การผลิต ลักษณะสมบัติและการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* F2.2

น.ส.สิริตา เสียมไหม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND INHIBITION OF FUNGAL PLANT PATHOGEN OF BIOSURFACTANT FROM *Bacillus licheniformis* F2.2

Miss Sirita Siammai

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology and Microbial Technology
Department of Microbiology
FACULTY OF SCIENCE
Chulalongkorn University
Academic Year 2019
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิต ลักษณะสมบัติและการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* F2.2
โดย	น.ส.สิริตา เสียมไหม
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สิริตา เสียมไหม : การผลิต ลักษณะสมบัติและการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* F2.2. (PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND INHIBITION OF FUNGAL PLANT PATHOGEN OF BIOSURFACTANT FROM *Bacillus licheniformis* F2.2) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ปาหนัน เริงสำราญ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.จิราภรณ์ ธนียวัน

งานวิจัยนี้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืช การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* F2.2 รวมถึงหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นทำบริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แล้วทดสอบการประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ในต้นข้าว ผลการวิจัยพบว่า *B. licheniformis* F2.2 สามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชได้ทั้ง 7 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Pyricularia oryzae* และ *Phytophthora palmivora* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 34.79±6.29-44.51±1.29% เมื่อทดสอบสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทดสอบแอกทิวิตีการสลายเม็ดเลือดแดง, การยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์, การกระจายตัวของน้ำมัน และการเกิดอิมัลชัน พบว่าส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. licheniformis* F2.2 ให้ผลบวกกับทุกการทดสอบ ซึ่งแสดงว่า *B. licheniformis* F2.2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรดเบสต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. licheniformis* F2.2 พบว่าเมื่อผ่านการบ่มน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 20-121 องศาเซลเซียส และที่ pH 2-12 พบว่าสมบัติการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก็ยังมีความเสถียร และประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดยังคงอยู่ โดยสามารถยับยั้ง *P. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าวได้มากที่สุด จากการแปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนพบว่าอาหาร MOLP ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน, แอมโมเนียมคลอไรด์และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* F2.2 ได้ดีที่สุด และเหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช โดยมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) 62.92±2.30% สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเจริญกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช พบว่าเมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหาร MOLP พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดสูงสุดเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ stationary phase ที่ 24 ชั่วโมง เมื่อสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเมธานอล 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิด โดยสามารถยับยั้ง *F. solani* ได้มากที่สุด โดยยับยั้งได้ 56.67±2.89 เปอร์เซ็นต์ และอันดับรองลงมาคือ *F. moniliforme* และ *P. oryzae* โดยยับยั้งได้ 36.54±0.00 และ 33.71±1.95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียมาทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* บนต้นข้าว พบว่าชุดการทดลองที่ใส่ราก่อน แล้วตามด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียมีความสูงของต้นข้าวสูงที่สุดเท่ากับ 13.12±5.05 เซนติเมตร และน้ำหนักของต้นข้าวเท่ากับ 41.67±0.01 มิลลิกรัม โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความสามารถในการป้องกันโรคไหม้ที่มีสาเหตุจาก *P. oryzae* ได้ และนอกจากนี้ยังมีความสามารถในปกป้องการเกิดโรค และส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวได้ เมื่อวิเคราะห์สารที่สกัดได้โดย HPLC เปรียบเทียบกับเซอร์แฟคทินมาตรฐานพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* F2.2 มีส่วนประกอบของเซอร์แฟคทินและแอนะล็อกของเซอร์แฟคทิน รวมทั้งสารสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอื่นด้วย และเมื่อเก็บตัวอย่างจากแต่ละช่วงเวลาไประเหยแห้ง แล้วทดสอบการยับยั้งรา พบว่าทุกช่วงเวลาสามารถยับยั้งราแต่ละชนิดได้ด้วยประสิทธิภาพการยับยั้งที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองเหล่านี้เสนอแนะว่า *B. licheniformis* F2.2 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นมีศักยภาพที่จะใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากรา เพื่อเป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดราทั่วไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

5972159223 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY
KEYWORD: Antifungal, Bacillus licheniformis, Biocontrol, Biosurfactant

Sirita Siammai : PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND INHIBITION OF FUNGAL PLANT PATHOGEN OF BIOSURFACTANT FROM *Bacillus licheniformis* F2.2. Advisor: Assoc. Prof. PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D. Co-advisor: Assoc. Prof. JIRAPORN THANIYAVARN

This research studied the ability to inhibit fungal plant pathogen, the production of biosurfactant, and the effect of physical factors on antifungal activity of the biosurfactant from *Bacillus licheniformis* F2.2, as well as optimal conditions to produce the biosurfactant. The result showed that *B. licheniformis* F2.2 was able to inhibit all 7 types of fungal plant pathogen, including *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Pyricularia oryzae* and *Phytophthora palmivora* with the percentage of inhibition between 34.79±6.29-44.51±1.29%. When ability to produce biosurfactant was tested using several techniques including hemolytic activity test, drop collapse test, oil displacement test, and emulsion generation test; it was found that culture supernatant of *B. licheniformis* F2.2 gave positive results for all tests which indicated that *B. licheniformis* F2.2 was able to produce biosurfactants. Effect of temperature and pH on the inhibition of fungal plant pathogens by the culture filtrate of *B. licheniformis* F2.2 showed that when incubated the culture filtrate at 20-121°C and at pH 2-12, the ability to generate emulsion of biosurfactant was stable, and the inhibition efficiency of all fungal plant pathogens were remained. By varying carbon and nitrogen sources, it was revealed that MOLP medium with sucrose as a carbon source, ammonium chloride and yeast extract as a nitrogen source was optimal for promoting the growth of *B. licheniformis* F2.2, and for producing the biosurfactant with antifungal activity with emulsion index of 24 hours (E_{24}) at 62.92±2.30%. The relationship between time of growth and the production of biosurfactant with fungal plant pathogen inhibition ability showed that by culturing *B. licheniformis* F2.2 in MOLP medium, it inhibited all 7 tested fungal plant pathogens when bacteria entered to stationary growth phase at 24 hours. When extracted biosurfactant with 100% methanol (volume/volume), it was showed that the extract was able to inhibit all 7 tested fungal plant pathogens, with the inhibition of *F. solani*, *F. moniliforme*, and *P. oryzae* at 56.67±2.89%, 36.54±0.00%, and 33.71±1.95%, respectively. After that, culture filtrate and the extracted biosurfactant were tested for their abilities to inhibit *P. oryzae* on rice plant. The result revealed that the application of *P. oryzae* prior the addition of biosurfactant resulted in the highest of height at 13.12±5.05 cm and of weight at 41.67±0.01 mg of the rice plant. The extracted biosurfactant was able to prevent rice blast disease caused by *P. oryzae*. In addition, it also showed ability to protect rice from blast disease and promote the growth of rice. The extract was analyzed with HPLC along with standard surfactin. Result indicated that the biosurfactant produced from *B. licheniformis* F2.2 were surfactin and analogs of surfactin as well as other biosurfactants. Samplings from each retention time ranges were subjected to evaporation and then testing for antifungal activity. The result showed that all samples were able to inhibit each fungus with varying efficiency. Taken together, these results suggested that *B. licheniformis* F2.2 and its biosurfactant have potential to be used as a biological control agent to control plant diseases caused by fungi, as an alternative to conventional chemical fungicides.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study:	Microbiology and Microbial Technology	Student's Signature ....
Academic Year:	2019	Advisor's Signature ....
		Co-advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ตลอดการทำวิจัย อีกทั้งยังให้การช่วยเหลือ เอาใจใส่ดูแลเป็นที่ปรึกษาในทุกอุปสรรคปัญหาต่าง ๆ ในระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนอบรมสั่งสอนและให้กำลังใจที่ดีเสมอมา และยังกรุณาแก้ไขตรวจทานและปรับปรุงเพิ่มเติมให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษา ความรู้ คำแนะนำเพิ่มเติม และข้อคิดเห็นต่าง ๆ อีกทั้งยังให้การช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ภายในห้องวิจัยของอาจารย์ ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำเพิ่มเติมและช่วยกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร และอาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ภายในห้องวิจัยของอาจารย์ ทำให้งานวิจัยของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ ๗๒ พรรษา และ ทุน ๙๐ ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้การสนับสนุนค่าเล่าเรียนและค่าใช้จ่ายในระหว่างการศึกษาตลอดจนสนับสนุนเงินอุดหนุนในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและอำนวยความสะดวกให้การวิจัยราบรื่นและเป็นไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณผู้วิจัยในห้องวิจัย 1704/13 ทุกคน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และคอยรับฟังปัญหาต่าง ๆ และขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องวิจัย 1804/15 ทุกคน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ ขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่น่ารักในห้องวิจัย 1904/15 ทุกคน ที่เป็นกำลังใจและเป็นที่ปรึกษา ขอขอบคุณนายสิรภพ ภูมิภูติกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยรับฟังเป็นที่ปรึกษา ให้ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำวิจัยมาโดยตลอด รวมไปถึงทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความช่วยเหลือ ติดตาม ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อน ๆ ที่สนับสนุน ช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาตลอดการศึกษาจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

