วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 9 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม-ธันวาคม): 51-58, 2565
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 9, No. 2 (July-December): 51-58, 2022

Research article-ISSN: 2351-0846

ผลของรำข้าวและปลายข้าวต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา

Effect of Rice Bran and Broken Rice on the Efficacy of *Bacillus subtilis* Antagonist Bacteria in Controlling *Rigidoporus microporus*, the Causing White Root Rot Disease on Para Rubber

นพมาศ มณีนิล[1,2,3] และ อัจฉรา เพ็งหนู[1,2,3]
Noppamas Maneenil[1,2,3] and Ashara Pengnoo[1,2,3]

[1] สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110
[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
[3] ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110

[1] Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, 90110
[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand
[3] Natural Biological Control Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, 90110

[*] *Corresponding author: ashara.p@psu.ac.th*
Received 12 April 2022; Revised 15 June 2022; Accepted 22 December 2022

บทคัดย่อ

รำข้าวและปลายข้าวเป็นวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการสีข้าว มีองค์ประกอบทางเคมีที่จุลินทรีย์ต้องการในการเจริญ การใช้ประโยชน์จากรำข้าวและปลายข้าว โดยนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มปริมาณจึงถือเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอย่างหนึ่ง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของรำข้าวและปลายข้าวต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* และเชื้อรา *Rigidoporus microporus* รวมทั้งประสิทธิภาพของ *B. subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากขาวของยางพารา จากการศึกษาพบว่า ทั้งอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เสริมรำข้าวและเสริมปลายข้าว ทำให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 เจริญได้สูงกว่า 12 log CFU/ml ขณะที่การเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ลดลงในอาหารที่เสริมรำข้าว และการทดสอบโดยวิธี dual culture ปรากฏว่า อาหารที่เสริมรำข้าวทำให้การยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. microporus* ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 เพิ่มขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเฉพาะอาหารที่เสริมรำข้าว 3 เปอร์เซ็นต์ ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุด 67.50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microporus* โดยใช้รำข้าวเป็นอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* และเป็นส่วนผสมในชีวภัณฑ์จึงเป็นแนวทางที่ควรศึกษาต่อไป
คำสำคัญ: *Bacillus subtilis*, *Rigidoporus microporus*, รำข้าว, ปลายข้าว

Abstract

Rice bran and broken rice are the residues from the rice milling process, which contain the chemical composition. Using agricultural residues as a food source for microorganisms is also the benefit way to increase the value of the residues. The objective of this research was to study the effect of rice bran and broken rice on the growth of antagonistic bacteria *Bacillus subtilis* and *Rigidoporus microporus* as well as the efficacy of *B. subtilis* on the controlling *R. microporus*, which is the cause of white root disease of Para rubber. The result showed that antagonistic bacteria *B. subtilis* strain SM1 and LPDD3-2 in potato dextrose agar (PDA) supplemented with rice bran and with broken rice were able to grow more than 12 log CFU/ml, but the growth of *R. microporus* strain NK6 was decreased in PDA supplemented with rice bran. The antagonistic *B. subtilis* strain LPDD3-2 increased significantly ($P<0.05$) against mycelium growth of *R. microporus* on PDA supplemented with rice bran by dual culture test,

Published by Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: sjps.psu@gmail.com

especially on PDA supplemented with 3% rice bran had shown highest inhibition at 67.50 percent. Therefore, the bio-agent development of *B. subtilis* antagonistic bacteria for controlling *R. microporus* by using rice bran in culture medium of *B. subtilis* and as an ingredient in bio-agent is an approach that should be further studied.
Keywords: *Bacillus subtilis*, *Rigidoporus microporus*, rice bran, broken rice

