

ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อราในดิน *Rigidoporus microporus* ภายใต้สภาพควบคุม

Efficacy of *Bacillus* spp. in Controlling Soilborne Pathogen *Rigidoporus microporus* under Control Conditions

ศุภรัตน์ สังข์ทอง^{1,2,3} อัจฉรา เพ็งหนู^{1,2,3} และ ภวิกา บุญยพิพัฒน์^{4*}
Sungtong, S.,^{1,2,3} Pengnoo, A.^{1,2,3} and Boonyapipat, P.^{4*}

¹ สาขาวิชานวัตกรรมและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110

² Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, 90110

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900
⁴ Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900, Thailand

³ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติ ภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110

³ Natural Biological Control Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, 90110

⁴ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา สงขลา 90000

⁴ Faculty of Agricultural Technology, Songkhla Rajabhat University, Songkhla, 90000

* Corresponding author: pawika.bo@skru.ac.th

Received 15 March 2021; Revised 11 May 2021; Accepted 28 May 2021

บทคัดย่อ

Rigidoporus microporus เป็นเชื้อราในดินที่ก่อให้เกิดโรครากขาวในยางพาราและเป็นปัญหาสำคัญของประเทศผู้ผลิตยางทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย เพื่อลดการใช้สารกำจัดราในดิน จึงจำเป็นต้องใช้การป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธี ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา โดยนำแบคทีเรียจำนวน 44 ไอโซเลท ทดสอบด้วยวิธี dual culture plate ซึ่งการทดลองมี 4 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ 66.43 และ 54.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์มีลักษณะผิดปกติ เช่นเดียวกับลักษณะจุลสัณฐานภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่ผนังเซลล์เส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* เป็นรู เกิดรอยย่นบนพื้นผิวบริเวณที่เซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เกาะติดอยู่ เมื่อนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 ที่ความเข้มข้น 10^4 , 10^5 และ 10^6 cfu/ml มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และสารระเหยยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 80.56 และ 30.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: *Bacillus* spp., *Rigidoporus microporus*, การควบคุมโรคโดยชีววิธี

Abstract

Soilborne fungus, *Rigidoporus microporus* causing white root rot disease is one of the important problems in rubber producing countries including Thailand. To reduce the fungicide use, therefore, biological control is needed to control the disease. *Bacillus* species show broad-spectrum antimicrobial activity and have been widely used as agricultural biocontrol agents. This study aimed to screen *Bacillus* spp. which were effective in inhibiting *R. microporus*. *Bacillus* spp. of 44 isolates were tested for their suppressive ability against *R. microporus* using dual culture plate technique with four replications. The results indicated that isolates SM1 and LPDD3-2 of *Bacillus* spp. were effective in controlling *R. microporus* with the rates of 66.43 and 54.29 percent, respectively. Mycelial deformity of *R. microporus* which was observed by microscopy and SEM confirmed the pored and wrinkle mycelia when the bacteria attached on the surface. Isolates SM1 and LPDD3-2 were taken at concentrations of 10^4 , 10^5 and 10^6 cfu/ml, to test for their efficacy against *R. microporus*. At the concentration of 10^6 cfu/ml, antagonistic substances and volatile compounds of isolate SM1 inhibited mycelial growth of *R. microporus* with the rates of 66.43 and 54.29 percent, respectively.

Keywords: *Bacillus* spp., *Rigidoporus microporus*, biological control

บทนำ

Rigidoporus microporus เชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน และสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราเนื่องจากเชื้อชนิดนี้เข้าทำลายยางพาราได้ทุกช่วงการเจริญเติบโต โดยใช้เส้นใยแทงเข้าสู่ผนังเซลล์จนถึงชั้น middle lamella แล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาออกเซลล์ทำลายเนื้อเยื่อราก ทำให้รากไม่สามารถดูดน้ำและธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของต้นได้ ปริมาณน้ำยางลดลง ใบยางเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ร่วงจนหมดต้น บริเวณรากเห็นเป็นเส้นใยสีขาวแผ่ปกคลุมไปทั่วผิวราก เมื่อเส้นใยแก่จะนุ่มกลม สีเหลืองซีด เนื้อไม้ของรากที่เป็นโรคในระยะแรกแข็งกระด้าง สีน้ำตาลซีด ในระยะรุนแรงกลายเป็นสีครีม ถ้าอยู่ในที่ชื้นแฉะจะอ่อนนุ่ม การป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรครากขาวสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ปลูกยางในพื้นที่ปลอดโรค ขุดคูล้อมรอบบริเวณต้นที่เป็นโรค เพื่อกันระหว่างต้นที่เป็นโรคและต้นที่ไม่เป็นโรคป้องกันการสัมผัสกันของราก และการควบคุมเชื้อราก่อโรคด้วยสารเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมเนื่องจากใช้ได้ง่ายและเห็นผลเร็ว จึงทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ซึ่งเกษตรกรมักใช้ไม่ถูกวิธีหรือใช้มากเกินไปจนเกิดความจำเป็นต่อเนื่องเป็นระยะเวลาอันก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ และอากาศ การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากขาวได้หลายชนิด เช่น โรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (Pengnoo et al., 2006) โรคกาบใบแห้งของข้าว (Kanajanamaneesathian et al., 1998, Pengnoo et al., 2000, Chumthong et al., 2008, Wiwattanapatapee et al., 2013) รวมทั้งโรครากเน่าและใบจุดของผักสลัดไฮโดรโปนิคส์ (Rotniam et al., 2008) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งเป็นการนำจุลินทรีย์ดินมาใช้ประโยชน์ เพื่อการควบคุมโรครากขาวของยางพารา และเป็นทางเลือกการใช้สารเคมีที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในดินได้