สิริตา เสียมไหม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... ง
กิตติกรรมประกาศ .... จ
สารบัญ .... ฉ
สารบัญตาราง .... ญ
สารบัญภาพ .... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 ปริทรรศน์วรรณกรรม 4
2.1 *Fusarium moniliforme* 4
2.2 *Fusarium solani* 6
2.3 *Fusarium proliferatum* 7
2.4 *Acremonium furcatum* 8
2.5 *Pyricularia oryzae* 9
2.6 *Colletotrichum gloeosporioides* 11
2.7 *Phytophthora palmivora* 12
2.8 การป้องกันและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากรา 13
2.9 *Bacillus* spp. 17
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 27
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 27
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป 28
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ 30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3.1 แบคทีเรีย 30
3.3.2 ราก่อโรคพืช 30
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 30
3.4.1 สำหรับแบคทีเรีย 30
3.4.2 สำหรับรา 30
3.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดย *B. licheniformis* F2.2 30
3.5.1 ทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วยแบคทีเรีย (dual culture test) 30
3.5.2 ทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีผสมส่วนใสของแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 31
3.6 การทดสอบสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2 31
3.6.1 ทดสอบแอกทิวิตีการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity test) 31
3.6.2 ทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์ (drop collapse test) 31
3.6.4 ทดสอบการเกิดอิมัลชัน 32
3.7 การทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืช 33
3.7.1 ผลของอุณหภูมิ 33
3.7.2 ผลของความเป็นกรดเบส 33
3.8 การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช 33
3.8.1 แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน 33
3.8.2 ติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช 34
3.9 การสกัดและการแสดงลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2 34
3.10 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคบนต้นข้าว (*in planta*) 36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.10.1 เตรียมต้นข้าว 36

3.10.2 เตรียม *P. oryzae* 36

3.10.3 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียในการยับยั้ง *P. oryzae* บนต้นข้าว 36

3.11 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 38

บทที่ 4 ผลการทดลอง 39

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดย *B. licheniformis* F2.2 39

4.1.1 ทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วยแบคทีเรีย (dual culture test) 39

4.1.2 ทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีผสมส่วนใสของแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 42

4.2 การทดสอบสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2 44

4.2.1 ทดสอบแอกทิวิตีการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity test) 44

4.2.2 ทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์ (drop collapse test) 45

4.2.3 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement test) 45

4.2.4 ทดสอบการเกิดอิมัลชัน 46

4.3 การทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืช 46

4.3.1 ผลของอุณหภูมิ 46

4.3.2 ผลของความเป็นกรดเบส 48

4.4 การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช 49

4.4.1 แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน 49

4.4.2 ติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช 51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.5 การสกัดและการแสดงลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2 54

4.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคบนข้าว (*in planta*) 62

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 67

ภาคผนวก 75

ภาคผนวก ก 76

ภาคผนวก ข 81

บรรณานุกรม 83

ประวัติผู้เขียน 95

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 กลไกการควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในโรคหลังการเก็บเกี่ยว 16

ตารางที่ 2.2 การจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวโดยโครงสร้างทางเคมี 22

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วย *B. licheniformis* F2.2 39

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดยวิธีผสมส่วนใสของ *B. licheniformis* F2.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 42

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา.. 59

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา.. 60

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* บนข้าว โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรีย ที่เวลา 6 วันของการทดสอบ 63

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของ *F. moniliforme* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 5

รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของ *F. solani* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 7

รูปที่ 2.3 ลักษณะโคโลนีของ *F. proliferatum* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 8

รูปที่ 2.4 ลักษณะโคโลนีของ *A. furcatum* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน 8

รูปที่ 2.5 ลักษณะโคโลนีของ *P. oryzae* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน 10

รูปที่ 2.6 ลักษณะของโรคไหม้ในลำต้นข้าวสาลี (ซ้าย), ใบข้าวสาลี (กลาง), และรวงข้าวสาลี (ขวา) 10

รูปที่ 2.7 โรคข้าวไหม้ที่เกิดจาก *P. oryzae* บนต้นกล้าข้าว (ซ้าย) และที่คอและรวงข้าว (ขวา) 10

รูปที่ 2.8 ลักษณะโคโลนีของ *C. gloeosporioides* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 11

รูปที่ 2.9 อาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจาก *Colletotrichum* spp. ในมันเทศ (ซ้าย) และในสตรอเบอร์รี่ (ขวา) 12

รูปที่ 2.10 ลักษณะโคโลนีของ *P. palmivora* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน 13

รูปที่ 2.11 ลักษณะรูปร่าง zoosporangia ในรูปแบบต่าง ๆ ของ *P. palmivora* 13

รูปที่ 2.12 ลักษณะโคโลนีของ *B. licheniformis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB 18

รูปที่ 2.13 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 22

รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของอิทูริน 24

รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของพลิพาสทาทิน 24

รูปที่ 2.16 โครงสร้างทางเคมีของเซอร์แฟคทิน 24

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของ *B. licheniformis* F2.2 41
รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของ *B. licheniformis* F2.2 ที่สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:10 และ 1:1 44

รูปที่ 4.3 การสลายเม็ดเลือดแดงของ *B. licheniformis* F2.2 บน blood agar 44

รูปที่ 4.4 การยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบและชุดควบคุมผลบวก.. 45

รูปที่ 4.5 การกระจายตัวของน้ำมัน, ก. ตัวควบคุมผลลบ (อาหารเหลว LB), ข. ตัวควบคุมผลบวก (SDS) และ ค. ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2.. 45

รูปที่ 4.6 การเกิดอิมัลชัน, ก. ตัวควบคุมผลลบ (อาหารเหลว LB), ข. ตัวควบคุมผลบวก (SDS) และ ค. ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2 46

รูปที่ 4.7 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 47

รูปที่ 4.8 ดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 ที่อุณหภูมิ 20-121 องศาเซลเซียส 47

รูปที่ 4.9 ผลของความเป็นกรดเบสที่มีต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 48

รูปที่ 4.10 ดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 ที่ pH 2-12.. 49

รูปที่ 4.11 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ที่ 24 ชั่วโมง ของอาหาร MOLP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน 50

รูปที่ 4.12 ดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของอาหาร MOLP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน... 51

รูปที่ 4.13 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง ของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เลี้ยงในอาหาร MOLP ที่แปรผันซูโครส+แอมโมเนียมไนเตรต (S-AN)... 52

รูปที่ 4.14 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง ของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เลี้ยงในอาหาร LB 53

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.15 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง ของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เลี้ยงในอาหาร MOLP........ 53

รูปที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เลี้ยงในอาหาร MOLP ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง 54

รูปที่ 4.17 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้, ก. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่ละลายด้วยเอธานอล, ข. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่ระเหยแห้งแบบสุญญากาศ เพื่อเอาเอธานอลออก และ ค. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่ละลายด้วย Tris HCl pH 7.5 และผ่านการกรองแล้ว 55

รูปที่ 4.18 การเกิดอิมัลชัน, ก. ตัวควบคุมผลลบ (Tris HCl pH 7.5), ข. ตัวควบคุมผลบวก (SDS) และ ค. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้ 55

รูปที่ 4.19 การกระจายตัวของน้ำมัน, ก. ตัวควบคุมผลลบ (Tris HCl pH 7.5), ข. ตัวควบคุมผลบวก (SDS) และ ค. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้จาก *B. licheniformis* F2.2 56

รูปที่ 4.20 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดด้วยเมธานอล 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วชะสารสกัดด้วยเอธานอล 56

รูปที่ 4.21 การยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้, ก. *F. moniliforme*, ข. *F. solani*, ค. *F. proliferatum*, ง. *P. oryzae*, จ. *C. gloeosporioides*, ฉ. *P. palmivora* และ ช. *A. furcatum* 57