บทนำ

Rigidoporus microporus เป็นเชื้อราสาเหตุโรครากขาว (White root rot disease) ในยางพารา ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราเป็นอย่างมาก ทำให้ผลผลิตของน้ำยางและผลผลิตของไม้ยางลดน้อยลง เนื่องจากเชื้อราสามารถเจริญเข้าทำลายบริเวณรากของต้นยางพารา ทำให้รากไม่สามารถดูดน้ำและธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของต้นได้ หากเกิดอาการรุนแรงจะทำให้ต้นยางยืนต้นตาย (Chanprathin, 2005) เพื่อลดปัญหาดังกล่าว การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรสามารถเลือกใช้เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งในปัจจุบันวิธีการนี้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์กลุ่ม *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดี สามารถทำให้เส้นใยเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ เช่นเดียวกับลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เกาะบริเวณผิวเส้นใยของเชื้อรา ทำให้เส้นใยฝ่อ เป็นรู และเกิดรอยย่นบนพื้นผิวที่ผนังเซลล์เส้นใยเชื้อรา (Sungtong *et al*., 2021) อีกทั้งแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว เลี้ยงง่าย รวมทั้งสามารถแข่งขันและครอบครองพื้นที่ได้ดี ซึ่งเป็นข้อดีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช อย่างไรก็ตาม การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืชที่ได้ผลมักจะต้องใช้เชื้อปฏิปักษ์ที่เพิ่มปริมาณเชื้อได้จำนวนมาก ทำให้ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะส่วนประกอบของแหล่งอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ที่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์

รำข้าวและปลายข้าวที่ถือเป็นผลพลอยได้หรือวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการสีข้าว มีองค์ประกอบทางเคมีที่จุลินทรีย์ต้องการในการเจริญ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน น้ำหรือความชื้น และเส้นใยอาหารต่าง ๆ ซึ่งมีรายงานพบว่ารำข้าวประกอบด้วย เยื่อใยอาหารเป็นส่วนใหญ่ 20.5-33.3 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 13.2-18.6 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 9.5-22.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลายข้าวทั่วไปจะมีโปรตีนประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ มีไขมันและเยื่อใยต่ำ (Liu *et al*., 2021) นอกจากนี้ในรำข้าวและปลายข้าวยังพบสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ที่มีประโยชน์หลากหลาย เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะมีปริมาณมากกว่าพืชชนิดอื่น ๆ (Sompong *et al*., 2011) จากองค์ประกอบดังกล่าวการนำรำข้าวและปลายข้าวมาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์อาจช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ อีกทั้งยังลดต้นทุนในการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำหน่ายทางการค้าซึ่งส่วนใหญ่นำเข้ามาจากต่างประเทศในราคาค่อนข้างสูง และลดปริมาณของเหลือที่เกิดจากกระบวนการสีข้าว

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของรำข้าวและปลายข้าว ต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และเชื้อรา *R. microporus* รวมทั้งประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากขาวของยางพารา

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เสริมรำข้าวและปลายข้าว

นำรำข้าว และปลายข้าวของพันธุ์ข้าวหอมมะลิ ตามสัดส่วนในตารางที่ 1 มาเตรียมเป็นอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เสริมรำข้าว และปลายข้าว โดยต้มรำข้าว และปลายข้าว ในน้ำกลั่นจนเดือด โดยที่ให้รำข้าวและปลายข้าวสุกแต่ไม่เละ จากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนใส นำมาเติมตามสัดส่วนของสูตรมาตรฐานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

Table 1 Rice bran and broken rice supplement formula

Formula	Ratio of food sources per 1 liter of PDA (g)
PDA supplemented with rice bran	
rice bran 1%	100
rice bran 3%	300
PDA supplemented with broken rice	
broken rice 3%	300
broken rice 5%	500

2. การทดสอบผลของรำข้าวและปลายข้าวต่อการเจริญของ Bacillus subtilis

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 เลี้ยงในอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งจะได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเท่ากับ 9 log CFU/ml แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร PDA เสริมรำข้าว (1 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และปลายข้าว (3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์บนอาหารแข็งต่างชนิด

3. การทดสอบผลของรำข้าวและปลายข้าวต่อการเจริญของเชื้อรา Rigidoporus microporus

ตัดโคโลนีของเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน นำมาวางห่างจากขอบจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร PDA เสริมรำข้าว (1 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และปลายข้าว (3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น บันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 และตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา

4. การทดสอบผลของรำข้าวและปลายข้าวต่อประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา Rigidoporus microporus ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ Bacillus subtilis

