที่อายุ 7 วัน

(a) ชุดควบคุมแมกนีเซียม 0 เซนติโมลประจ่อลิตร (b) แมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจ่อลิตร (c) แมกนีเซียม 0.3 เซนติโมลประจ่อลิตร และ (d) แมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจ่อลิตร



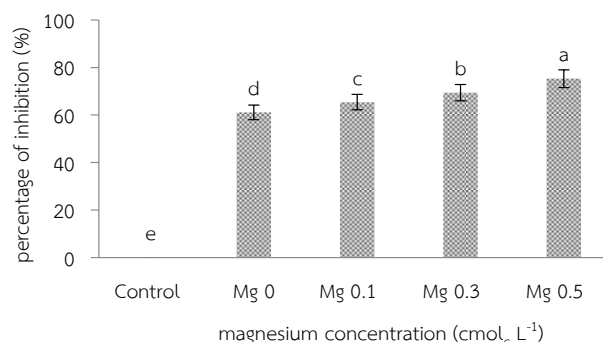
ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียมที่อายุ 7 วัน ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า (a) ชุดควบคุมแมกนีเซียม 0 เซนติโมลประจุต่อลิตร (b) แมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจุต่อลิตร (c) แมกนีเซียม 0.3 เซนติโมลประจุต่อลิตร และ (d) แมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร

2. ทดสอบเชื้อปฏิปักษ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 และแมกนีเซียมในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

2.1 ทดสอบด้วยวิธีการ dual culture plate

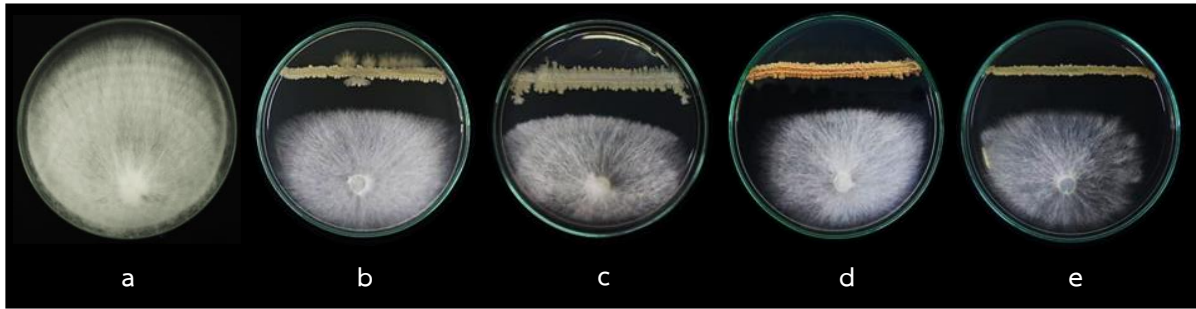
แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ดี 61.14-75.29 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3 และ 4) โดยเฉพาะอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุได้สูงสุด 75.29 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4e) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ระดับต่าง ๆ

บริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่ใกล้กับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 เส้นใยมีการอัดตัวกันแน่น และมีขนาดไม่สม่ำเสมอ เมื่อนำเส้นใยในอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม 0 เซนติโมลประจุต่อลิตร บริเวณที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียตรวจสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา เส้นใยเชื้อรามีลักษณะโป่งพองและเกิดช่องว่างภายในเซลล์ เช่นเดียวกับอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียมทุกระดับความเข้มข้นทำให้เส้นใยเชื้อราเกิดช่องว่างภายในเซลล์ และยังพบว่าที่แมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจุต่อลิตร เส้นใยมีขนาดไม่สม่ำเสมอ ในอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม 0.3 เซนติโมลประจุต่อลิตร และอาหาร PDA ที่ผสมแมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร เส้นใยมีลักษณะผิดปกติโป่งพองบริเวณปลายเส้นใย ซึ่งมีความแตกต่างกับชุดควบคุมที่เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญงอกยาวปกติ (ภาพที่ 5)