รูปที่ 4.22 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC, ก. สารมาตรฐานเซอร์แฟคทิน และ ข. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. licheniformis* F2.2 58

รูปที่ 4.23 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา 59

รูปที่ 4.24 ความสูงและน้ำหนักของต้นข้าว ที่เวลา 6 วันของการทดสอบ 63

บทที่ 1
บทนำ

การเติบโตของจำนวนประชากรโลกที่เพิ่มมากขึ้น ขณะที่พื้นที่ในการทำการเกษตรมีจำกัด หรืออาจน้อยลงเพราะส่วนหนึ่งต้องนำมาใช้เป็นที่อยู่อาศัย ทำให้เกิดปัญหาผลผลิตทางการเกษตรไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภค เพราะฉะนั้น จึงจำเป็นต้องใช้พื้นที่ทางการเกษตรที่มีอยู่ในการเพาะปลูกพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อการบริโภคภายในประเทศ และการส่งออกไปขายยังต่างประเทศ ซึ่งเป็นรายได้หลักของประเทศ ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ลดผลผลิตของพืช คือ แมลงและโรคพืช ซึ่งโรคพืชเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลงและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ ก่อให้เกิดความเสื่อมสภาพของสิ่งแวดล้อม และทรัพยากรต่าง ๆ (He และคณะ, 2016) โรคพืชที่เกิดจากจุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรีย ไวรัส รวมทั้งโรคระบาดที่เกิดจากแมลงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหาย (Sankaran และคณะ, 2010) โดยเฉพาะรานั้น จัดเป็นสาเหตุสำคัญที่สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชเศรษฐกิจมากมาย ซึ่งสร้างความเสียหายให้แก่พืชผลทางการเกษตรมากที่สุด ทำให้การเพาะปลูกไม่ได้ผล ผลผลิตและคุณภาพของพืชลดลง เช่น พบการระบาดของโรครากเน่าและโคนเน่า ที่เกิดจาก *Phytophthora palmivora* ในทุเรียน, โรคราน้ำค้าง ที่เกิดจาก *Peronosclerospo rasorghi* ในข้าวโพดฝักสด (ไทยรัฐฉบับพิมพ์, 2560; กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561), โรครากเน่า และทำให้ต้นกล้างอกน้อยในถั่วเหลือง ที่เกิดจาก *Fusarium proliferatum* (Chang และคณะ, 2015), โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ที่เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้ เช่น มะละกอ ซึ่งเกิดจาก *Colletotrichum gloeosporioides* (Barrios-Roblero และคณะ, 2019) และโรคไหม้ในข้าวที่เกิดจาก *Pyricularia oryzae* (Azizi และคณะ, 2019) เป็นต้น ในอดีตจนถึงปัจจุบันมีการใช้สารเคมีกำจัดราก่อโรคเหล่านี้ เพื่อควบคุมการเกิดโรค และการเน่าเสียหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งมักใช้ในปริมาณมากหรือเป็นเวลาที่นานเกินไปซึ่งสารเคมีที่ใช้อาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกรเอง และผู้ที่บริโภคพืชผลทางการเกษตร นอกจากนี้ยังพบว่าราก่อโรคสามารถต้านทานต่อสารเคมีได้มากขึ้น และสารเคมียังอาจไปทำลายแมลง รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ ตลอดจนเกิดการสะสมสารเคมีซึ่งก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Gong และคณะ, 2006; Vitullo และคณะ, 2012) วิธีการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมีและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้รับการพัฒนามากขึ้น ซึ่งวิธีทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันคือ การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (biocontrol) ซึ่งเป็นวิธีการควบคุมและป้องกันโรคพืชโดยใช้สิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูตามธรรมชาติของศัตรูพืชเหล่านั้น หรือใช้จุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นจากจุลินทรีย์ในการใช้ควบคุมโรคพืช วิธีนี้เป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีราคาถูก บางชนิดเกษตรกรสามารถผลิตใช้เองได้ และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ (Zhao และคณะ, 2010; Jiang และคณะ, 2017)

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* พบได้ทั่วไปในพืชและดิน เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถทนความร้อนเนื่องจากสร้างเอนโดสปอร์ และมีความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคในพืช (Wang และคณะ, 2014) รวมทั้งสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วย (Idriss และคณะ, 2002; Bach และคณะ, 2016) นอกจากนี้ *Bacillus* ยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด รวมทั้งสารระเหย, ลิโพเพปไทด์, เพปไทด์ และโปรตีน ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเอนไซม์และการผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น ใช้ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ (free supernatant; CFS) ของ *Bacillus licheniformis* D1 ซึ่งมีโปรตีนต้านจุลชีพ (antimicrobial protein) ยับยั้งฟิล์มชีวภาพ (biofilm) ที่สร้างจาก *Vibrio alginolyticus* และ *Pseudomonas gessardii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในฟาร์มสัตว์น้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ 82.35 ± 1.69 และ 82.52 ± 1.11% ตามลำดับ และยังสามารถยับยั้งการสร้าง biofilm อีกด้วย (Hamza และคณะ, 2018) *Bacillus* spp. ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการประยุกต์ใช้ด้านการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (Chen และคณะ, 2009; Dimkić และคณะ, 2013) เช่น ใช้ *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้จากผิวผลส้มมาควบคุมราสีเขียวและราสีส้มที่เกิดจาก *Penicillium digitatum* และ *Penicillium italicum* ตามลำดับ (Dimkić และคณะ, 2013) โดยยังมีรายงานว่า *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถผลิตยาปฏิชีวนะที่เป็นประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด อีกทั้งยังพบว่า *Bacillus pumilus* ผลิตสารยับยั้งการเจริญของราหลายชนิด เช่น *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* และมีรายงานว่า *B. subtilis* รวมทั้ง *Bacillus licheniformis* สามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจาก *Botrytis cinerea* และ *Phytophthora* ได้ (Jiang และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2014; Kilani-Feki และคณะ, 2016) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ *Bacillus* spp. ผลิตขึ้นมีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ ได้แก่ ลิโพเพปไทด์ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่จุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สร้างขึ้น ซึ่งเป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต หนึ่งในสารกลุ่มนี้ยังรวมถึงชนิดที่เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) นอกเหนือจากนี้ ลิโพเพปไทด์ยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมวัสดุ เป็นที่สนใจทางเทคโนโลยีชีวภาพ และทางเภสัชกรรม (Ron และ Rosenberg, 2001; Sen, 2010; Banat และคณะ, 2014; Liu และคณะ, 2016; Zhao และคณะ, 2016) ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus* spp. เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากรา จำเป็นที่จะต้องผลิตให้ได้ในปริมาณมาก เบื้องต้นจึงจำเป็นต้องหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสาร ซึ่งได้รับอิทธิพลมาจากองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เช่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุ และวิตามิน รวมทั้งปัจจัยทางกายภาพ เช่น ค่าความเป็นกรดเบส (pH) อุณหภูมิ และเวลา เป็นต้น จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ที่แตกต่างกัน เพื่อปรับปรุงทั้งการผลิตชีวมวลและการผลิตไซคลิกลิโพเพปไทด์ (cyclic lipopeptide, CLP) ของ *B. amyloliquefaciens* พบว่าน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อัตราส่วน 10:1 ช่วยเพิ่มมวลชีวภาพและผลผลิต CLP อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสูตรอาหารเดิมที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ CLP ที่ผลิตในอาหารชนิดนี้ยังช่วยให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวเซอร์แฟคทิน (surfactin) ได้เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังมีไอโซฟอร์ม (isoform) ของเฟนไจซิน (fengycin) เพิ่มขึ้นอีกด้วย ทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคแผลจุดในมะเขือเทศและพริกไทยที่เกิดจาก *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแปรผันแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ส่งผลต่อการผลิตและชนิดของ CLP (Medeot และคณะ, 2017) งานวิจัยก่อนหน้านี้จากวิทยานิพนธ์ของบงกช สุทธิวาณิชกุล (2540) รายงานว่า *B. licheniformis* F2.2 สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารแบบกำหนดสูตร (define medium) ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ pH 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าเป็นประกอบด้วยสารชนิดลิโพเพปไทด์ เช่น เซอร์แฟคทิน และพลิพาสทาทิน (plipastatin) (Thaniyavarn และคณะ, 2003) และจากงานวิจัยของธัญญพัทธ์ จิราสิตธนวัชร์ (2560) พบว่า *B. licheniformis* F2.2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช และสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำ *B. licheniformis* F2.2 มาแปรผันเพื่อหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช และแสดงลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการควบคุมราก่อโรคในพืชต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตและแสดงลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. licheniformis* F2.2 และเพื่อทดสอบการยับยั้งราที่ก่อโรคพืชโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

