วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 (มกราคม - มิถุนายน): 44-49, 2564
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 8, No. 1 (January - June): 44-49, 2021

Research article-ISSN: 2351-0846

ผลของไนโตรเจนร่วมกับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 สาเหตุโรครากขาวของยางพาราในสภาพห้องปฏิบัติการ

Effect of Nitrogen and *Bacillus subtilis* SM1 Strain on Controlling *Rigidoporus microporus* NK6 Strain the Cause of White Root Rot Disease *In Vitro* Testing

อุบลวรรณ ผลทวีชัย[1,2,3] และ อัจฉรา เพ็งหนู[1,2,3]
Pholthaweechai, U.[1,2,3] and Pengnoo, A.[1,2,3]

[1] สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110
[1] Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, 90110
[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900
[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900, Thailand
[3] ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110
[3] Natural Biological Control Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, 90110

** Corresponding author: ashara.p@psu.ac.th*
Received 09 May 2021; Revised 24 May 2021; Accepted 14 June 2021

บทคัดย่อ

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อพืชและจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งดินในภาคใต้ของประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นดินที่มีพัฒนาการสูง จึงมีการสูญเสียธาตุอาหารได้ง่ายโดยเฉพาะธาตุไนโตรเจน รวมทั้งมีการใช้พื้นที่ปลูกยางพาราอย่างต่อเนื่องในพื้นที่เดิมและละเลยการใส่ปุ๋ย ทำให้ยางพาราได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอ อ่อนแอและทำให้เชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวเข้าทำลายได้ง่าย ในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ดังนั้น จึงศึกษาผลของไนโตรเจนร่วมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สาเหตุโรครากขาวของยางพาราภายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไนโตรเจนอัตรา 0, 0.421, 0.842, 1.263 และ 1.684 โมลาร์ ทดสอบการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate การทดลองมี 4 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถเจริญได้ 10^{11} cfu/ml แต่การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ลดลง โดยเมื่อใช้ไนโตรเจนและแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ควรทดสอบในสภาพโรงเรือนและศึกษาผลของธาตุอาหารชนิดอื่นเพิ่มเติม

คำสำคัญ: *Bacillus subtilis*, *Rigidoporus microporus,* ไนโตรเจน, การควบคุมโรคโดยชีววิธี

Abstract

Nitrogen is an essential macronutrient for plant function and soil microorganisms. The southern soils are highly developed with easy loss of nutrients, especially nitrogen. The continuous plantation of rubber (*Hevea brasiliensis*) in the same field and neglected proper fertilization result in insufficient nutrient intake, weak rubber plant, and white root disease of para rubber (*Rigidoporus microporus*). *Bacillus subtilis* has been reported as antagonistic to a variety of plant pathogens. The objective of this work was to study the effect of nitrogen and *B. subtilis* SM1 strain for inhibiting *R. microporus* NK6 strain on white root rot disease (*R. microporus* NK6 strain) in laboratory. Nitrogen concentrations of 0, 0.421, 0.842, 1.263 and 1.684 M with four replications were tested for their growth of *B. subtilis* strain SM1, *R. microporus* strain NK6 and suppressive ability of *B. subtilis* strain SM1 against *R. microporus* strain NK6. The results showed that *B. subtilis* strain SM1 was able to grow up to 10^{11} cfu/ml, but the growth of *R. microporus* strain NK6 was decreased. However, with nitrogen and *B. subtilis* strain SM1 combination has also inhibited the growth of *R. microporus* NK6 strain mycelium by more than 80 percent. There should be further studies in greenhouses conditions and on the effects of other nutrients on the disease control.
Keywords: *Bacillus subtilis*, *Rigidoporus microporus*, nitrogen, biological control

Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

บทนำ

ไนโตรเจน เป็นธาตุอาหารหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อยางพาราทุกระยะการเจริญเติบโต รวมทั้งมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในดิน ในการใส่ปุ๋ยส่วนใหญ่เกษตรกรมีการใส่ปุ๋ยไม่เพียงพอต่อความต้องการของยางพารา โดยเฉพาะในช่วงที่ราคายางพาราตกต่ำเกษตรกรไม่ได้มีการใส่ปุ๋ย อีกทั้งการใส่ปุ๋ยของเกษตรกรโดยส่วนใหญ่ไม่ใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำของสถาบันวิจัยยาง (Kungpisdan *et al*., 2006) ทำให้ต้นยางพาราขาดธาตุอาหาร ประกอบกับในพื้นที่ภาคใต้ดินส่วนใหญ่มีพัฒนาการสูง มีการสูญเสียธาตุอาหารได้ง่ายโดยเฉพาะธาตุไนโตรเจน ซึ่งสูญเสียจากการชะละลายและติดไปกับผลผลิตน้ำยาง จากปัจจัยดังกล่าวส่งผลกระทบทำให้ต้นยางพาราอ่อนแอและเชื้อโรคเข้าทำลายได้ง่าย โดยเฉพาะโรครากขาวที่เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินสามารถเข้าทำลายยางพาราได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โดยการผลิตเอนไซม์ extracellular enzymes ทำลายรากยางพารา (Nandris *et al.,* 1987) ทำให้เนื้อเยื่อรากในส่วนของลิกนินเน่าเปื่อย (Geiger *et al.,* 1983) และมีการย่อยสลายลิกนินที่ผนังเซลล์ของรากพืชโดยเกิดในสภาวะที่มีไนโตรเจนต่ำ และจุลินทรีย์จะใช้ไนโตรเจนในการผลิตเอนโดสปอร์ โปรตีน เอนไซม์ การเจริญเติบโตทางด้านเส้นใย ทำให้ต้นยางแสดงอาการใบเหลืองหรือน้ำยางไหลตลอดเวลา ซึ่งบ่งบอกได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคได้เข้าทำลายระบบรากรุนแรง ไม่สามารถรักษาโรคได้แล้ว และโรคได้ลุกลามสู่ต้นอื่นไปแล้ว สำหรับในสถานการณ์ปัจจุบันการระบาดของโรครากขาวยังมีเพิ่มขึ้นและรุนแรงกว่าเดิมโดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกยางเดิม ซึ่งมีการปลูกต้นยางซ้ำในรอบที่ 2 หรือ 3 สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจทั้งในระดับครัวเรือนเกษตรกรและประเทศเป็นอย่างมาก

การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืชเป็นวิธีการหนึ่งในการควบคุมโดยชีววิธี ที่สามารถนำมาใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้และลดการแพร่กระจายของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้ง และเมล็ดด่างของข้าว (Kanjanamaneesathian *et al*., 1998; Pengnoo *et al.,* 2000; Wiwattanapatapee *et al*., 2004) สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (Pengnoo *et al.,* 2006) และยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอม (Rotniam, 2009) โดยการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น iturin, fengycin, surfactin, bacyllomicin, macrolactin, bacillaene และ bacilysin (Rabbee *et al.,* 2019; Khedherab *et al.,* 2021) ออกมายับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ดี ยิ่งไปกว่านั้นแล้วการใช้ไนโตรเจนยังเป็นส่วนหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้ เช่น การสังเคราะห์ กลูตามีน (Mhatre *et al*., 2016) ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (Kim *et al*., 2005) ผลิต 2,3-butanediol (Tian *et al*., 2016) สร้างเอนโดสปอร์และโปรตีน (Stockton and Wyss, 1946; Helmann, 2014) ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของการใช้ไนโตรเจนและแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ภายในห้องปฏิบัติการ เพื่อลดการเกิดโรครากขาวของยางพาราและลดการใช้สารเคมีที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดินได้

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

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

เชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้

2. ทดสอบการเจริญของแบคทีเรีย Bacillus subtilis สายพันธุ์ SM1

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เพิ่มไนโตรเจนรูปยูเรีย $CO_4(NH)_2$ ความเข้มข้น 5 ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 0.421, 0.842, 1.263 และ 1.684 โมลาร์ การทดลองมี 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ที่เจริญบนผิวอาหารดังกล่าว

3. การเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6

ทดสอบการเจริญของ *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 เจาะชิ้นวุ้นเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดยใช้เครื่องเจาะรู (cork borer) เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และวางชิ้นวุ้นของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA ที่เพิ่มไนโตรเจนรูปยูเรีย $CO_4(NH)_2$ ความเข้มข้น 5 ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 0.421, 0.842, 1.263 และ 1.684 โมลาร์ การทดลองมี 4 ซ้ำ บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan New's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate (Skidmore and Dickinson, 1976) บนอาหาร PDA ที่เพิ่มไนโตรเจนรูปยูเรีย $CO_4(NH)_2$ ความเข้มข้น 5 ระดับ 0, 0.421, 0.842, 1.263 และ 1.684 โมลาร์ โดยขีดเชื้อแบคทีเรียยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ลงบนอาหาร PDA ดังกล่าว ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และในแนวตรงข้ามกันเจาะชิ้นวุ้นเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดยใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และวางชิ้นวุ้นของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 โดยวางห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อเข้ามา 2 เซนติเมตร สำหรับชุดควบคุม วางเฉพาะชิ้นวุ้นเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตรเช่นเดียวกัน การทดลองมี 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยวัดความยาวของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ percent inhibition of radial growth (PIRG) ตามวิธีของ (Morton and

Stroube, 1955) หลังจากนั้นตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บริเวณที่ถูกยับยั้งด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PIRG) = ((R1-R2)/R1)*100
R1 คือ ความยาวของเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุม
R2 คือ ความยาวของเส้นใยเชื้อราในชุดทดสอบ

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan New's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลอง

1. การเจริญของแบคทีเรีย Bacillus subtilis สายพันธุ์ SM1

จากการนำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย ทดสอบด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร PDA ที่เพิ่มไนโตรเจน 0, 0.421, 0.842, 1.263 และ 1.684 โมลาร์ พบว่า ปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 7.03-7.43 x 10^{11} cfu/ml ซึ่งไม่มีแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Table 1)

2. การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6

การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 บนอาหาร PDA เพิ่มไนโตรเจน 0, 0.421, 0.842, 1.263 และ 1.684 โมลาร์พบว่า ความเข้มข้นของไนโตรเจนในระดับที่สูงขึ้นทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อราลดลง (Figure 2)โดยเฉพาะไนโตรเจน 1.684 โมลาร์ สามารถวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 2.15 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 0 โมลาร์ (ชุดควบคุม) (Figure 1)

Table 1 Effect of nitrogen (0, 0.421, 0.842, 1.263 and 1.684 M) on growth of *B. subtilis* (SM1) by spread plate method for 24 hour incubation at room temperature and under natural light

Nitrogen concentration (M)	Number of viable *B. subtilis* (cfu/ml)
0 (control)	7.03 x 10^{11}
0.421	7.36 x 10^{11}
0.842	7.43 x 10^{11}
1.263	7.30 x 10^{11}
1.684	7.43 x 10^{11}

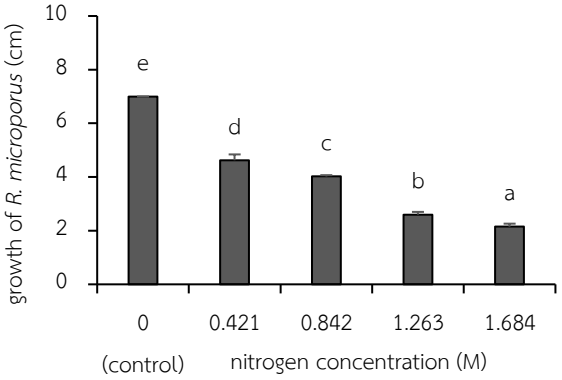

Figure 1 Effect of nitrogen (0, 0.421, 0.842, 1.263 and 1.684 M) on growth of mycelial *R. microporus* NK6 strain (cm) for 7 day incubation at room temperature and under natural light

The same letter over the bars means a non-significant difference at 95% by DMRT.