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยวิธี dual culture (Torres *et al*., 2017) บนอาหาร PDA เสริมรำข้าว (1 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และปลายข้าว (3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) โดยวางเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 7 วัน ซึ่งเจาะด้วย steel cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ ไว้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และขีดเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ฝั่งตรงข้าม ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น วัดการเจริญของเชื้อราโดยวัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราที่เจริญ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการลงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำข้อมูลมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราตามวิธีของ Chaurasia และคณะ (2005) จากสูตร [R1-(R2/R1)] x 100 โดยที่ R1 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว (ชุดควบคุม) และ R2 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุที่ถูกยับยั้งด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (ชุดทดสอบ) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลอง 4 ซ้ำ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan New's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$

ผลการทดลอง

1. ผลของรำข้าวและปลายข้าวต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ Bacillus spp. และเชื้อรา Rigidoporus microporus สาเหตุโรครากขาวในยางพารา

การเจริญของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหาร PDA เสริมรำข้าว (0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และปลายข้าว (0, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) พบว่า *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์เลี้ยงบนอาหารเสริมรำข้าวและปลายข้าวมีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดควบคุม ($P<0.05$) โดยปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเสริมรำข้าวและเสริมปลายข้าว 3 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตของเชื้อเพิ่มขึ้นสูงสุดจนถึง 12.20 และ 12.16 log CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงใน Figure 1 เช่นเดียวกับการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 พบว่าเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมรำข้าว มีการเจริญเติบโตลดลง สามารถวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 4.3 และ 3.6 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมปลายข้าวทำให้เส้นใยเชื้อรามีการเจริญเติบโตได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงใน Figure 2 เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา*R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยตาเปล่าจะเห็นได้ว่าเส้นใยเชื้อรามีลักษณะฟูและอัดแน่น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 3) และเมื่อนำเส้นใยเชื้อราส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 มีลักษณะโค้งงอ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีลักษณะปลายเส้นใยมนเจริญงอกยาวเป็นปกติ (Figure 4)

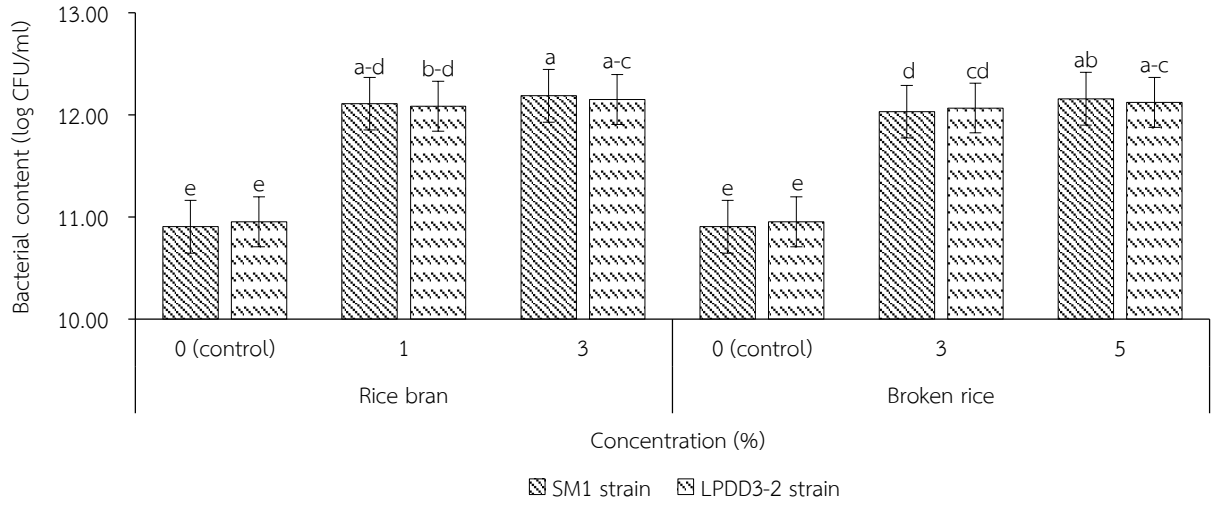

Figure 1 Bacterial content of *B. subtilis* strains SM1 and LPDD3-2 on PDA supplemented with various concentrations of rice bran and broken rice for 24 hours at room temperature after incubation at room temperature. Different letters in each bar indicate significant difference (P<0.05) by DMRT. All data were presented as mean ± S.E calculated from four independent replicates.