บทที่ 2
ปริทรรศน์วรรณกรรม

ภายในปี พ.ศ. 2593 จำนวนประชากรโลกจะเติบโตเพิ่มมากขึ้นต่อเนื่อง โดยคาดว่าจะมีจำนวนมากถึง 9.7 พันล้านคน ซึ่งส่งผลต่อความต้องการทางด้านอาหารที่เพิ่มมากขึ้นด้วย ในขณะที่พื้นที่ทำการเกษตรมีจำกัด ดังนั้นวิธีรับมือที่ได้รับความสนใจมากที่สุดคือ การเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่และลดการสูญเสียผลผลิต (Raymaekers และคณะ, 2020) โรคพืชเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรลดลง ซึ่งสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากในอุตสาหกรรมเกษตร และป่าไม้ทั่วโลก อีกทั้งยังลดความมั่นคงทางด้านอาหารในครัวเรือน ระดับประเทศและระดับโลก ก่อให้เกิดความเสื่อมสภาพของสิ่งแวดล้อม และทรัพยากรต่าง ๆ (He และคณะ, 2016) โรคพืชที่เกิดจากจุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรีย ไวรัส รวมทั้งโรคระบาดที่เกิดจากแมลงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหาย (Sankaran และคณะ, 2010) การสูญเสียพืชที่เกิดขึ้นจริงในไร่ที่เกิดจากโรคหรือแมลงศัตรูพืชได้รับการประเมินในระดับโลกว่าเกิดขึ้นตั้งแต่ 17-30% ในพืชสำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี (21.5%), ข้าว (30.0%), ข้าวโพด (22.5%), มันฝรั่ง (17.2%) และถั่วเหลือง (21.4%) (Savary และคณะ, 2019) ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพของการควบคุมโรคพืชจึงคาดว่าจะมีส่วนสำคัญต่อความต้องการคุณภาพอาหาร และปริมาณอาหารที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก (Savary และคณะ, 2012) โดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากรานั้น จัดเป็นสาเหตุสำคัญที่สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชเศรษฐกิจมากมาย ซึ่งสร้างความเสียหายให้แก่พืชผลทางการเกษตรมากที่สุด ทำให้การเพาะปลูกไม่ได้ผล ผลผลิตและคุณภาพของพืชลดลง (Singh และคณะ, 2019)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1 *Fusarium moniliforme*

ลักษณะโคโลนีของ *F. moniliforme* บนอาหาร PDA เป็นสายใยฟู สีขาว เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยจะมีสีชมพูแซมม่วงไปจนถึงสีชมพูอมม่วง (รูปที่ 2.1) ราชนิดนี้สร้างสปอร์หรือคอนิเดียขนาดเล็ก (microconidium) จำนวนมาก โดยสร้างเป็นกลุ่ม (false head) ที่ต่อกันเป็นสายยาวบนก้านชูสปอร์ (microconidiophore) แบบโมโนเฟียไลด์ (monophialide) คอนิเดียขนาดเล็กมีรูปร่างเป็นรูปไข่ (oval) หรือรูปกระบอง (club-shaped) มี 1 เซลล์ ไม่มีสี ส่วนสปอร์หรือคอนิเดียขนาดใหญ่ (macroconidium) จะสร้างบนก้านชูสปอร์ (conidiophore) แบบโมโนเฟียไลด์ที่แตกกิ่งก้าน และรวมกันเป็นกลุ่ม (mass) คอนิเดียขนาดใหญ่มีรูปร่างเป็นกระสวย หรือโค้งเล็กน้อยจนถึงเกือบตรง มีผนังกั้น เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) ไม่มีสี ราชนิดนี้ไม่สร้างคลามัยโดสปอร์ (chlamydospore) (อภิรัชต์ และคณะ, 2562) ทั้งนี้

สามารถพบ *F. moniliforme* ได้ทั่วไปโดยอาศัยอยู่ในดิน (soil-borne) หรือติดมากับเมล็ดพืช (seed-borne) (Hebbar และคณะ, 1992) ซึ่งก่อให้เกิดโรคโดยเฉพาะในข้าวโพด ช่วงก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวในฝักข้าวโพด ส่งผลให้เกิดโรคฝักเน่า เมล็ดเน่า รากของต้นกล้าเน่า และการเหี่ยว และยังยับยั้งการงอกของเมล็ด ทำให้ต้นกล้าไม่แข็งแรงด้วย เชื้อนี้ยังทำให้เกิดโรคถอดฝักดาบของข้าว (Bakanae disease) ซึ่งเป็นโรคที่รายงานการพบครั้งแรกในญี่ปุ่น และปัจจุบันกระจายอย่างกว้างขวางในเอเชีย และทั่วโลก โดยมีอาการของโรคทั่วไปคือ มีการยืดตัวที่ผิดปกติของต้นกล้า นอกจากนี้ *F. moniliforme* ยังทำให้เกิดโรคในข้าว โดยทำให้เกิดอาการโคนเน่า (foot rot), ต้นกล้าเน่า (seedling rot), เมล็ดเป็นหมัน (grain sterility), เกิดการเปลี่ยนสีของเมล็ดข้าว (grain discoloration) ราชนิดนี้ยังทำให้เกิดโรคลำต้นเน่าในข้าวฟ่าง, ภาวะติดเชื้อภายใน (endosepsis) ของมะเดื่อ และโรคโคนเน่าขาด (crown rot) ของหน่อไม้ฝรั่งด้วย (Rosales และ Mew, 1997) ซึ่งโรคต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตทางการเกษตรอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราชนิดนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่เป็นพิษ เช่น ฟูซาริน (fusarin), โมนิลิฟอร์มิน (moniliformin), ฟูโมนิซิน (fumonisin) และท็อกซินอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพทางอ้อมในสัตว์และมนุษย์เมื่อบริโภคเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนราชนิดนี้ อีกทั้งยังทำให้เกิดความเสียหายกับระบบการเผาผลาญ และนำไปสู่ความเสียหายของระบบอวัยวะเฉพาะต่อไป (Krishnan และคณะ, 2019) เช่น ฟูโมนิซินทำให้เกิดอาการบวมน้ำที่ปอดในสุกร, มะเร็งตับในหนู และมะเร็งหลอดอาหารของมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟูโมนิซิน B1 ที่มีผลกระทบที่เป็นพิษมากที่สุด (Han และคณะ, 2017)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALO

รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของ *F. moniliforme* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2.2 *Fusarium solani*