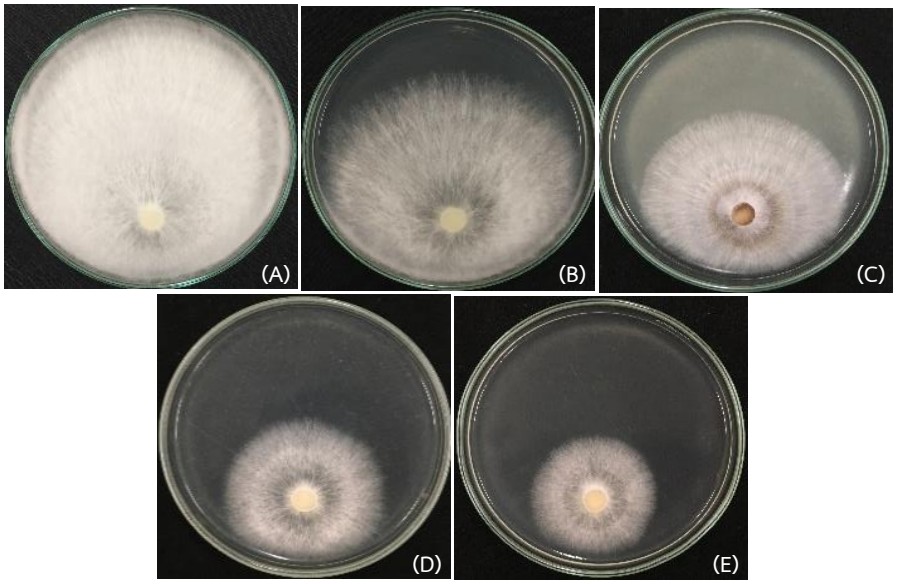

Figure 2 Growth of mycelial *R. microporus* NK6 strain (cm) grew on PDA added with five different concentrations of nitrogen for 7 day incubation at room temperature and under natural light, control (A) *R. microporus* + nitrogen 0.421 M (B), *R. microporus* + nitrogen 0.842 M (C) *R. microporus* + nitrogen 1.263 M (D) and *R. microporus* + nitrogen 1.684 M (E)

3. ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bacillus subtilis สายพันธุ์ SM1 ในการยับยั้งเชื้อรา Rigidoporus microporus สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture plate พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ 70.36 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นของไนโตรเจน 0, 0.421, 0.842, 1.263 และ 1.684 โมลาร์ แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4) ซึ่งระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 1.684 โมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้สูงที่สุด 84.11 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ระดับต่างๆ (Figure 3) โดยเมื่อนำเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่ทดสอบกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1บนอาหาร PDA เพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนระดับต่างๆ ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่า เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ ขนาดของเส้นใยไม่สม่ำเสมอกัน การเจริญบิดเบี้ยวผิดรูป และบริเวณปลายเส้นใยโป่งพอง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่สามารถเจริญงอกยาวเป็นปกติ (Figure 5)

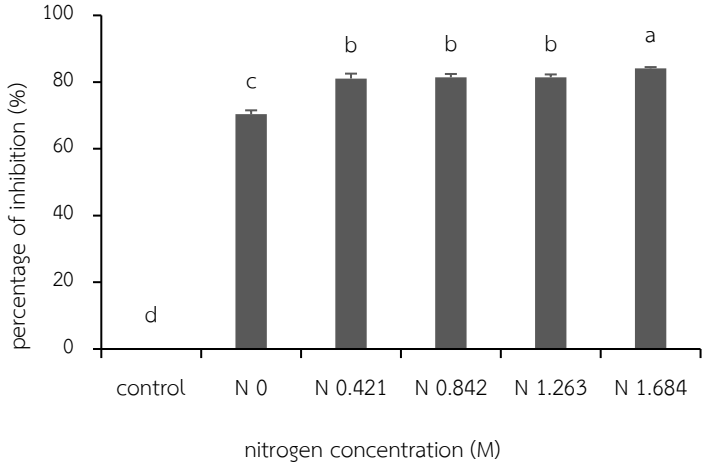

Figure 3 Effect of nitrogen (0, 0.421, 0.842, 1.263 and 1.684 M) on inhibition of mycelial growth (%) of *R. microporus* NK6 strain cooperating with *B. subtilis* SM1 strain by dual culture plate technique after 7 days incubation at room temperature and under natural light. The same letter over the bars means a non-significant difference at 95% by DMRT.