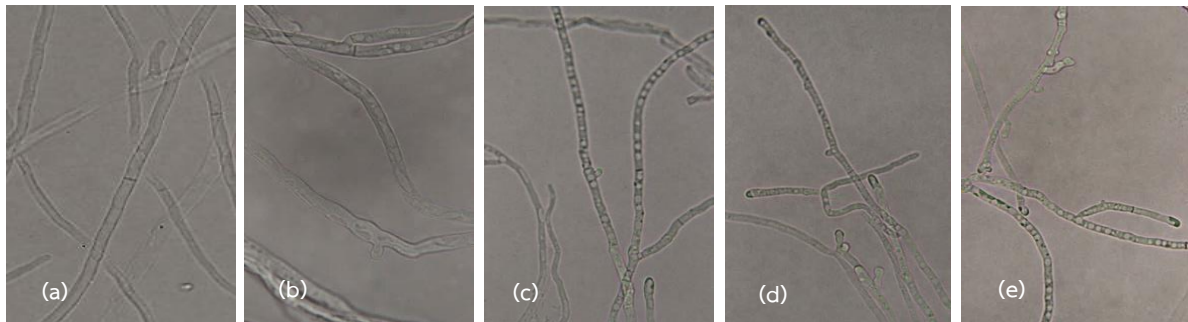


ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ในสภาวะแมกนีเซียมระดับต่าง ๆ ทดสอบด้วยวิธีการ Dual culture plate

หมายเหตุ : แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



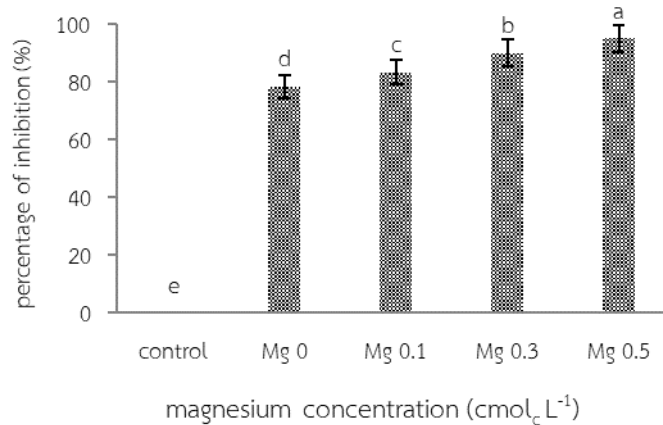
ภาพที่ 4 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ในอาหารผสมแมกนีเซียมระดับต่างๆ ที่อายุ 7 วัน (a) ชุดควบคุมแมกนีเซียม 0 เซนติโมลประจุต่อลิตร, (b) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0 เซนติโมลประจุต่อลิตร, (c) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจุต่อลิตร, (d) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.3 เซนติโมลประจุต่อลิตร และ (e) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร



ภาพที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 จากการทดสอบด้วยวิธีการ dual culture plate ในสภาวะแมกนีเซียมระดับต่างๆ ที่อายุ 7 วัน ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า (a) ชุดควบคุมแมกนีเซียม 0 เซนติโมลประจุต่อลิตร, (b) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0 เซนติโมลประจุต่อลิตร, (c) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจุต่อลิตร, (d) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.3 เซนติโมลประจุต่อลิตร และ (e) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร

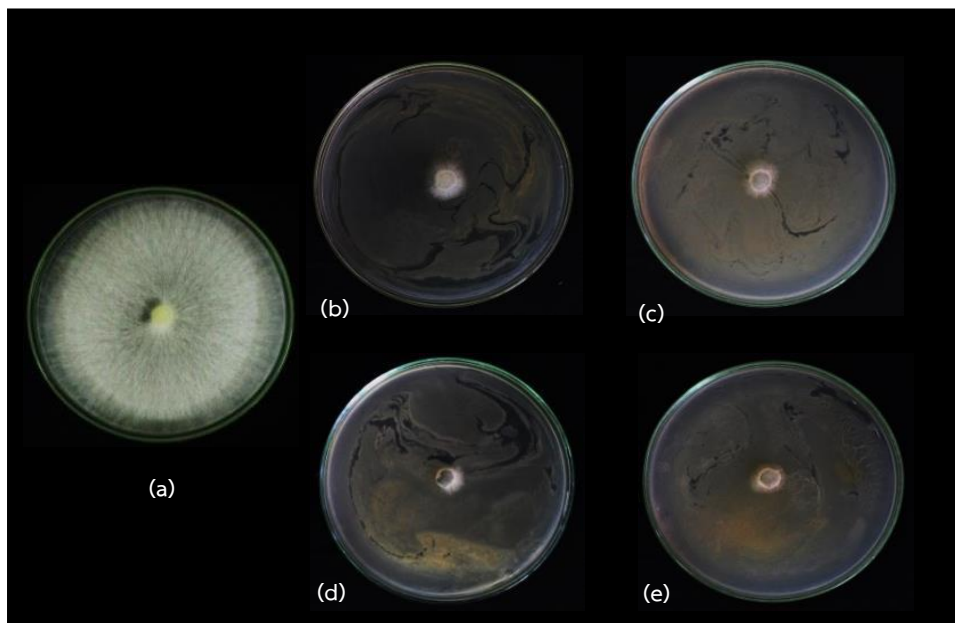
2.2 ทดสอบด้วยวิธีการ pour plate

เซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ 78.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6) และในอาหาร PDA เพิ่มแมกนีเซียม 0.1 0.3 และ 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร เซลล์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ 88.33 90.00 และ 95.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เจริญร่วมกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 มีเส้นใยที่เล็กและบาง (ภาพที่ 7) โดยพบว่าในอาหาร PDA เพิ่มแมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้สูงที่สุดที่ 95 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ระดับต่าง ๆ



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ในสภาวะที่มีแมกนีเซียมระดับต่างๆ ทดสอบด้วยวิธีการ pour plate

หมายเหตุ : แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ในสภาวะแมกนีเซียมระดับต่างๆ ที่อายุ 7 วัน (a) ชุดควบคุม (*B. subtilis* + ไม่มีแมกนีเซียม), (b) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0 เซนติโมลประจุต่อลิตร, (c) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจุต่อลิตร, (d) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.3 เซนติโมลประจุต่อลิตร และ (e) *B. subtilis* + *R. microporus* + แมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร

อภิปรายผลการวิจัย

แมกนีเซียมเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการดำเนินกิจกรรมของพืช และสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมถึงจุลินทรีย์ในดิน โดยเมื่อมีการเพิ่มแมกนีเซียม 0.1 เซนติโมลประจุต่อลิตร เชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญได้ดี (ภาพที่ 1) โดยลักษณะเส้นใยไม่แตกต่างกับการไม่เพิ่มแมกนีเซียม (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ที่เจริญเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มแมกนีเซียมซัลเฟต (Najwa, 2013) เนื่องจาก

แมกนีเซียมเป็นแหล่งเกลือแร่ของจุลินทรีย์ซึ่งมีความสำคัญมากในกระบวนการชีวเคมี เป็นตัวควบคุมโปรตีน ควบคุมความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (Demishtein *et al.*, 2019) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแมกนีเซียมที่ระดับ 0.3-0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร ทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 มีลักษณะผิดปกติ โป่งพอง เกิดช่องว่างภายในเซลล์ และมีขนาดไม่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 2) เช่นเดียวกับกับเชื้อรา *Arbuscular mycorrhiza* ที่สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 มิลลิโมลาร์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแมกนีเซียมที่ระดับ 2.0 มิลลิโมลาร์ การเจริญของเชื้อราลดลง (Zhang *et al.*, 2015) ความเข้มข้นของแมกนีเซียมมีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมที่มากหรือน้อยเกินไปเป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Rosenstock *et al.*, 2016)

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ โรคกาบใบแห้งของข้าว และโรคใบไหม้ของมันฝรั่ง (Zohora *et al.*, 2016; Wiwattanapatapee *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020) โดยแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าของยางพาราได้ดีทั้งในวิธีการ Dual culture plate และ Pour plate โดยที่ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ทำให้เส้นใย *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 มีลักษณะผิดปกติโป่งพอง (ภาพที่ 5b) สอดคล้องกับการศึกษาของ Sungtong *et al.*, (2021) และ Pholthaweechai & Pengnoo (2021) ซึ่งกลไกการยับยั้งนี้อาจเนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น Iturin, Chitinase, Cellulase, β -glucanase และ Amylase (Zho *et al.*, 2020) ทั้งนี้ในอาหารที่มีแมกนีเซียมการยับยั้ง *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 เพิ่มขึ้น 10-16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามความเข้มข้นของแมกนีเซียม โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้ง *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้สูงสุด 95.00 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับแมกนีเซียม 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร (ภาพที่ 3)

สรุปผลการวิจัย

ปริมาณแมกนีเซียมตั้งแต่ 0.3 เซนติโมลประจุต่อลิตร ทำให้เส้นใย *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากขาวของยางพาราลดลง เส้นใยมีลักษณะผิดปกติ โดยการเจริญและลักษณะผิดปกติของเส้นใย *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแมกนีเซียม การใช้แมกนีเซียม 0.1-0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 เท่ากับ 10.00-16.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใช้แมกนีเซียม โดยการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ร่วมกับแมกนีเซียมที่ระดับ 0.5 เซนติโมลประจุต่อลิตร สามารถยับยั้ง *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้สูงสุด 95.00 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