วัตถุประสงค์ และวิธีการ

1. การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพสูงในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. microporus*

คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติ และที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคใต้ จำนวน 44 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate (Skidmore and Dickinson, 1976) บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยขีดเชื้อแบคทีเรียยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ลงบนอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และในแนวตรงข้ามกันวางชิ้นส่วนของเชื้อรา *R. microporus* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร โดยวางห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อเข้ามา 2 เซนติเมตร สำหรับชุดควบคุมวางเฉพาะชิ้นส่วนของเชื้อรา *R. microporus* ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เช่นเดียวกัน นำจานทดสอบบ่มที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกแบคทีเรีย ไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคได้สูงสุด 3 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

ด้วยวิธี dual culture plate อีกครั้ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ประกอบด้วยแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้และชุดควบคุม บันทึกผลโดยวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เวลา 3, 5, 7, 9 และ 12 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* (Morton and Stroube, 1995) จากสูตร

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

R1 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม
R2 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีเส้นใยเชื้อราชุดทดสอบ

นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan New's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* ที่เจริญร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี dual culture plate ที่ให้ผลการยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคได้ดีจำนวน 2 ไอโซเลท ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2. ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี pour plate

นำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพจำนวน 2 ไอโซเลท เลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพจำนวน 2 ไอโซเลท เจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10^4 , 10^5 และ 10^6 cfu/ml แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี pour plate โดยปิเปตเชื้อ 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร PDA จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *R. microporus* วางกึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมเชื้อแบคทีเรีย สำหรับชุดควบคุมวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *R. microporus* ไว้กึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อ PDA เช่นเดียวกัน จากนั้นนำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ คือ แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพจำนวน 2 ไอโซเลท และชุดควบคุม บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่เวลา 7 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* เช่นเดียวกับสูตรข้อที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan New's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี agar well diffusion

ทำการเจาะอาหาร PDA ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 จุด โดยเจาะห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ทั้ง 4 ด้าน จากนั้นปิเปตเซลล์ที่ความเข้มข้น 10^4 , 10^5 และ 10^6 cfu/ml ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพจำนวน 2 ไอโซเลท ใส่หลุมละ 0.05 มิลลิลิตร แล้วเจาะชิ้นอาหารที่มีเชื้อรา *R. microporus* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับชุดควบคุมทำเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท แต่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแทนเซลล์ของแบคทีเรีย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ คือ แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพจำนวน 2 ไอโซเลท และชุดควบคุม บันทึกลงผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่เวลา 4 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* จากสูตรข้อที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. ทดสอบประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus*

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* ด้วยวิธี paired petridish technique (Gagne et al., 1991) โดยปิเปตเซลล์ที่ความเข้มข้น 10^4 , 10^5 และ 10^6 cfu/ml ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพจำนวน 2 ไอโซเลท ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร PDA จากนั้นประกบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *R. microsporus* โดยให้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *R. microsporus* อยู่ด้านบน แล้วพันประกบคู่จานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ด้วยพาราฟิล์ม ส่วนชุดควบคุมทำเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท แต่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแทนเซลล์ของแบคทีเรีย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ คือ แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพจำนวน 2 ไอโซเลท และชุดควบคุม บันทึกลงผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่เวลา 4 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* จากสูตรข้อที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพสูงในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. microsporus*

จากการนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 44 ไอโซเลท ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. microsporus* สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้เพียง 3 ไอโซเลท (SM1, LPDD3-2 และ PT7) ที่ยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* ได้มากกว่า 51 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลททดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งด้วยวิธี dual culture plate อีกครั้งพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งเชื้อ

รา *R. microsporus* ได้ดีตลอดช่วงเวลาที่ทดสอบ โดยเฉพาะที่เวลา 7 วัน สามารถยับยั้งเชื้อราได้เฉลี่ย 66.43 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท LPDD3-2 ที่ยับยั้งเชื้อราได้เฉลี่ย 54.29 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1) โดยทำให้ปลายเส้นใยเชื้อราก่อโรคมักมีลักษณะอัดตัวกันแน่น ไม่สามารถเจริญผ่านแนวของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้ (Figure 2) ในขณะที่แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท PT7 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ต่ำของช่วงเวลาที่ทดสอบและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ (Figure 1) จึงคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สำหรับการทดสอบในขั้นตอนถัดไป เมื่อนำเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลท ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่า เส้นใยของเชื้อรา *R. microsporus* บิดเบี้ยว และกุดตัวลง ในขณะที่ชุดควบคุมปลายเส้นใยงอกยาวเป็นปกติ (Figure 3) และผลการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่เวลา 3 วัน พบมีเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เกาะติดบริเวณรอบๆ ผิวเส้นใยเชื้อราก่อโรค และเกิดรอยย่นของพื้นผิวเส้นใยเล็กน้อย (Figure 4 (B) and (E)) ส่วนที่เวลา 5 วัน เส้นใยเริ่มมีลักษณะฝ่อ เกิดรอยย่นบนพื้นผิว และเส้นใยมีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 4 (C) and (F)) ในขณะที่เวลา 7 วัน แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มีการเกาะบริเวณผิวเส้นใยของเชื้อราก่อโรค ทำให้เส้นใยฝ่อ เกิดรอยย่นบนพื้นผิว เป็นรู และมีลักษณะผิดปกติอย่างชัดเจน (Figure 4 (D) and (G))

2. ประสิทธิภาพเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* ด้วยวิธี pour plate

ผลการทดสอบเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 ที่ความเข้มข้น 10^4 , 10^5 และ 10^6 cfu/ml พบว่า เซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* ได้ถึง 80.56 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท LPDD3-2 สามารถยับยั้งได้ 73.33 เปอร์เซ็นต์ (Figure 5) โดยทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* ที่เจริญร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 มีเส้นใยที่บางและเจริญได้น้อยกว่าเส้นใยเชื้อราก่อโรคที่เจริญร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท LPDD3-2 (Figure 6) ยิ่งกว่านั้นแล้วแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลท ทำให้เส้นใยเชื้อราก่อโรคมักมีลักษณะบิดเบี้ยว และกุดตัวลงเมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (Figure 7)

Table 1 Screening of the effective antagonistic bacteria from 44 isolates of *Bacillus* spp. inhibiting mycelial growth of *R. microsporus*

Inhibition (%)	Number of isolates	Antagonist bacterial isolate (isolate)						
0-25	21	LPDD10-1	LPDD9-13	LPDD9-12	LPDD9-6	BS171	LPDD3-3	PBDC2-2
		RN1-5	RN5-6	RN5-7	NMD3-2	NMD4-3	PBDD3-4	PBDE2-1
		NMD6-1	NMD6-3	NMD6-5	NMD9-2	NMD9-3	PLMD1-2	NHE10-1
26-50	20	ROS2	LAR3	RN 1-3	LPDD9-9	LPDD9-17	TRF	NSR.89-24
		LPDD10-3	RN 1-2	PBDE2-7	RN 5-4	NMD5-1	LAR1	LPDD10-4
		NDD2-2	PLMD4-2	PLMD4-3	PBDD3-3	PLDD5-1	LAR2	
51-75	3	SM1	PT7	LPDD3-2				

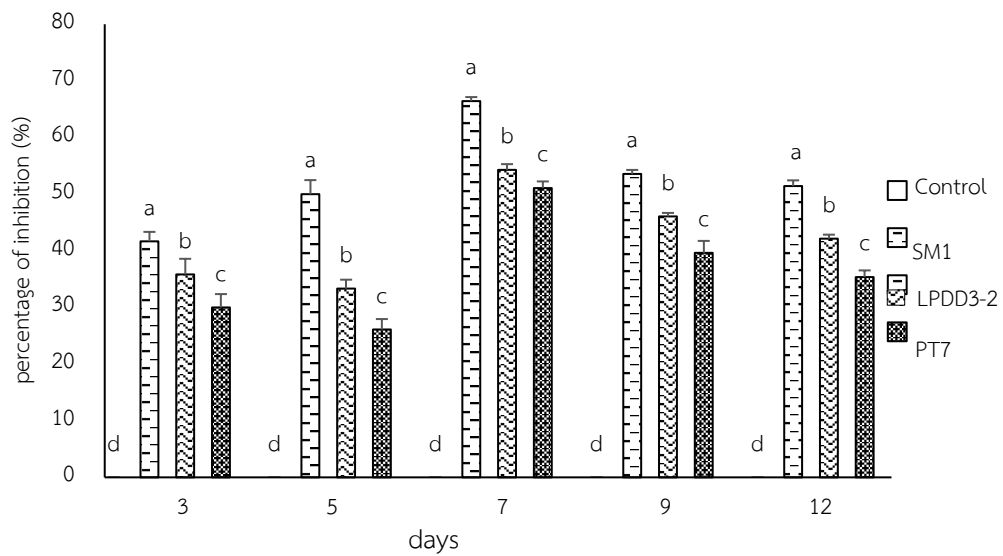


Figure 1 Inhibition of mycelial growth (%) of *R. microporus* by *Bacillus* spp. (SM1, LPDD3-2 and PT7) by dual culture plate technique after 3, 5, 7, 9 and 12 days at room temperature and natural light