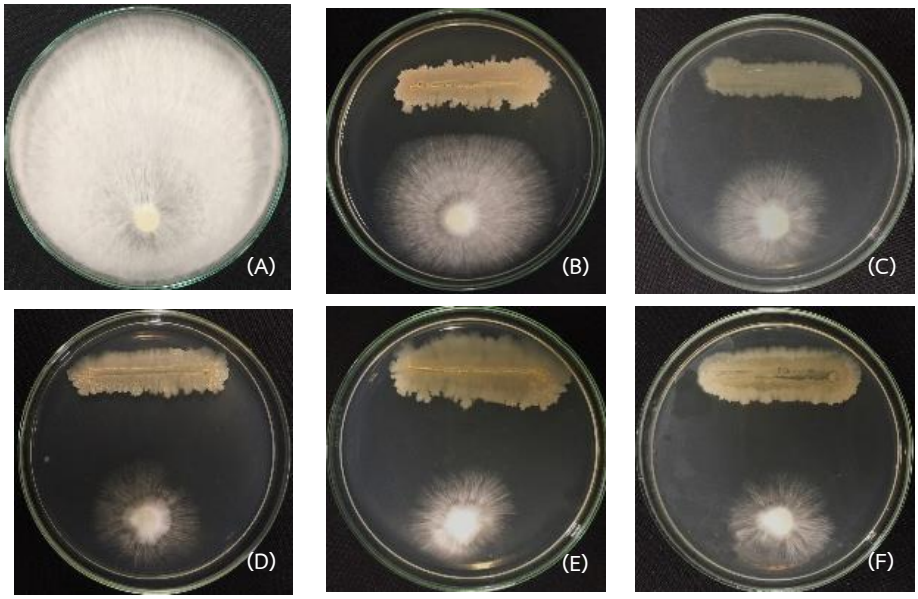

Figure 4 Reaction of the *B. subtilis* SM1 strain against *R. microporus* NK6 strain by dual culture plate technique for 7 day incubation at room temperature and under natural light, control (A) *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 0 M (B), *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 0421 M (C), *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 0.842 M (D) *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 1.263 M (E) and *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 1.684 M (F)

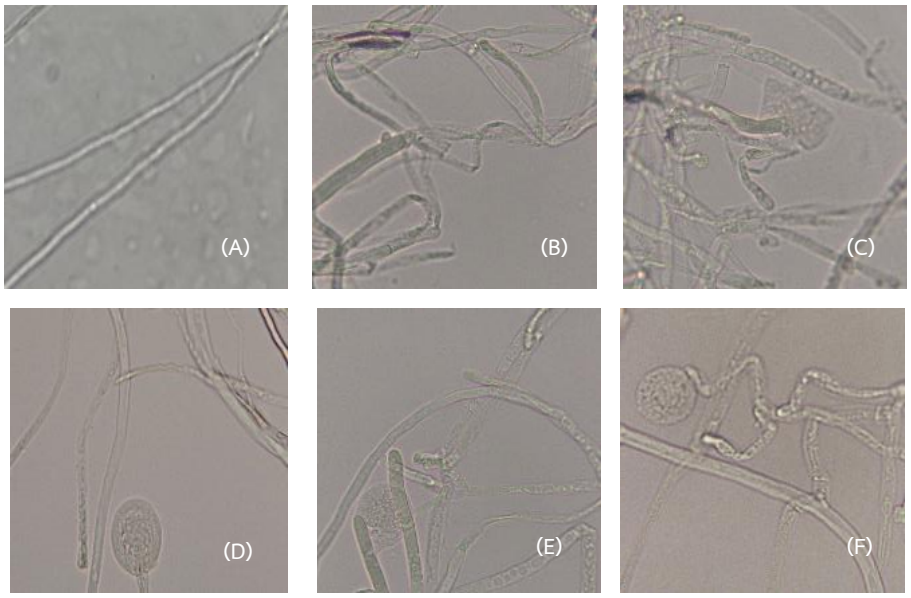

Figure 5 Morphological characteristics of *R. microporus* NK6 strain mycelia by dual culture plate technique for 7 day incubation at room temperature and under natural light, control (A) *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 0 M (B), *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 0421 M (C), *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 0.842 M (D) *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 1.263 M (E) and *B. subtilis* + *R. microporus* + nitrogen 1.684 M (F), scale bar 10 μm under compound microscope (100 x)