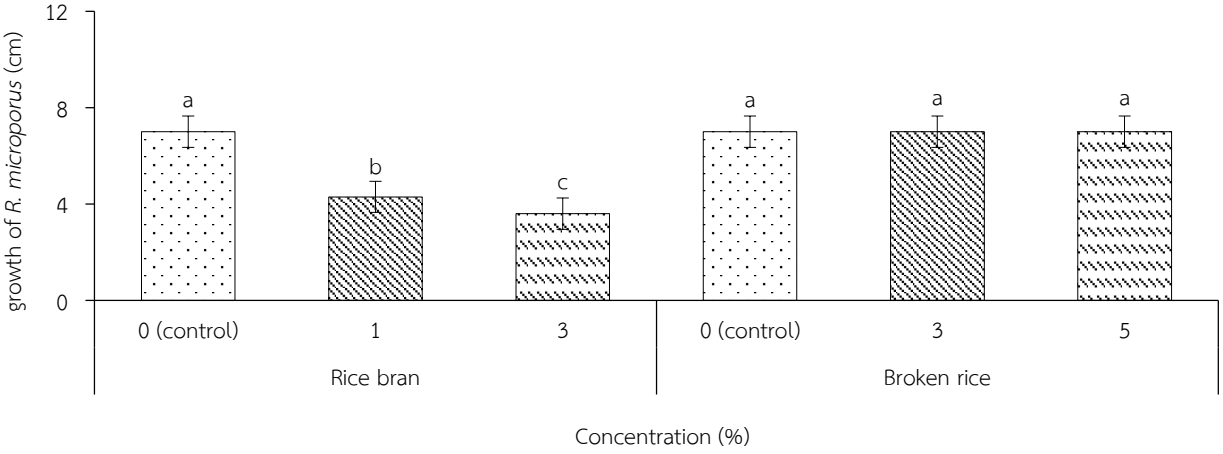

Figure 2 Growth of *R. microporus* strain NK6 on PDA supplemented with various concentrations of rice bran and broken rice at 7 days after incubation at room temperature. Different letters in each bar indicate significant difference (P<0.05) by DMRT. All data were presented as mean ± S.E calculated from four independent replicates.

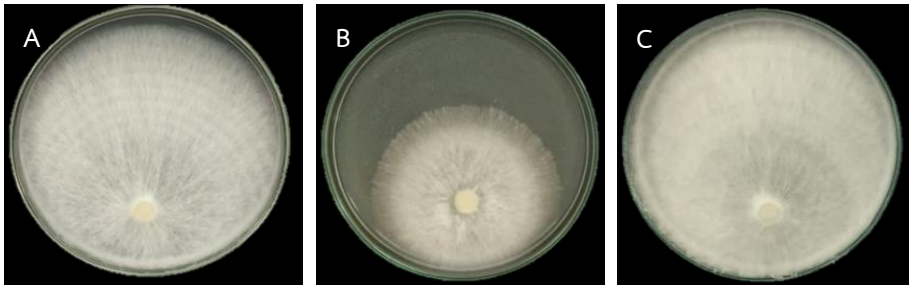

Figure 3 Mycelial of *R. microporus* strain NK6 grown at 7 days after incubation at room temperature on various media, PDA (A), PDA + rice bran 3% (B), PDA + broken rice 3% (C)

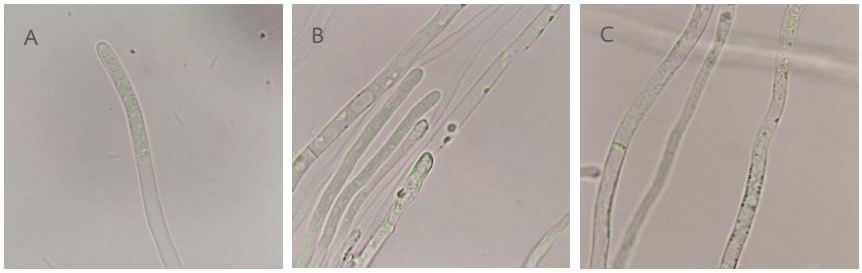

Figure 4 Morphological characteristics of *R. microporus* strain NK6 mycelial at 7 days after incubation at room temperature on various media, PDA (A) PDA + rice bran 3% (B) PDA + broken rice 3% (C), under compound microscope (100 x)