ลักษณะโคโลนีของ *F. solani* บนอาหาร PDA มีเส้นใยฟู มีสีขาวนวล เมื่ออายุมากขึ้นมีสีครีม (รูปที่ 2.2) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราชนิดนี้ โคโลนีจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีสีขาวไปจนถึงสีครีม และจะกลายเป็นสีน้ำตาลเมื่อมีการสร้างสปอร์หรือคอนิเดียขนาดใหญ่บนก้านชูสปอร์ ซึ่งอาจแตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้าน คอนิเดียขนาดใหญ่มักมีจำนวนมาก ไม่มีสี มีรูปทรงกระบอกจนถึงรูปไข่ที่โค้งเว้าเล็กน้อย มี 1-2 เซลล์ และผนังทั้งสองด้านขนานกัน เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า มีขนาดสั้น มีผนังกั้น และสร้างคลามัยโดสปอร์สีน้ำตาล รูปไข่หรือทรงกลม ผนังเรียบหรือขรุขระ ลักษณะเกิดเดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย และสร้างสปอร์หรือคอนิเดียขนาดเล็กเป็นกลุ่มบนก้านชูสปอร์ ซึ่งอาจแตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้าน โดยคอนิเดียขนาดเล็กมีลักษณะรูปไข่ รูปไต มี 1-2 เซลล์ ไม่มีสี กลุ่มของคอนิเดียขนาดเล็กมีขนาดค่อนข้างใหญ่เมื่อเทียบกับของ *F. moniliforme* (อภิรัชต์ และคณะ, 2562) ราชนิดนี้พบทั้งที่อาศัยอยู่ในดินและเจริญเป็นเอนโดไฟต์ (endophyte) ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชเจ้าบ้าน (host) รวมทั้งยังเจริญโดยเป็นผู้ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ (saprotroph) ด้วย (Skiada และคณะ, 2019) ราชนิดนี้สามารถก่อโรคในถั่ว ทำให้เมล็ดเน่า หรือก่อโรคหลังจากที่เมล็ดงอกเป็นต้นอ่อนแล้ว แต่เกิดการเน่าก่อนที่จะโผล่พ้นดิน และก่อโรคหลังจากที่ต้นกล้างอกโผล่พ้นดินขึ้นมาแล้ว โดยอาการเริ่มแรกจะเกิดรอยช้ำใส ๆ ที่บริเวณโคนของต้นกล้า ซึ่งรอยช้ำจะแผ่ขยายออกรอบโคนต้น และกลายเป็นสีน้ำตาล และเนื้อเยื่อส่วนนี้จะคอดลง ทำให้ต้นกล้าหักพับที่ระดับคอดิน (Eke และคณะ, 2016) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเน่าของไฮโปคอทิล (hypocotyl rot) และราก ทำให้สูญเสียผลผลิต 100% ในพันธุ์ที่อ่อนแอ ราชนิดนี้ยังทำให้เกิดโรครากเน่าในมะกอก (Ben Amira และคณะ, 2017), และทำให้เกิดโรคเน่าแห้ง ซึ่งเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญที่มีผลต่อการเก็บรักษามันฝรั่งและเมล็ดหลังจากการปลูก (D'Ippólito และคณะ, 2010) โรคพืชที่เกิดจาก *F. solani* ทำให้ปริมาณผลผลิตทางการเกษตรลดลง และส่งผลทำให้เกิดความความเสียหายทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้ยังมีรายงานการก่อโรคของรานี้ในมนุษย์ด้วย โดยพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่สำคัญที่ทำให้เกิดกระจกตาอักเสบ (keratitis), การติดเชื้อราที่เล็บ (onychomycoses) และการติดเชื้อราที่ลุกลาม ทั้งในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและไม่มีภูมิคุ้มกัน (Menezes และคณะ, 2016)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของ *F. solani* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2.3 *Fusarium proliferatum*

ลักษณะโคโลนีของ *F. proliferatum* บน PDA พบว่าเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นใยสีขาวฟูหนาแน่น เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีส้ม สีส้มชมพู จนถึงสีชมพูม่วง (รูปที่ 2.3) ลักษณะสัณฐานวิทยาของราชนิดนี้ มีสปอร์หรือคอนิเดียขนาดเล็กที่เกิดบนก้านชูสปอร์ทั้งแบบเป็นกลุ่มและต่อกันเป็นสาย แต่จำนวนสปอร์ในสายจะน้อยกว่า *F. moniliforme* และไม่สร้างคลามัยโดสปอร์ (อภิรัชต์ และคณะ, 2562) ราชนิดนี้มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางและสามารถทำให้เกิดโรคที่เป็นอันตรายต่อพืชเจ้าบ้านที่หลากหลาย เช่น กระเทียม ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวเดือย ถั่วเหลือง มะเขือเทศ และว่านหางจระเข้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคเน่าของช่อดอกของข้าว (rice spikelet rot disease) ซึ่งทำให้เมล็ดข้าวเน่าและเปลี่ยนสี ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในเมล็ดและทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง อาการของโรคนี้ในช่วงแรกจะเกิดขึ้นเป็นจุดสีแดงหรือสีเหลืองอมน้ำตาล ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีน้ำตาลเหลือง หรือรอยโรคสีน้ำตาลเข้มในระยะต่อมา เมล็ดข้าวที่ติดเชื้อจะมีราสีขาวปกคลุมเมล็ดข้าว ซึ่งส่งผลให้เกิดความแห้งของข้าว และส่งผลกระทบต่อทั้งผลผลิตข้าวและคุณภาพของเมล็ดข้าว (Chang และคณะ, 2015; Lei และคณะ, 2019) *F. proliferatum* เป็นราที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารพิษได้ เช่น กรดฟูซาริก, ฟูโมนิซิน, ฟูซาโพรลิเฟอริน (fusaproliferin) และโมนิลิฟอร์มิน (moniliformin) ที่ส่งผลต่อความปลอดภัยของอาหาร, สุขภาพของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงที่กินพืชผลทางการเกษตรหรือเมล็ดที่ติดเชื้อรา (Avasthi และคณะ, 2018) ในมนุษย์นั้น ฟูโมนิซินเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (กลุ่ม 2B สารก่อมะเร็ง) และเกี่ยวข้องกับการเกิดความบกพร่องของท่อประสาทในทารกแรกเกิด (Vismer และคณะ, 2019) ปัจจุบันได้รับการจัดอันดับว่าเป็นปัญหาด้านการเกษตรและสาธารณสุข

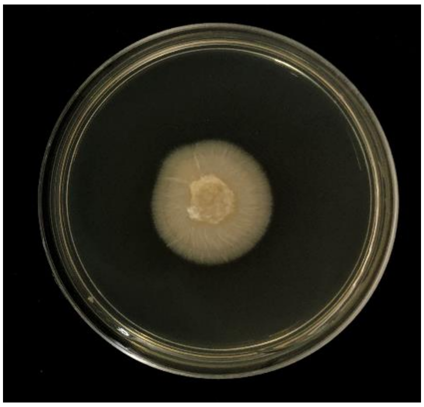
ที่สำคัญทั่วโลก เนื่องจากสารพิษที่ผลิตโดย *F. proliferatum* สามารถปนเปื้อนธัญพืชและผลไม้ที่เก็บเกี่ยวได้ และส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์เลี้ยง (Li และคณะ, 2016)

รูปที่ 2.3 ลักษณะโคโลนีของ *F. proliferatum* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2.4 *Acremonium furcatum*

ลักษณะโคโลนีของ *A. furcatum* บนอาหาร PDA มักจะเจริญเติบโตช้า สร้างเส้นใยสีขาว เมื่ออายุมากจะสร้างเส้นใยสีเหลืองอ่อนซีดหรือสีส้ม และจะเจริญแนบราบกับอาหารคล้ายหนังนิ่ม ๆ ลักษณะเส้นใยบนอาหารรวมกันเป็นมัด (hyphal stand) ส่วนปลายเรียวแหลมค่อย ๆ ฟูขึ้น (รูปที่ 2.4) ราชนิดนี้เส้นใยมีผนังกั้น สร้างสปอร์หรือคอนิเดียแบบเซลล์เดียว เป็นรูปไข่หรือเกือบกลมหรือรูปทรงกระบอก ไม่มีสี บนก้านชูสปอร์ที่มีลักษณะผอมยาว ส่วนมากเกิดแบบแตกแขนง ปกติแล้วเส้นใยจะไม่มีสี พบได้ในพืชที่ตายแล้ว และในดิน โดยเจริญเติบโตโดยเป็นผู้ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ (saprotroph) และเป็นราก่อโรคในพืช (Summerbell และคณะ, 2011)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 2.4 ลักษณะโคโลนีของ *A. furcatum* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.5 *Pyricularia oryzae*