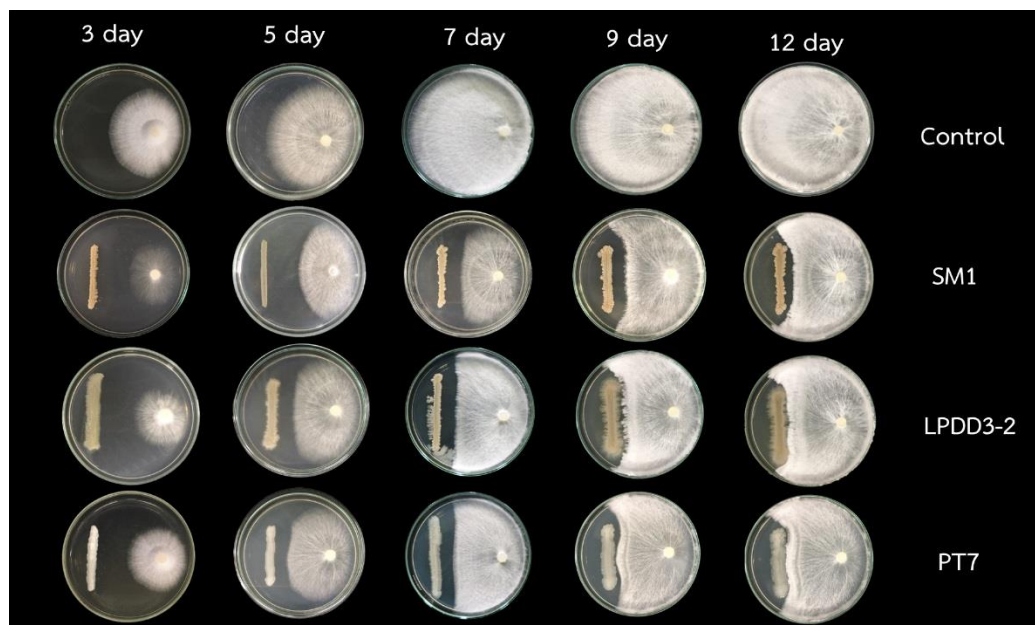


Figure 2 Reaction of the three selected *Bacillus* spp. (SM1, LPDD3-2 and PT7) against *R. microporus* by dual culture plate technique for 3, 5, 7, 9 and 12 days at room temperature and natural light



Figure 3 Morphological characteristics of *R. microporus* mycelia by dual culture plate technique for 7 days, control (A) *R. microporus* + *Bacillus* sp. isolate SM1 (B) and *R. microporus* + *Bacillus* sp. isolate LPDD3-2 (C), scales bar 10 μ m under compound microscope (100 \times)

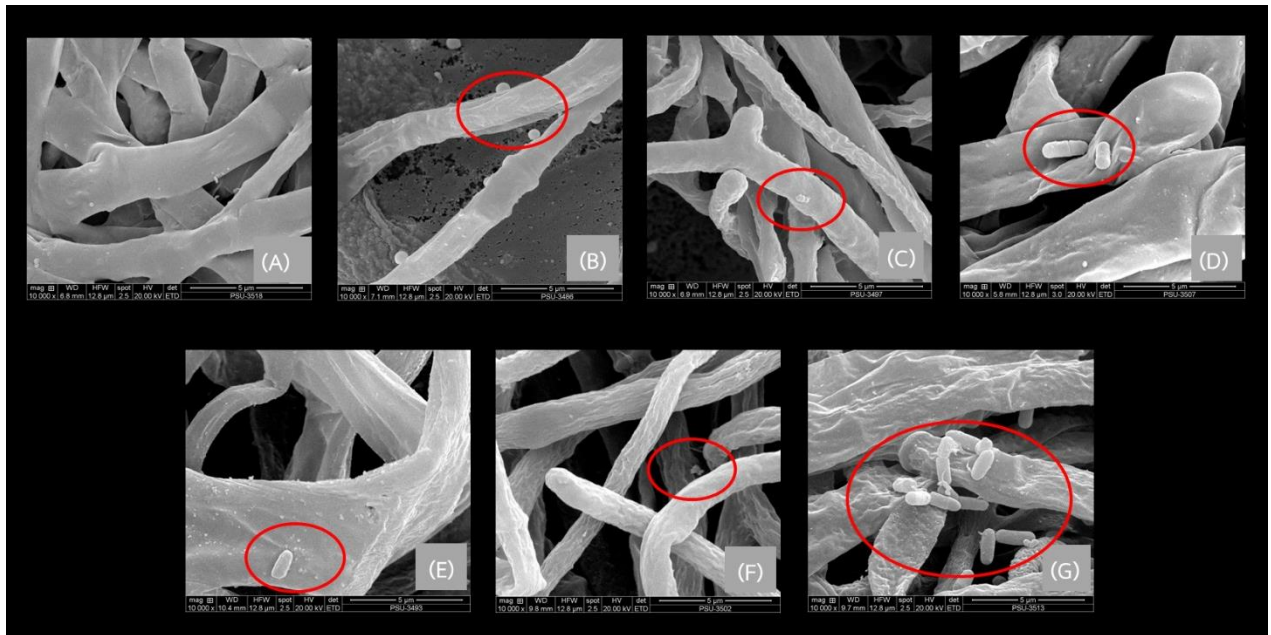


Figure 4 Morphological characteristics of *R. microporus* mycelia by dual culture plate technique control (A) co-cultured with *Bacillus* sp. isolate SM1 for 3, 5 and 7 days ((B) - (D)) and co-cultured with *Bacillus* sp. isolate LPDD3-2 for 3, 5 and 7 days ((E) - (G)), scales bar 2 µm observed by SEM (10,000 x)