ผลที่ได้จากการทดลองนี้เป็นประโยชน์สำหรับการป้องกันและควบคุมโรครากเน่าของยางพาราและการจัดการแมกนีเซียมในดินที่ปลูกยางพาราต่อไป รวมทั้งควรทดสอบในสภาพโรงเรือนและศึกษาผลของธาตุอาหารอื่น ๆ เพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการการควบคุมโรครากขาวของยางพาราโดยชีววิธีร่วมกับการจัดการดิน ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และภาควิชาวนวัตกรรมและการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

- Demishtein, K., Reifen, R. & Shemesh, M. (2019). Antimicrobial properties of magnesium open opportunities to develop healthier food. *Nutrients*, 11(10), 1-8.
- leamkheng S. & Hoarong, M. (2014). Control of *Rigidoporus lignosus* causing of white root disease in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). *Khon Kaen Agricultural Journal*, 42(3), 686-692. (in Thai)
- Jholapara, R. J., Mehta, R.S., Bhagwat, A. S., & Sawant, C. S. (2013). Exploring and optimizing the potential of chitinase production by isolated *Bacillus* spp. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 412-418.

- Kungpisdan, N., Rattanachot, M., Permkrasin, P., Kiwrum, T., Chunamporn, L. & Thongphu, A.(2013). *Development of Technology on Nutrition Management of Rubber*, Rubber Research Institute. Bangkok: Department of Agriculture. (in Thai)
- Morton, D. J. & Stroube, W. H. (1955). Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol*, 45(8), 417-420.
- Najwa, M. J .A. (2013). Response of some fungal species to the effect of copper, magnesium and zinc under the laboratory condition. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 535-540.
- Nandris, D., Nicole, M. & Geiger, J. P. (1987). Root rot disease of rubber trees. *Plant Disease*, 71(4), 298-306.
- Nisha, N.s., & Divakaran, J. (2014). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus subtilis* NS isolated from sea water. *African Journal of Biotechnology*, 13(16), 1707-1713.
- Nuakaw, H., Poonpakdee, C., Kaewmano, C. & Onthong, J. (2013). Fertilizer usage and soil management approach of rubber plantation in lowland and upland areas in Songkhla Province. *Journal of Yala Rajabhat University*, 8(2), 146-159. (in Thai)
- Nur, S. T., Mohamed, M. H., Abu, S. I., & Siva, K. B. (2016). Determination and mapping of calcium and magnesium contents using geostatistical techniques in oil palm plantation related to basal stem rot disease. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 38(1), 23-30.
- Pholthaweechai, U. & Pengnoo, A. (2021). Effect of nitrogen and *Bacillus subtilis* SM1 strain on controlling *Rigidoporus microporus* NK6 strain the cause of white root rot disease *In vitro* testing. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 8(1), 44-49. (in Thai)
- Rosenstock, N. P., Berner, C., Smits, M. M., Kram, P., & Wallander, H. (2016). The role of phosphorus, magnesium and potassium availability in soil fungal exploration of mineral nutrient sources in Norway spruce forests. *New Phytologist*, 554-567.
- Skidmore, A. M. & Dickinson, C. H. (1976). Colony interaction and interference between *Septoria nodorum* and *phylloplane* fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66, 57-64.
- Sungton, S., Pengnoo, A. & Boonyapipat, P. (2021). Efficacy of *Bacillus* spp. in controlling soilborne pathogen *Rigidoporus microporus* under control conditions. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 8(1), 34-43. (in Thai)
- Wiler, R. M., Wilka, M. S. B., Jonas, A. R., Daniel D., Clistenes, W. A N., & Fabricio A. R. (2015). Magnesium-induced alterations in the photosynthetic performance and resistance of rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. *Scientia Agricola*, 72, 328-333.
- Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A., & Kanjanamaneesathian, M. (2013). Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium*-alginate microcapsules for control of rice sheath blight disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1487-1497.
- Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., et al. (2020). Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-12.
- Zhang, F., Du, P., Song, C. & Wu, Q. (2015). Alleviation of magnesium deficiency by mycorrhiza in trifoliate orange: Changes in physiological activity. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(10), 763-769.
- Zho, J., Tan, T., Shen, A., Yang, X., Yu, Y., Gao, C., et al. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *Journal of Plant Pathology*, 102, 433-441.
- Zohora, U. S., Ano, T., & Rahman, M. S. (2016). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin a producer *Bacillus subtilis* RB14 seed treatment in tomato plants. *Advances in Microbiology*, 6, 424-431.