ลักษณะโคโลนีของ *P. oryzae* บนอาหาร PDA มีสีขาวถึงเทา เมื่ออายุมากจะสร้างเส้นใยสีเทาเข้ม (รูปที่ 2.5) มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า ราชนิดนี้มีการสร้างสปอร์หรือคอนิเดียเป็นรูปกรวยหรือคล้ายหยดน้ำที่มีผนังกั้น บนก้านชูสปอร์ที่มีสีเทา ระหว่างที่ราชนิดนี้อยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชจะสามารถใช้อาหารจากเซลล์พืช 2 รูปแบบคือ แบบ biotrophy คือ ใช้สารอาหารจากเซลล์ที่มีชีวิต และแบบ necrotrophy ที่ใช้สารอาหารจากเซลล์ที่ไม่มีชีวิตหรือเซลล์ที่ตายแล้ว ราชนิดนี้มีพัฒนาการเพื่อให้สามารถอยู่ในเซลล์พืช โดยสามารถสร้างโครงสร้างการติดเชื้อที่ซับซ้อน และแพร่กระจายภายในเซลล์เจ้าบ้านได้โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคที่มองเห็นได้ ราชนิดนี้ทำให้เกิดโรคไหม้ (blast) ในพืชตระกูลหญ้าหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะข้าว และไม้ยืนต้น รวมถึงธัญพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าวสาลี (รูปที่ 2.6) ข้าวบาร์เลย์ และลูกเดือย (Azizi และคณะ, 2019) ในข้าวนั้น สามารถสร้างความเสียหายให้ข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โรคใบไหม้ในข้าวเป็นหนึ่งในโรคที่ร้ายแรงที่สุดของข้าวที่ปลูก และสามารถทำลายข้าวได้มากพอที่จะเลี้ยงคนได้ 60 ล้านคนทุกปี (Forlani และคณะ, 2011) การติดเชื้อจะสร้างความเสียหายให้ข้าวประมาณ 10-30% ของการเก็บเกี่ยวข้าวทั่วโลก ในระยะต้นกล้า ใบของต้นข้าวจะเกิดรอยโรครูปเพชรที่มีตรงกลางเป็นสีเทามีขอบสีน้ำตาล ซึ่งเป็นจุดเล็ก ๆ และแผลอาจขยายตัวรวมกันลุกลามทั้งใบ (Agrios และ George, 2005) (รูปที่ 2.7 (ซ้าย)) ราชนิดนี้สามารถติดเชื้อที่เนื้อเยื่อเหนือพื้นดินของต้นข้าว และยังได้รับการยอมรับว่าเป็นราที่มีเมล็ดเป็นพาหะซึ่งสามารถแพร่กระจายผ่านเมล็ดที่ติดเชื้อ ดังนั้นโรคไหม้ในข้าวจึงเป็นภัยคุกคามที่สำคัญต่อการผลิตข้าวเนื่องจากเชื้อโรคสามารถติดเชื้อที่รวงข้าวได้ และส่งผลให้สูญเสียผลผลิตอย่างมาก และสูงถึง 100% ในข้าวสายพันธุ์ที่อ่อนแอ โดยรวงข้าวที่ติดเชื้อ จะมีเมล็ดที่มีขนาดเล็กและหดตัว ทำให้มีน้ำหนักจำเพาะต่ำ ในรวงข้าวที่แก่จะพบรอยช้ำที่คอรวง ทำให้รวงข้าวหักง่าย (รูปที่ 2.7 (ขวา)) (Martínez และคณะ, 2019) และยังทำให้รวงข้าวมีสีซีด (bleaching) เกิดการปิดกั้นการขนส่งสารอาหารไปยังส่วนหัวของข้าว ทำให้เกิดลักษณะฟอกขาว และเป็นอุปสรรคในการพัฒนาเมล็ด นอกจากนี้ราชนิดนี้สามารถผลิตสารพิษได้หลายชนิด เช่น ไพริคูลาริน (pyricularin) และ กรด α-พิโคลินิก (Agrios และ George, 2005; Fernandez และ Orth, 2018)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 2.5 ลักษณะโคโลนีของ *P. oryzae* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

รูปที่ 2.6 ลักษณะของโรคไหม้ในลำต้นข้าวสาลี (ซ้าย), ใบข้าวสาลี (กลาง), และรวงข้าวสาลี (ขวา)

ที่มา : (Cruz and Valent, 2017)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

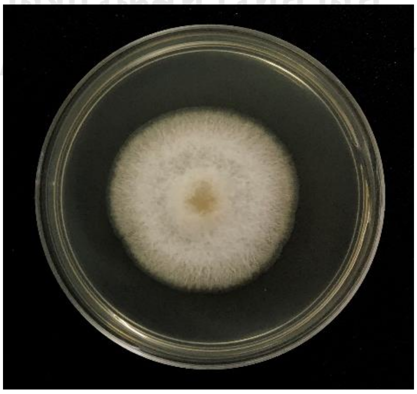
รูปที่ 2.7 โรคข้าวไหม้ที่เกิดจาก *P. oryzae* บนต้นกล้าข้าว (ซ้าย) และที่คอและรวงข้าว (ขวา)

ที่มา : (Boddy, 2016)

2.6 *Colletotrichum gloeosporioides*

โคโลนีของราชนิดนี้มักจะมีสีคล้ำ มีเส้นใยสีขาวฟู (รูปที่ 2.8) และมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ลักษณะสัณฐานวิทยาประกอบด้วยเส้นใยสานกันจนกลายเป็นกลุ่มก้อนที่เรียกว่าสเคลอโรเทีย (sclerotia) สีดำจำนวนมาก และสปอร์หรือคอนิเดียที่มีเซลล์เดียว ไม่มีสีหรือมีสีน้ำตาลอ่อน รูปไข่หรือยาวรี รูปร่างตรงหรือโค้ง ราชนิดนี้ทำให้เกิดโรคพืชที่สำคัญคือ โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) และโรคผลเน่า (fruit rotting disease) โดยเป็นราที่ก่อโรคกับพืชได้มากกว่า 1,000 สายพันธุ์ของพืช ในหลายพื้นที่ของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์พืชเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เช่น กล้วย, มะม่วง, ส้ม, มะละกอ, มะม่วงหิมพานต์, อะโวคาโด และโกโก้ ซึ่งอาการของโรคเริ่มจากแผลจุดเล็ก ๆ สีน้ำตาล แล้วค่อย ๆ แผ่ขยายใหญ่ขึ้น *C. gloeosporioides* สามารถติดเชื้อในระหว่างการเจริญเติบโต และการพัฒนา บุกรุกใบ ดอก และผลในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว โรคนี้เกิดจากการติดเชื้อในผลไม้ขณะอายุน้อย แต่อย่างไรก็ตามในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวผลไม้ที่ได้รับความเสียหายจะแสดงอาการรุนแรงโดยมีจุดด่างดำที่เด่นชัดซึ่งควบคุมได้ยาก และนำไปสู่ผลผลิตและคุณภาพพืชผลที่ลดลง และทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก (España และคณะ, 2017; Feng และคณะ, 2019; Rajaofera และคณะ, 2019) ราชนิดนี้ยังก่อโรคในมันเทศซึ่งจะพัฒนาแผลบนใบ และลำต้น (รูปที่ 2.9 (ซ้าย)) ส่งผลให้พื้นที่ผิวสังเคราะห์แสงที่มีประสิทธิภาพของพืชลดลง และยังส่งผลกระทบต่อการผลิตหัวอีกด้วย โรคแอนแทรคโนสสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดวงจรการผลิตทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงต้นกล้า และระยะปลูกของต้นสตรอเบอร์รี่ ซึ่งสตรอเบอร์รี่ที่ติดเชื้ออาจพัฒนาแผลในทุกส่วนของพืช และทำให้พืชตายในที่สุด (รูปที่ 2.9 (ขวา)) (Han และคณะ, 2018)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHUL



รูปที่ 2.8 ลักษณะโคโลนีของ *C. gloeosporioides* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

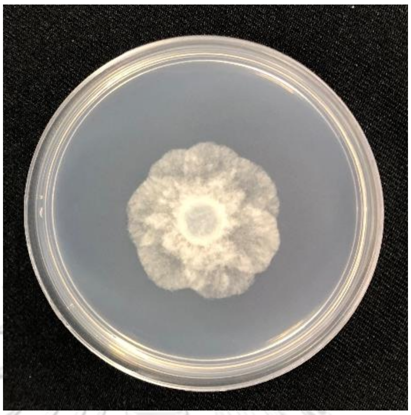
รูปที่ 2.9 อาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจาก *Colletotrichum* spp. ในมันเทศ (ซ้าย) และในสตรอเบอร์รี่ (ขวา)

ที่มา : (Han และคณะ, 2018)