2. ผลของรำข้าวและปลายข้าวต่อประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา Rigidoporus microporus ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ Bacillus subtilis

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และ LPDD3-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมรำข้าวทุกระดับความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 67.56 และ 65.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่อาหารเสริมปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น ร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 มีแนวโน้มการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. microporus* อยู่ในช่วง 62–64 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงใน Figure 5 เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ด้วยตาเปล่าจะเห็นได้ว่าเส้นใยเชื้อราค่อนข้างหยาบ เส้นใยบางและการเจริญไม่สม่ำเสมอกัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 6) และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บริเวณแนวยับยั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเส้นใยเชื้อรามีการเจริญบิดเบี้ยวผิดรูป มีลักษณะโค้งงอ ลีบแบนและขนาดเล็กลงกว่าเส้นใยในชุดควบคุม หรือมีองค์ประกอบภายในเส้นใยลดน้อยลง ขณะที่เส้นใยของชุดควบคุมมีลักษณะปลายเส้นใยมนเจริญงอกยาวเป็นปกติ (Figure 7)

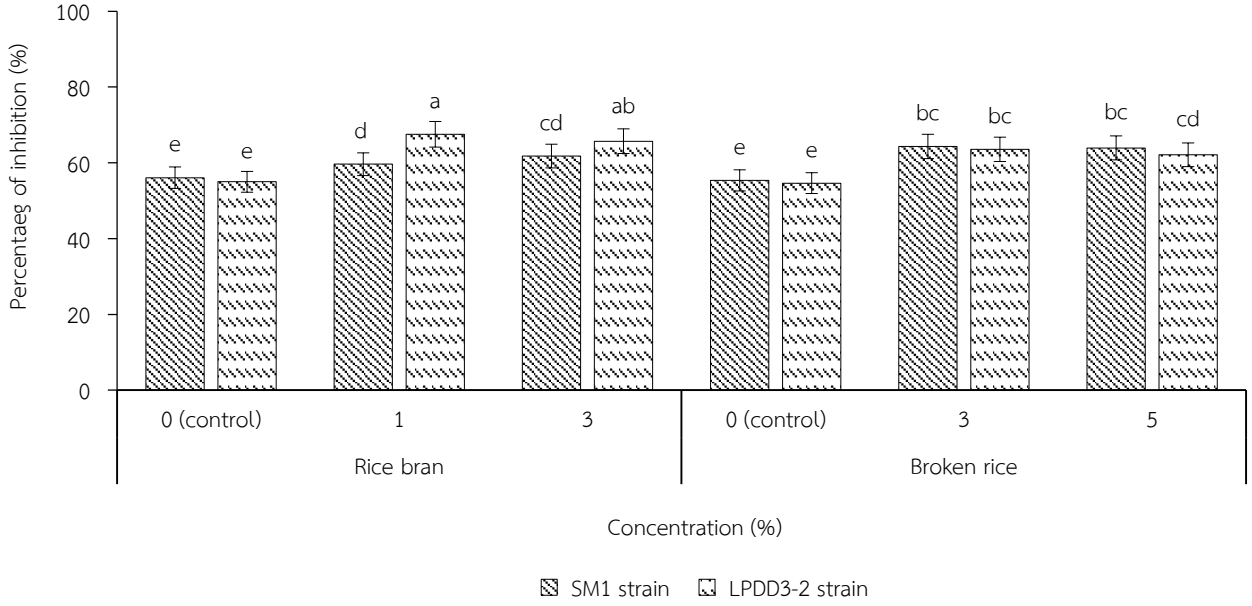

Figure 5 Inhibition of mycelial growth of *R. microporus* strain NK6 by *B. subtilis* strains SM1 and LPDD3-2 on PDA supplemented with various concentrations of rice bran and broken rice in dual culture plate at 7 days after incubation at room temperature. Different letters in each bar indicate significant difference ($P<0.05$) by DMRT. All data were presented as mean ± S.E calculated from four independent replicates.