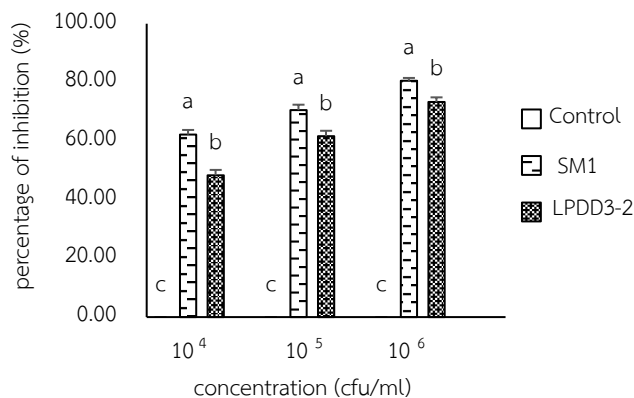


Figure 5 Inhibition of mycelial growth (%) of *R. microporus* by fresh cells of *Bacillus* spp. (SM1 and LPDD3-2) at three concentrations (10^4 , 10^5 and 10^6 cfu/ml) by pour plate technique after 7 days at room temperature and natural light

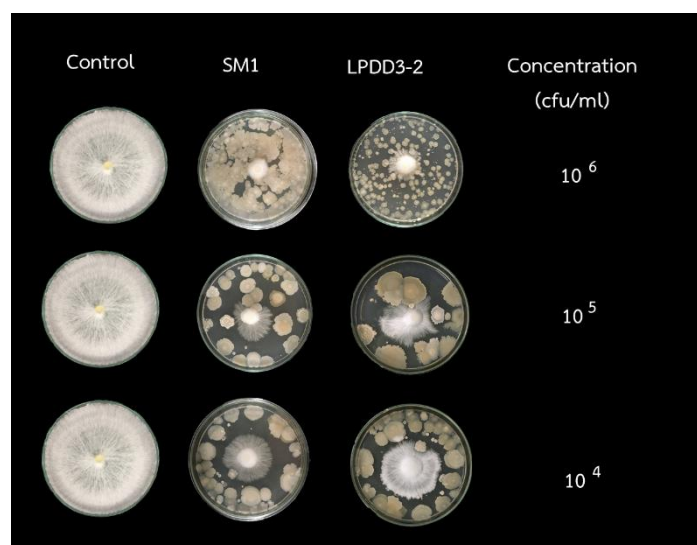


Figure 6 Reaction of the two selected fresh cell of *Bacillus* spp. (SM1 and LPDD3-2) at three concentrations (10^4 , 10^5 and 10^6 cfu/ml) against *R. microporus* by pour plate technique for 7 days at room temperature and natural light



Figure 7 Morphological characteristics of *R. microporus* mycelia by pour plate technique for 7 days, control (A) *R. microporus* + *Bacillus* sp. isolate SM1 (B) and *R. microporus* + *Bacillus* sp. isolate LPDD3-2 (C) scales bar 10 μm under compound microscope (100 x)

3. ประสิทธิภาพเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี agar well diffusion

ผลการทดสอบเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 ที่ความเข้มข้น 10^4 , 10^5 และ 10^6 cfu/ml ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า เซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 ที่ความเข้มข้น 10^6 , 10^5 และ 10^4 cfu/ml สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 53.00, 46.00 และ 27.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบเปรียบกับผลการยับยั้งจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท LPDD3-2 (Figure 8) โดยมีผลทำให้ปลายเส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่นและไม่สามารถเจริญผ่านบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่ (Figure 9) และทำให้เส้นใยเชื้อราก็อโรคมึลักษณะบิดเบี้ยว และกุดตัวลง เมื่อตรวจเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (Figure 10)

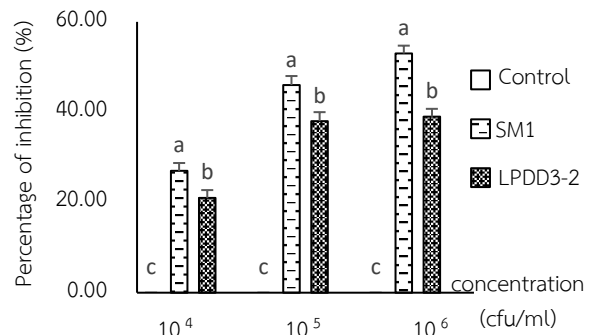


Figure 8 Inhibition of mycelial growth (%) of *R. microporus* by fresh cells of *Bacillus* spp. (SM1 and LPDD3-2) at three concentrations (10^4 , 10^5 and 10^6 cfu/ml) by agar well diffusion technique after 4 days at room temperature and natural light