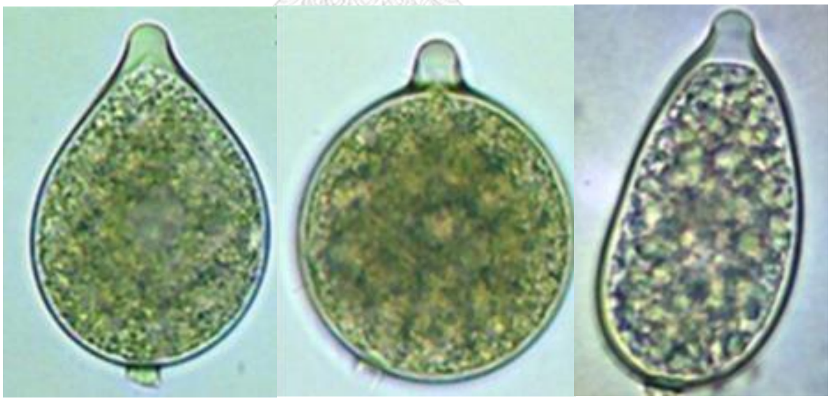
2.7 *Phytophthora palmivora*

ลักษณะโคโลนีของ *P. palmivora* บนอาหาร V8 มีลักษณะเป็นสีขาว (รูปที่ 2.10) เจริญเติบโตรวดเร็ว สร้างซูโอสปอร์ (zoospore) ในซูโอสปอแรงเจีย (zoosporangia) รูปร่างรีหรือรูปไข่ ซึ่งอาจมีรูปร่างที่แตกต่างกันบ้างเล็กน้อยตามชนิดของพืชที่ราเข้าทำลาย (รูปที่ 2.11) โดยสร้างอยู่บนก้านชูสปอร์ (zoosporangiophore) ซูโอสปอแรงเจียหลุดจากก้านชูสปอร์ได้ง่ายเมื่ออายุมาก ราชนิดนี้จัดเป็นราน้ำ (water mold) ซึ่งพบได้ในน้ำและดินที่ชื้นแฉะ ก่อโรคแพร่หลายในพืชเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน โดยจะติดเชื้อในส่วนต่าง ๆ ของพืช ทำให้เกิดผลเน่า แผลสะเก็ดที่ต้น กิ่งก้าน และใบไหม้ สามารถก่อโรคได้ในพืชหลายชนิด เช่น ก่อโรคในโกโก้ที่อาจเกิดขึ้นในทุกขั้นตอนของการเจริญ และยังสามารถทำให้เกิดความเสียหายแก่ต้นกล้าอ่อน เนื้อเยื่อพืชที่เจริญเต็มที่แล้ว และทำให้ฝักเน่า (pod rot) หรือฝักดำ (black pod) ทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตรายปีสูงถึง 90% ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม (Hanada และคณะ, 2009) การติดเชื้อของฝักมักเกิดจากซูโอสปอร์ (zoospore) ที่กระจายไปตามน้ำทำให้เกิดแผลที่มีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบนฝัก ฝักเน่าเกิดจากเส้นใยของราแพร่กระจายผ่านเนื้อเยื่อฝัก และสปอร์ที่แพร่กระจายโดยสายฝนไปยังพื้นที่ต่าง ๆ ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรค ได้แก่ ปริมาณน้ำฝนทั้งหมด ความชื้น และความต้านทานของพืชเจ้าบ้าน (Purwantara และคณะ, 2015) ราน้ำชนิดนี้ยังทำให้เกิดโรคตาเน่าในมะพร้าว (bud rot disease) (Harris และคณะ, 1984) และยังเป็นสาเหตุของใบร่วงหล่น และเกิดแถบสีดำในต้นยาง ราน้ำชนิดนี้จะติดเชื้อที่ก้านใบทำให้ใบร่วงหล่นก่อนกำหนด และโจมตีพื้นผิวที่ใช้กรีดยางทำให้เกิดน้ำยางได้ไม่ดี (Chinnapun และคณะ, 2009) ราน้ำชนิดนี้ยังสามารถก่อโรคได้ในปาล์ม โดยสามารถติดเชื้อในเนื้อเยื่ออ่อนของใบ ส่วนที่เจริญ และตา และแพร่กระจายไปยังใบใกล้เคียง เนื้อเยื่อเหล่านี้

เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของราชนิดนี้ และก่อให้เกิดการติดเชื้อซ้ำ ๆ เนื้อเยื่อที่เน่าเปื่อยจะดึงดูดแมลง ซึ่งกระตุ้นกระบวนการย่อยสลายของต้นอ่อนปาล์ม นอกจากนี้ยังสร้างความเสียหายกับการผลิตพืชตระกูลแตง พริกไทย มะเขือเทศ และพืชผักอื่น ๆ ทั่วโลก ราชนิดนี้ยังทำให้พืชร่วงโรย รากเน่า โคนเน่าขาด ต้นกล้าเน่า ใบและลำต้นเสียหาย และผลเน่า ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตร (Moreno-Chacón และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.10 ลักษณะโคโลนีของ *P. palmivora* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 2.11 ลักษณะรูปร่าง zoosporangia ในรูปแบบต่าง ๆ ของ *P. palmivora*
ที่มา : (Hung และคณะ, 2015)

2.8 การป้องกันและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากรา

ในอดีตจนถึงปัจจุบันมีการใช้สารเคมีกำจัดราก่อโรคเหล่านี้เพื่อควบคุมการเกิดโรคและการเน่าหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งมักใช้สารเคมีในปริมาณมากหรือใช้เป็นระยะเวลาที่นานเกินไป ซึ่งสารเคมีที่ใช้อาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้ที่บริโภคพืชผลทางการเกษตร นอกจากนี้ยังพบว่า

ราก่อโรคสามารถต้านทานต่อสารเคมีได้มากขึ้น และสารเคมียังอาจไปทำลายแมลง รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ ตลอดจนเกิดการสะสมสารเคมีซึ่งก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Gong และคณะ, 2006; Vitullo และคณะ, 2012) วิธีการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมีและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้รับการพัฒนามากขึ้น ซึ่งเรียกว่า วิธีทางชีวภาพ (biological control)

วิธีการทางชีวภาพเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน โดยเป็นวิธีการควบคุมและป้องกันโรคพืชโดยใช้สิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูตามธรรมชาติของศัตรูพืชเหล่านั้น หรือใช้จุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นจากจุลินทรีย์ในการควบคุมโรคพืช วิธีนี้เป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค สิ่งแวดล้อม และยังเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืน โดยอาศัยหลักการการเป็นปฏิปักษ์ต่อกันของสิ่งมีชีวิต ด้วยกลไกต่าง ๆ (Zhao และคณะ, 2010; Jamalizadeh และคณะ, 2011; Mota และคณะ, 2017) ดังนี้

1. การแข่งขัน (competition) กลไกนี้เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ 2 กลุ่มมาอยู่ร่วมในบริเวณเดียวกันมีความต้องการทรัพยากรหรือสารอาหารเดียวกัน แล้วเกิดการแข่งกันเพื่อแก่งแย่ง เช่น คาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน ออกซิเจน น้ำ รวมถึงการครอบครองพื้นที่ในการเจริญ โดยจัดเป็นกลไกที่มีประสิทธิภาพในวิธีการควบคุมทางชีวภาพ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการแข่งขันสูงจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อีกกลุ่มได้ โดยการแก่งแย่งสารอาหาร ส่งผลต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนจึงไม่สามารถบุกรุก หรือก่อโรคได้ ตัวอย่างการควบคุมราก่อโรคโดยใช้กลไกนี้ เช่น การยับยั้ง *Penicillium expansum* ซึ่งทำให้เกิดโรคเน่าในลูกแพร์โดยใช้ *Rhodotorula glutinis, Cryptococcus infirmominiatus* และ *Cryptococcus laurentii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่พบได้บริเวณผิวของผลลูกแพร์ ซึ่งยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์มีความสามารถในการแก่งแย่งไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารสำคัญและเจริญได้ดีกว่าราก่อโรค จึงสามารถยับยั้งราก่อโรคได้ดี (ตารางที่ 2.1) (Sugar และ Spotts, 1999)

2. การยับยั้ง หรือทำลายชีวิต (antibiosis) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์สามารถผลิตหรือปลดปล่อยสารบางชนิดซึ่งเป็นสารที่จำเพาะ หรือไม่จำเพาะก็ได้ โดยมีสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) สารพิษ เอนไซม์ สารประกอบเพปไทด์ และสารลดแรงตึงผิว ตัวอย่างของการควบคุมราก่อโรคโดยใช้กลไกนี้ เช่น สารปฏิชีวนะไพร์โรลนิตริน (pyrrolnitrin) จาก *Pseudomonas chlororaphis* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium graminearum, Colletotrichum gloeosporioides* และ *Botrytis cinerea* (Huang และคณะ, 2018),

โปรตีเอสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* (Guleria และคณะ, 2016) เป็นต้น

3. การเป็นปรสิต (parasitism) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์มีความสามารถในการรุกราน เข้าไปเจริญอยู่ภายในเซลล์ และทำลายหรือเกิดการย่อยสลายโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้โดยตรง ตัวอย่างการควบคุมราก่อโรคโดยใช้กลไกนี้ เช่น การควบคุม *Botrytis cinerea* ในแผลแอปเปิ้ล โดยใช้ *Candida saitoana* ซึ่งพบว่ายีสต์เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ดักจับสปอร์ของราและยับยั้งการงอกได้ และยังสามารถเข้าไปทำให้ผนังของเส้นใยราเสียหาย และทำให้ไซโตพลาซึมเสียสภาพ (El-Ghaouth และคณะ, 1998)