วิจารณ์

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อพืชทุกระยะการเจริญเติบโต รวมถึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในดิน โดยเมื่อมีการเพิ่มไนโตรเจน 0.421-1.684 โมลาร์ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถเจริญเติบโตได้ไม่แตกต่างกัน คือ 7.03-7.43 x 10^{11} cfu/ml (Table 1) เมื่อเปรียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเพิ่มไนโตรเจน สอดคล้องกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถเจริญเติบโตได้และมีการสร้างเอนโดสปอร์มากเมื่อเพิ่มสารอาหารในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย แคลเซียม และแมงกานีส (Cote and Gherna, 1999; Gunka and Commichau, 2012) เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของโปรตีนซึ่งพบได้ในเซลล์ของจุลินทรีย์ ตั้งแต่ส่วนของผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ แต่ในขณะที่การเพิ่มไนโตรเจนดังกล่าว ทำให้เส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญได้ลดลง (Figure 1) เช่นเดียวกับ เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนมากกว่า 16.20 กรัมต่อกิโลกรัม ทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pleurotus ostreatus* (U6/8), *Lentinula edodes* (U6/12) และ *Agaricus blazei* (U2/2) ลดลง (Agostini *et al*., 2011) โดยระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารมีผลต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งปริมาณไนโตรเจนที่มากหรือน้อยเกินก็เป็นปัจจัยที่จำกัดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Mantovani *et al*., 2007)

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *Rhizoctonia solani* โรคกาบใบแห้ง และเมล็ดด่างของข้าว (Pengnoo *et al.,* 2000; Chamswarng *et al.,* 2018) และใบไหม้ของถั่วหรั่ง (Pengnoo *et al.,* 2006) เชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอม (Rotniam, 2009) เช่นเดียวกับ แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ในสภาพห้องปฏิบัติการได้ 70.36 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3) รวมทั้งเมื่อมีการเพิ่มไนโตรเจน 0.421-1.684 โมลาร์ ลงในอาหาร PDA แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 1.684 โมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้สูง 84.11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่ทดสอบกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และมีการเพิ่มไนโตรเจน 0.421-1.684 โมลาร์ ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่า เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ ขนาดเส้นใยไม่สม่ำเสมอกัน การเจริญบิดเบี้ยวผิดรูป และบริเวณปลายเส้นใยโป่งพอง (Figure 5) โดยการยับยั้งระหว่างแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 กับเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 เป็นเพราะแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกมา เช่น iturin, fengycin, surfactin, bacyllomicin, macrolactin, bacillaene และ bacilysin (Rabbee *et al*., 2019; Khedherab *et al*., 2021) ผลิตเอนไซม์ β-1,3-glucanase, chitinase และ cellulase (Singh *et al*., 2008; Taechapoempol *et al*., 2011) ซึ่งเป็นกลไกของแบคทีเรีย *B. subtilis* ส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญเติบโตและลดโอกาสในการก่อโรคให้กับพืชได้

สรุป

จากการศึกษา พบว่า การใช้ไนโตรเจนในรูปของยูเรียทำให้การเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 10^{11} cfu/ml แต่การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 ลดลง อีกทั้งเมื่อใช้ไนโตรเจนและแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบภายใน

ห้องปฏิบัติการ ดังนั้น การใช้ไนโตรเจนและแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 สามารถควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ภายในห้องปฏิบัติการ ควรทดสอบในสภาพโรงเรือนและศึกษาผลของธาตุอาหารชนิดอื่นเพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการการควบคุมโรครากขาวของยางพาราโดยชีววิธีร่วมกับการจัดการดิน ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และภาควิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Agostini, E.C.D., Mantovani, T.R.D., Valle, J.S.D., Meirelles, L.D.P., Colauto, N.B. and Linde, G.A. 2011. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.) 68: 295-300.