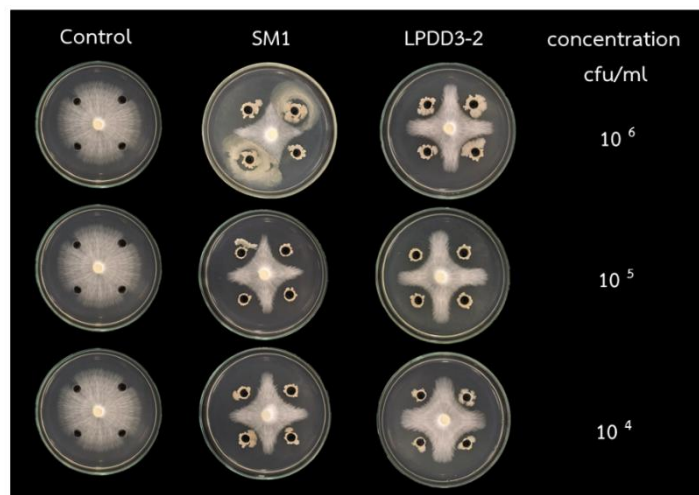


Figure 9 Reaction of the two selected fresh cell of *Bacillus* spp. (SM1 and LPDD3-2) at three concentrations (10^4 , 10^5 and 10^6 cfu/ml) against *R. microporus* by agar well diffusion technique for 4 days at room temperature and natural light



Figure 10 Morphological characteristics of *R. microporus* mycelia by agar well diffusion technique for 4 days, control (A) *R. microporus* + *Bacillus* sp. isolate SM1 (B) and *R. microporus* + *Bacillus* sp. isolate LPDD3-2 (C), scales bar 10 μm under compound microscope (100 x)

4. ประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

สารระเหยจากเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 ที่ความเข้มข้น 10^6 , 10^5 และ 10^4 cfu/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. microporus* ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 30.00, 23.00 และ 16.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่สารระเหยที่ความเข้มข้น 10^6 , 10^5 และ 10^4 cfu/ml ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท LPDD3-2 สามารถยับยั้งเชื้อราได้น้อยลง (น้อยกว่า 21 เปอร์เซ็นต์) (Figure 11) โดยทำให้เส้นใยเชื้อราก่อโรคที่เจริญร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 มีลักษณะบางและเจริญได้น้อยที่สุด ในขณะที่เส้นใยเชื้อราก่อโรคที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท LPDD3-2 ที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^4 cfu/ml เส้นใยเจริญได้ใกล้เคียงกับชุดควบคุม (Figure 12) อีกทั้งมีผลทำให้เส้นใยเชื้อราก่อโรคมียลักษณะบิดเบี้ยว และกุดตัวลงเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น เมื่อตรวจเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (Figure 13)

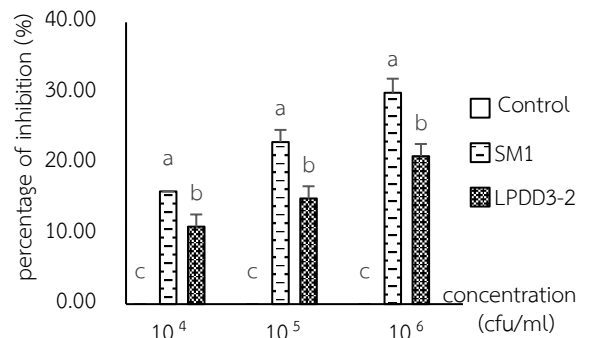


Figure 11 Inhibition of mycelial growth (%) of *R. microporus* by volatile compound of *Bacillus* spp. (SM1 and LPDD3-2) at three concentrations (10^4 , 10^5 and 10^6 cfu/ml) by paired petridish technique after 4 days at room temperature and natural light

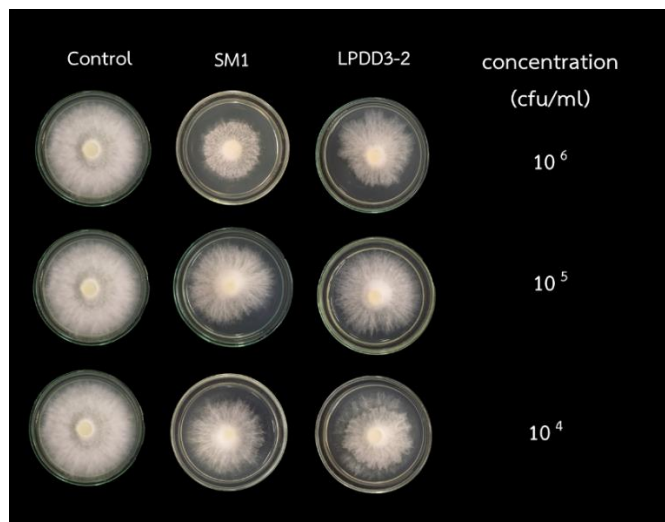


Figure 12 Reaction of the two selected volatile compound of *Bacillus* spp. (SM1 and LPDD3-2) at three concentrations (10^4 , 10^5 and 10^6 cfu/ml) against *R. microporus* by paired petridish technique for 4 days at room temperature and natural light