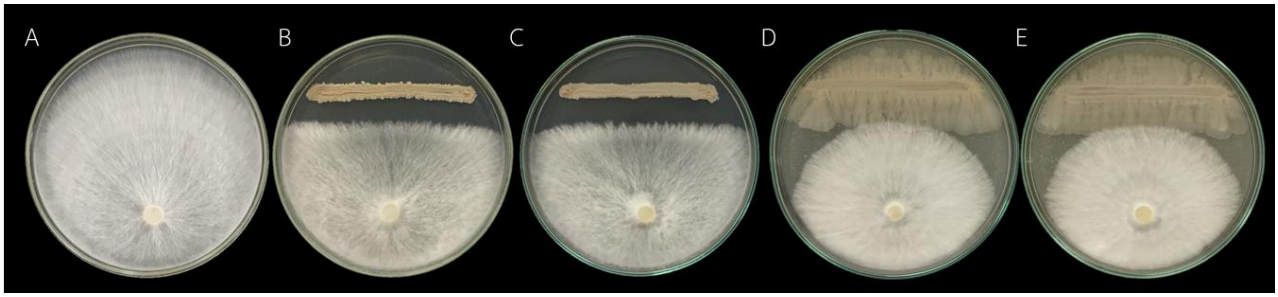

Figure 6 Antagonistic *B. subtilis* inhibited *R. microporus* strain NK6 in dual culture plate on PDA supplemented with rice bran at 7 days after incubation at room temperature, *R. microporus* (A), *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* (B), *B. subtilis* (LPDD3-2) + R. *microporus* (C), *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + rice bran 3% (D) *B. subtilis* (LPDD3-2) + *R. microporus* + rice bran 3% (E)

Figure 7 Morphological characteristics mycelia of *R. microporus* strain NK6 in dual culture plate with antagonistic *B. subtilis* at 7 days after incubation at room temperature on PDA supplemented with rice bran, *R. microporus* (A), *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* (B), *B. subtilis* (LPDD3-2) + *R. microporus* (C), *B. subtilis* (SM1) + *R. microporus* + rice bran 3% (D) *B. subtilis* (LPDD3-2) + *R. microporus* + rice bran 3% (E) under compound microscope (100 x)

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. และเชื้อรา *Rigidoporus microporus* บนอาหารที่เสริมรำข้าวและปลายข้าว ทำให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 12.20 และ 12.16 log CFU/ml (Figure 1) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (10.90 log CFU/ml) การเพิ่มและปรับความเข้มข้นของอาหารสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดี ส่งผลให้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์เพิ่มมากขึ้น และลักษณะของเซลล์มีขนาดใหญ่ โดยที่ระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของรำข้าวและปลายข้าวมีแนวโน้มทำให้ปริมาณ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์สูงกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ และการตอบสนองต่อรำข้าวมีแนวโน้มดีกว่าปลายข้าว (Figure 1) แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ *B. subtilis* การที่รำข้าวและปลายข้าวมีคุณสมบัติการส่งเสริมและเพิ่มความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทั้งนี้เนื่องจากรำข้าวและปลายข้าวมีองค์ประกอบทางเคมี เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Demirci *et al*., 2017; Demissie *et al*., 2020; Moon and Chang, 2021) การส่งเสริมการเจริญที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการนำอาหารแข็ง PDA ที่เสริมรำข้าวและปลายข้าวไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งที่สภาวะดังกล่าวอาจส่งผลให้องค์ประกอบทางเคมีในรำข้าวและปลายข้าวเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของน้ำตาลที่ไม่ละลายน้ำไปเป็นน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ เช่น Arabinose, Galactose, Glucose, Inositol และ Xylose เป็นต้น (Daou and Zhang, 2012) ส่งผลให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เจริญเติบโตได้ดีกว่าการเลี้ยงด้วย Potato dextrose agar (PDA) เพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับการศึกษาของ Pengnoo และคณะ (2005) รายงานว่า ปริมาณของเอนโดสปอร์ *B. megaterium* ในอาหารเหลว Potato dextrose broth ต่ำกว่าอาหารที่ใช้ข้าวกล้องแทนมันฝรั่ง แต่เอนโดสปอร์ในอาหารที่ใช้ข้าวเหนียวมีขนาดทั้งความกว้างและยาวสูงสุด

สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของปลายข้าวทุกระดับ ทำให้เชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญได้ดี แต่ขณะที่การเพิ่มรำข้าวทุกระดับความเข้มข้นในอาหาร ทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 สามารถเจริญได้ลดลง คือ 4.3 และ 3.6 เซนติเมตร (Figure 2) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเกิดจากองค์ประกอบทางเคมีในรำข้าวหรือความเข้มข้นอาหารที่สูงเกินไปอาจจะเร่งกระบวนการเมทาบอลิซึมทำให้เชื้อรามีการเจริญและหยุดชะงักอย่างเห็นได้ชัด (Frank, 2010) การที่รำข้าวสามารถลดการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากขาว และสร้างความเสียหายแก่การผลิต

ยางพาราในประเทศไทยอย่างยาวนาน นับว่าเป็นข้อมูลที่น่าสนใจยิ่ง ในการนำไปศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้การควบคุมโรครากขาวของยางพาราให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และเป็นโอกาสในการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่รำข้าวที่เป็นผลผลิตเหลือใช้ทางเกษตร

การที่แบคทีเรีย *Bacillus* เจริญเติบโตเร็ว สามารถแข่งขันและครอบครองพื้นที่ได้ดี รวมทั้ง *Bacillus* สามารถสร้างสารปฏิปักษ์ที่มีส่วนประกอบเป็นสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ เช่น สารปฏิชีวนะที่สามารถย่อยแป้งได้ อาจอยู่ในกลุ่ม iturin, fengycin, surfactin, bacillomycin, macrolactin, bacillaene และ bacilysin (Rabbee *et al*., 2019; Khedherab *et al*., 2021; Ongena and Jacques, 2008) ทำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดี โดยที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ที่เข้มข้น 10^6 cfu/ml สามารถสร้างสารปฏิปักษ์และสารระเหย และยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ถึง 80.56 เปอร์เซ็นต์ (Sungtong *et al*., 2021) เช่นเดียวกับประสิทธิภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจน ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สายพันธุ์ NK6 ได้ 84.11 เปอร์เซ็นต์ (Pholthaweechai and Pengnoo, 2021) จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 บนอาหารเสริมรำข้าวและเสริมปลายข้าว มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* ได้ดี เนื่องจากรำข้าวและปลายข้าวเป็นแหล่งอาหารที่ดีที่สุดที่เชื้อปฏิปักษ์สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต หรือการสร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ทำให้กิจกรรมการเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง (Kilian *et al*., 2004) โดยอาหารที่เสริมรำข้าวและเสริมปลายข้าวทุกระดับความเข้มข้น ทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ สูงกว่าชุดควบคุมและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่อาหารเสริมปลายข้าวทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองสายพันธุ์ต่ำกว่าอาหารเสริมรำข้าว แสดงว่าอาหารและการตอบสนองต่อรำข้าวของ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 สูงกว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 โดยเฉพาะอาหารเสริมรำข้าว ที่สามารถส่งเสริมให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD3-2 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้สูงกว่าอาหารเสริมปลายข้าว เมื่อพิจารณาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ถูกยับยั้งโดย *B. subtilis* ทั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบเส้นใยของเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ โดยอาหารเสริมรำข้าวทำให้เส้นใยไม่เรียบและปลายเส้นใยคดงอ รูปร่างไม่แน่นอนและภายในเส้นใยเกิดการสลายตัวบางช่วง หรือมีองค์ประกอบภายในเส้นใยลดน้อยลง มีการแตกแขนงผิดปกติอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Figure 7) ความผิดปกติของเส้นใยเชื้อรานี้ เนื่องจากสารปฏิปักษ์ทั้งที่ทนความร้อนและไม่ทนความร้อน รวมถึงสารระเหยที่ *B. subtilis* ผลิตออกมา (Sungtong, 2021) รวมถึงอาจมีการสร้างเอนไซม์ β-glucanase ที่สามารถย่อยสลายกลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Parker, 2000) ส่งผลให้เส้นใยฝ่อ เกิดรอยย่นบนพื้นผิวที่ผนังเซลล์เส้นใยเชื้อรา และนอกจากนี้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 ยังเข้าทำลายโดยตรงโดยการเจาะเส้นใยของเชื้อรา (Sungtong *et al*., 2021)

ในการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microporus* นอกจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของแบคทีเรียปฏิปักษ์ อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อทั้งปริมาณและประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยที่รำข้าวเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่หาได้ง่ายและราคาถูก ที่นอกจากส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* การนำรำข้าวมาใช้จะเกิดประโยชน์ในการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ตลอดจนเป็นองค์ประกอบในชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากขาวของยางพารา จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจยิ่ง

สรุป

อาหารเสริมรำข้าวทำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ SM1 และสายพันธุ์ LPDD3-2 มีการเจริญเติบโตสามารถเพิ่มจำนวนได้มากกว่าอาหาร PDA และอาหารเสริมรำข้าวทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้อาหารเสริมรำข้าวยังช่วยยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. microporus* ดังนั้นพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microporus* โดยใช้รำข้าวเป็นอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* และเป็นส่วนผสมใน ชีวภัณฑ์จึงเป็นแนวทางที่ควรศึกษาต่อไปทั้งเพื่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิตเหลือใช้ทางการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการ การควบคุมโรครากขาวของยางพาราโดยชีววิธีร่วมกับการจัดการดิน ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Chanprathin, U. 2005. Diseases, Insect Pests and Biological Control. Bangkok: Department of Agriculture Press.

Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B. and Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. Microbiological Research 160: 75-81.

Daou, C. and Zhang, H. 2012. Effect of high pressure, autoclaving and extrusion treatments on insoluble, soluble and total dietary fiber contents of defatted rice bran. Academic Food Journal 10: 6-13.

Demirci, T., Aktaş, K., Sozeri, D., Ozturk, H.I. and Akin, N. 2017. Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. Journal of Functional Foods 36: 396-403.

Demissie, Y., Humblot, C., Baxter, B., Nealon, N.J. and Ryan, E. 2020. Probiotic fermentation of rice bran with six genetically diverse strains effects nutrient and phytochemical composition; a non-targeted metabolomics approach. Current Developments in Nutrition 4: 1553. https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa062_010

Frank, S.A. 2010. The trade-off between rate and yield in the design of microbial metabolism. Journal of Evolutionary Biology 23: 609-613.

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. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104444

Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G. and Hain, R. 2004. FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 100: 72-193.

Liu, Y., Zhang, H., Yi, C., Quan, K. and Lin, B. 2021. Chemical composition, structure, physicochemical and functional properties of rice bran dietary fiber modified by cellulase treatment. Food Chemistry 342: 128352. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128352

Moon, S.H. and Chang, H.C. 2021. Rice bran fermentation using *Lactiplantibacillus plantarum* EM as a starter and the potential of the fermented rice bran as a functional food. Foods 10: 978. https://doi.org/10.3390/foods10050978

Ongena, M. and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology 16: 115-125.

Parker, E.J. 2000. Signalling in plant disease resistance. *In* Molecular Plant Pathology (ed. M. Dickinson and J. Beynon). pp. 198-217. Sheffield Academic Press: Sheffield, U.K.

Pengnoo, A., Wiwatanapatapee, R., Chumthong, A., Rotniam, W. and Kanjanamaneesathian, M. 2005. Preliminary study on the effect of culture medium on the number and size of endospores of *Bacillus megaterium.* Silpakorn University Science and Technology Journal 5: 129-139.

Pholthaweechai, U. and 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: 44-49.

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.

Sompong, S., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martina, E. and Berghofera, E. 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. Food Chemistry 124: 132-140.

Sungtong, S. 2021. Antagonistic Bacteria for Controlling White Root Rot Disease of Rubber (*Hevea brasilieansis*). Master Thesis. Prince of Songkla University. (In Thai with English Abstract)

Sungtong, S., Pngnoo, A. and Boonyapipat, P. 2021. Efficacy of *Bacillus* spp. in controlling soil borne pathogen *Rigidoporus microporus* under control conditions. Songklanakarin Journal of Plant Science 8: 34-43.

Torres, M.J., Brandan, C.P., Sabate, D.C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R. and Audisio, M.C. 2017. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPRacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. Biological Control 105: 93-99.