Chamswarng, C., Intanoo, W. and Noisai, B. 2018. Efficacy of biological products of *Bacillus siamensis* RRK1–Rif for reducing sheath blight and dirty panicle of rice. Thai Journal of Agricultural Science 49: 1-14.

Cote, R. and Gherna, R.L., 1999. Medium Formulation and Design *E. coli* and *Bacillus* spp. in Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation Biocatalysis and Bioseparation Flickinger, M.C. and Drew, S.W. (Eds.), John Wiley and Sons, New York: 1676-1683.

Geiger, J.P., Nandris, D., Nicole, M. and Huguenin, B. 1983. Comparative studies of rubber root rot caused by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* in ivory coast. Proceedings 6th Congress of IUFRO, Melbourne. KILE, G.A. (ed.): 407-408.

Gunka, K. and Commichau, F.M. 2012. Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. Molecular Microbiology 85: 213-224.

Helmann, J.D. 2014. Specificity of metal sensing iron and manganese homeostasis in *Bacillus subtilis*. Journal of Biological Chemistry 289: 28112-28120.

Kanjanamaneesathian, M., Kusonwiriyawong, C., Pengnoo, A. and Nilratana, L. 1998. Screening of potential baterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial formulations for effective application. Australasian Plant Pathology 27: 198–206.

Khedherab, S.B., Trabelsib, B.M. and Tounsia, S. 2021. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. Biological Control 152: 104444.

Kim, J.K., Mulrooney, S.B. and Hausinger, R.P. 2005. Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins. Journal of Bacteriology 187: 7150-7154.

Kungpisdan, N., Suravanit, R., Prukwiwat, W., Prukwarun, S. and Ramlee, A. 2006. Development of technology in fertilizer utilization to increase yield of rubber. Thai Agricultural Research Journal 24: 112-131.

Mantovani, T.R.D., Linde, G.A. and Colauto, N.B. 2007. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. Canadian Journal of Microbiology 53: 139-143.

Mhatre, E., Troszok, A., Monterrosa, R.G., Lindsteadt, S., Holscher, T., Kuipers, O.P. and Kovacs Á.T. 2016. The impact of manganese on biofilm development of *Bacillus subtilis*. Microbiology 162: 1468-1478.

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

Nandris, D., Nocole, M. and Geiger, J.P. 1987. Root rot disease of rubber tree plant disease. The American Phytopathological Society 71: 298-306.

Pengnoo, A., Kusonwiriyawong, C., Niltatana, L. and Kanjanamaneesathian, M. 2000. Greenhouse and field trials 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.

Rabbee, M.F., Ali, M.S., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C. and Baek, K. 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules with in plant microbiomes. Molecules 24: 1046-1059.

Rotniam, W. 2009. Screening and Preparation of Bacillus subtilis Formulation for Control Leaf Spot Disease Caused by Alternaria longipes of Lettuce in Hydroponic Condition. Degree of Master of Science in Soil Resource Management. Prince of Songkla University.

Singh, G., Sharma, J.R. and Hoondal, G.S. 2008. Chitinase production by *Serratia marcescens* GG5. Turkish Journal of Biology 32: 231-236.

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.

Stockton, J.R. and Wyss, 0. 1946. Proteinase production by *Bacillus subtilis*. Indian Journal of Biotechnology 10: 70-74.

Taechapoempol, K., Sreethawong, T., Rangsunvigit, P., Namprohm, W., Thamprajamchit, B., Rengpipat, S. and Chavadej, S. 2011. Cellulase producing bacteria from thai higher termites, *Microcerotermes* sp: enzymatic activities and Ionic liquid tolerance. Biotechnology and Applied Biochemistry 164: 204–219.

Tian, Y., Fan, Y., Liu, J., Zhao, X. and Chen, W. 2016. Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. Electronic Journal of Biotechnology 19: 41-49.

Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M., Matchavanich, W., Nilratana, L. and Jantharangsri, A. 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: formulation, viability and bacterial release studies. Journal of Controlled Release 95: 453–460.