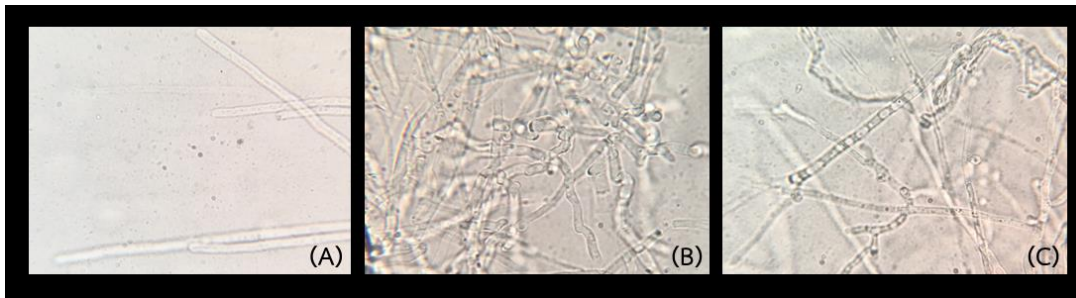


Figure 13 Morphological characteristics of *R. microporus* mycelia treated with volatile compound of two selected *Bacillus* spp. (SM1 and LPDD3-2) by paired petridish technique for 4 days, control (A) *R. microporus* + *Bacillus* sp. isolate SM1 (B) and *R. microporus* + *Bacillus* sp. isolate LPDD3-2 (C), scales bar 10 µm under compound microscope (100 x)

วิจารณ์

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี เช่น ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* spp. (Badia et al., 2011) *Penicillium digitatum* (Thonglem et al., 2007, Leelasuphakul et al., 2008) และเชื้อรา *Alternaria* spp. (Matar et al., 2009) โดยในการทดลองนี้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ประกอบด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ PT7 ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท PT7 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ แต่การเพิ่มปริมาณเชื้อใช้เวลานานเนื่องจากเจริญเติบโตช้า โคลินมีลักษณะหนืด เป็นเมือก การกรองแยกเซลล์ใช้เวลานาน ทำให้ได้ปริมาณเชื้อน้อย และมีโอกาสปนเปื้อนได้ง่าย ในขณะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงได้ง่าย เจริญได้ดีในอาหาร PDB สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อได้ภายในเวลา 7 วัน รวมทั้งสามารถแข่งขัน (competition) และครอบครองพื้นที่ได้ดี ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตหรืออาศัยบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่ได้ ซึ่งเป็นข้อดีที่มีประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ส่วนความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml นั้นสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ถึง 80.56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium graminearum* ได้ 81.3 เปอร์เซ็นต์ (Zhao et al., 2014) ชีวภัณฑ์ได้กำหนดให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ cfu/ml (Yadav et al., 2014) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย นับว่าเป็นจุดเด่นของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 ที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา และสะดวกต่อการใช้งานมากยิ่งขึ้น สำหรับสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ผลิตออกมาเป็นสารที่มีส่วนประกอบเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น สารปฏิชีวนะที่สามารถย่อยแบ่งได้ อาจเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม α -amylasebacilysoicin (Chumthong, 2009) bacilysoicin (Tamehiro et al., 2002) bacillomycin D, bacillomycin, fengycin, iturin, surfactin (Nagy et al., 2012; Torres et al., 2016; Zalila-Kolsi et al., 2016) gramicidin, tyrocidine, bacitracin, subtilin, mycobacillin, bacilysin (Mannanov and Sattarova, 2001) นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 ยังสามารถผลิตสารระเหย (volatile substances) ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ (30 เปอร์เซ็นต์) ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml

ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้านี้สารระเหยที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ผลิตและปลดปล่อยออกมาประกอบด้วย 1-butanol, dimethylsulfoxide และ 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) (Lim et al., 2017) aldehydes, alcohols, hydrocarbons, ketones, ester, acids, aromatics, สารประกอบที่มี sulfur และ nitrogen เป็นหลัก (Kai, 2020) ในการทดลองนี้เมื่อนำเส้นใยเชื้อราที่เจริญร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างภายในภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด มีเซลล์ของแบคทีเรียเกาะติดบริเวณรอบๆ ผิวของเส้นใย เส้นใยฝ่อ เกิดรอยย่นบนพื้นผิว เส้นใยมีขนาดเล็กกลองอย่างเห็นได้ชัดที่เวลา 3 วัน และ 5 วัน ในขณะที่เวลา 7 วัน มีแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เกาะบริเวณผิวเส้นใยของเชื้อราก่อโรค ทำให้เกิดรอยย่นบนพื้นผิว และเป็นรู เนื่องจากแบคทีเรียอาจปลดปล่อยสารออกมาที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคได้ ทำให้เส้นใยฝ่อ และมีลักษณะผิดปกติอย่างชัดเจน ซึ่งลักษณะดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับลักษณะเส้นใยที่ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ที่ทำให้เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยว ผิดรูป และกุดตัวลง เช่นเดียวกับ *B. amyloliquefaciens* ที่ทำให้เส้นใยเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* โค้งงอ เยื่อหุ้มเซลล์แตก (Rahman et al., 2016) และเส้นใยของ *Magnaporthe oryzae* มีการหดตัว บิดเบี้ยวบางส่วน พื้นผิวเส้นใยหยาบ กลวง และมีรอยย่น (Sha et al., 2020) ซึ่งลักษณะนี้เส้นใยไม่สามารถเจริญต่อไปได้แสดงว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ ควรนำไปทดสอบกับพืชเพื่อดูผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโตของพืชรวมทั้งประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ในสภาพโรงเรือนทดลอง และพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ เพื่อสะดวกต่อการใช้งาน และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สรุป

จากการศึกษานี้พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยที่แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท SM1 ที่ทดสอบด้วยวิธี pour plate ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 cfu/ml สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้สูงที่สุด คือ 80.56 เปอร์เซ็นต์ และสามารถผลิตสารระเหยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ 30 เปอร์เซ็นต์ จัดว่าเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็น

ชีวภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา สะดวกต่อการใช้งาน และลดการใช้สารเคมี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และทุนอุดหนุนงานวิจัยจากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการ ผลของการจัดการดินและแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ต่อการควบคุมโรครากขาวของยางพารา ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และภาควิชาวนวัตกรรมและการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Badia, M.M.R., Hernandez, B.T., Murrel, J.A.L., Mahillon, J., and Perez, M.H. 2011. Isolation and characterization of strains of the *Bacillus* associated to rice (*Oryza sativa* L.) crop. *Revista Brasileira de Agroecologia* 6: 90-99.

Chumthong, A., Kanjanamaneesathian, M., Pengnoo, A. and Wiwattanapatapee, R. 2008. Water-soluble granules containing *Bacillus megaterium* for biological control of rice sheath blight: Formulation, bacterial viability and efficacy testing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2499-2507.

Chumthong, A. 2009. Development of *Bacillus megaterium* Formulations for Suppression of Rice Sheath Blight and Study of Mechanisms of Biocontrol. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University.

Gagne, S., Le Quere, D., Aliphath, S., Lemay, R. and Fournier, N. 1991. Inhibition of plant pathogenic fungi by volatile compounds produced by some PGPR strains. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13: 277-280.

Kai, M. 2020. Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates. *Frontiers in Microbiology* 11: 559.

Kanjanamaneesathian, K., Kusonwiriawong, C. and Pengnoo, A. 1998. Screening of potential bacterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial formulation for effective application. *Australasian Plant Pathology* 27: 198-206.

Leelasuphakul, W., Hemmanee, P. and Chuenchitt, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48: 113-121.

Lim, S.M., Yoon, M.Y., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Shin, T.S., Park, H.W., Yu, N.H., Kim, Y.H. and Kim, J.C. 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal* 33: 488-498.

Mannanov, R.N. and Sattarova, R.K. 2001. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. *Chemistry of Natural Compounds* 37: 117-123.

Matar, S.M., El-Kazzaz, S.A., Wagih, E.E., El-Diwany, A.I., Moustafa, H.E., Abo-Zaid, G.A., Abd-Elsalam H.E. and Hafez, E.E. 2009. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi. *Biotechnology* 8: 53-61.

Morton, D.J. and Stroube, W.H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol* 45: 417-420.

Nagy, A., Manczinger, L., Tombácz, D., Hatvani, L., Györfi, J., Antal, Z., Sajben, E., Vágvölgyi, C. and Kredics, L. 2012. Biological control of oyster mushroom green mold disease by antagonistic *Bacillus* species. *Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens"*, Graz, Austria, 7-10 June 2010, pp. 289-293.

Pengnoo, A., Kusonwiriawong, C., Niltatana, L. and Kanjanamaneesathian, M. 2000. Greenhouse and field trails of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *BioControl Journal* 45: 245-256.

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

Rahman, M.M.E., Hossain, D.M., Suzuki, K., Shiiya, A., Dey, T.K., Nonaka, M. and Harada, N. 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: 103-117.

Rotniam, W., Tanmala, W., Deesang, B., Wonglieng, P., Kanjanamaneesathian, M. and Pengnoo, A. 2008. Effect of antagonistic bacteria, *Bacillus* spp. on *Alternaria* spp. a causal agent of lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf spot in hydroponic system. *Journal of Plant Disease* 23: 31-40.

Sha, Y., Zeng, Q. and Sui, S. 2020. Screening and application of *Bacillus* strains isolated from nonrhizospheric rice soil for the biocontrol of rice blast. *The Plant Pathology Journal* 36: 231-243.

Skidmore, A.M. and Dickinson, C.H. 1976. Colony interaction and interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 66: 57-64.

Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H. and Ochi, K. 2002. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 315-320.

Thonglem, K., Plikomal, A. and Pathom-aree, W. 2007. Growth inhibition of *Penicillium digitatum* by antagonistic microorganisms isolate from various parts of orange tree. *Maejo International Journal of Science and Technology* 1: 208-215.

Torres, M.J., Pérez Brandan, C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R. and Audisio, M.C. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research* 182: 31-39.

Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A. and Kanjanamaneesathian, M. 2013. preparation and evaluation of *Bacillus megaterium*-alginate microcapsules for control of rice sheath blight. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 29: 1487-1497.

Yadav, S.K., Rai, A., Rai, P.K. and Singh, P.S. 2014. Microbial formulations: an approach to sustainable agriculture. *Prajna Journal* 60: 2.

- Zalila-Kolsi, I., Mahmoud, A.B., Ali, H., Sellami, S., Nasfi, Z., Tounsi, S. and Jamoussi, K. 2016. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). Microbiological Research 192: 148-158.
- Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L. and Wang, Y. 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 9: DIO.org/10.1371/journal.pone.0092486.

SJPS-O-M-08-173