4. การชักนำให้เกิดการต้านทานโรคในพืช (induced resistance) จุลินทรีย์สามารถชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อการเกิดโรคมากขึ้น โดยกลไกการป้องกันโรคของพืชประกอบด้วย การป้องกันของพืชที่มีอยู่แล้ว ได้แก่ การมีผนังเซลล์ รวมถึง การผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การสังเคราะห์ไลติกเอนไซม์ (lytic enzyme) ที่มีผลต่อการย่อยผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรค และความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้เมื่อติดเชื้อ เช่น การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค การสะสมลิกนิน (lignification) ที่มากขึ้นบริเวณผนังเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (pathogenesis-related protein; PR protein) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างกว้างขวาง และการตอบสนองของพืชต่อจุลินทรีย์ก่อโรคอย่างทันที เมื่อมีการรุกรานโดยการฆ่าตัวตายของเซลล์ (hypersensitive response) และเป็นตัวกระตุ้นเพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น ชักนำให้ผลโลควอท (loquat fruit) ต้านทานการเกิดโรคแอนแทรคโนสจาก *Colletotrichum acutatum* โดยใช้ *Pichia guilliermondii* กระตุ้นให้ผลิตเอทิลีน ซึ่งเป็นฮอร์โมนในโลควอท ในขณะเดียวกันเกิดกิจกรรมการกระตุ้นเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนีย-ไลเอส (phenylalanine ammonia-lyase; PAL) และ β-1,3-กลูคาเนส ที่กระตุ้นการสังเคราะห์ลิกนิน ทำให้เกิดความต้านทานโรค นอกจากนี้ยังยับยั้งการงอกเส้นใยและสปอร์ของ *C. acutatum* และลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของผลโลควอทด้วย (Liu และคณะ, 2010)

5. การผลิตสารระเหย (production of volatile metabolite) จุลินทรีย์สามารถผลิตสารระเหยซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ มีโมเลกุลต่ำ น้ำหนักความดันไอสูง และการละลายน้ำต่ำ สามารถระเหยได้ในอากาศ สารระเหยที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นสามารถควบคุมโรคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใต้สภาพการเก็บรักษาที่ปิด เช่น เอทิลีนที่ปล่อยออกมาจากกิจกรรมการเผาผลาญของ

Muscodor albus สามารถยับยั้งการเจริญ และการสร้างสปอร์ของรา เช่น *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* และ *Rhizopus* (ตารางที่ 2.1) (Mercier และ Jiménez, 2004)

ตารางที่ 2.1 กลไกการควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในโรคหลังการเก็บเกี่ยว
ที่มา : (Jamalizadeh และคณะ, 2011)

กลไกการออกฤทธิ์	ระดับการทดสอบ	เชื้อก่อโรค	ชนิดของพืช	จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	เอกสารอ้างอิง
การยับยั้งหรือทำลายชีวิต	*In vitro*	*Peronophythora* sp.	ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn)	*Bacillus subtilis*	Jiang และคณะ (2001)
การยับยั้งหรือทำลายชีวิต	*In vitro* และ greenhouse trail	*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*	สตรอเบอร์รี่	*Trichoderma* spp.	Freeman และคณะ (1998)
การแข่งขัน	*In vitro*	*Penicillium expansum* (Link)	แอปเปิ้ล	*Cryptococcus laurenti* และ *C. candida*	Vero และคณะ (2002, 2009)
การแข่งขัน	*In vitro* และ combination	*P. expansum*, *Monilinia fructicola* (G. Wint.)	แอปเปิ้ล	Heat tolerant yeast	Leverentz และคณะ (2003)
การแข่งขัน	*In vitro*	*Rhizopus stolonifer* (Erhenb.: Fr Vuill)	เชอรี (*Prunus salicifolia* HBK)	*Cryptococcus infirmo-miniatus*	Spotts และคณะ (1998)
การแข่งขัน	*In vivo*	*Penicillium italicum* (Wehmer)	พืชตระกูลส้ม	*Pseudomonas syringae*	Smilanick และคณะ (1996)
การแข่งขัน	*In vivo* และ packhouse trail	*P. expansum*	แพร์ (*Pyrus communis*)	*Rhodotorula glutinis*	Sugar และ Spotts (1999)
การแข่งขัน	*In vitro* และ semicommercial	*Penicillium digitatum*, *B. cinerea*	พืชตระกูลแอปเปิ้ลและส้ม	*Candida saitoana*	Droby และคณะ (2009)
การชักนำให้เกิดการต้านทานโรคในพืช	*In vivo*	*B. cinerea*	แอปเปิ้ล (*Malus domestica* Borkh.)	*Candida oleophila* (Berkhout)	Mercier และ Wilson (1995)
การชักนำให้เกิดการต้านทานโรคในพืช	*In vitro*	*P. expansum*, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler	เชอรี (*Malpighiaglabra* L.)	*R. glutinis*, *C. laurentii* และ salicyclic acid	Qin และคณะ (2003)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.1 กลไกการควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในโรคหลังการเก็บเกี่ยว (ต่อ)
ที่มา : (Jamalizadeh และคณะ, 2011)

กลไก การออกฤทธิ์	ระดับการทดสอบ	เชื้อก่อโรค	ชนิดของพืช	จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	เอกสารอ้างอิง
การเป็นปรสิต	*In vivo* และ *vitro*	*P. digitatum*	ส้ม (*Citrus sinensis*)	*Candida famata*	Arras และคณะ (1996)
การเป็นปรสิต	*In vivo*	*P. digitatum*	พืชตระกูลส้ม	*Pantoea agglomerans*	Plaza และคณะ (2004)
การเป็นปรสิต	*In vivo*	*Monilinia laxa, R. stolonifer*	เนคทารีน (*Prunus persica* var *nucipersica*)	*P. agglomerans*	Bonaterra และคณะ (2003)
การเป็นปรสิต	*In vitro*	*P. expansum, B. cinerea, R. stolonifer*	แพร์	*P. agglomerans*	Poppe และคณะ (2003)
การผลิตสารระเหย	*In vitro*	*Colletotrichum* sp. (Penz.), *P. digitatum* (Pers.:Fr)	แอปเปิ้ลและพืช (*Pyrus communs*, L)	*Muscodor albus* (Worapong. Strobel)	Mercier และ Jiménez (2004)
การผลิตสารระเหย	*In vitro* และ combination	*P. italicum, P. digitatum*	พืชตระกูลส้ม	*B. subtilis*	Obagwu และ Korsten (2003)

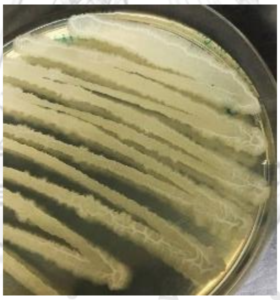
2.9 *Bacillus* spp.

Bacillus spp. ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการประยุกต์ใช้ด้านการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (Chen และคณะ, 2009; Dimkić และคณะ, 2013) เช่น ใช้ *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้จากผิวผลส้มมาควบคุมราสีเขียวและราสีส้มที่เกิดจาก *Penicillium digitatum* และ *Penicillium italicum* ตามลำดับ (Dimkić และคณะ, 2013) โดยยังมีรายงานว่า *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถผลิตยาปฏิชีวนะที่เป็นประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด อีกทั้งยังพบว่า *Bacillus pumilus* ผลิตสารยับยั้งการเจริญของราหลายชนิด เช่น *Aspergillus, Penicillium* และ *Fusarium* และมีรายงานว่า *B. subtilis* รวมทั้ง *Bacillus licheniformis* สามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจาก *Botrytis cinerea* และ *Phytophthora* ได้ (Jiang และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2014; Kilani-Feki และคณะ, 2016) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ *Bacillus* spp. ผลิตขึ้นมีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ ได้แก่ ลิโพเพปไทด์ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่จุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สร้างขึ้น ซึ่งเป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต หนึ่งในสารกลุ่มนี้ยังรวมถึงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ด้วย นอกเหนือจากนี้ ลิโพเพปไทด์ ยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมวัสดุ เป็นที่สนใจทางเทคโนโลยีชีวภาพ และทางเภสัชกรรมด้วย (Ron

และ Rosenberg, 2001; Sen, 2010; Banat และคณะ, 2014; Liu และคณะ, 2016; Zhao และคณะ, 2016)

Bacillus licheniformis

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ได้ ลักษณะของโคโลนีมีสีขาวครีม ผิวด้าน มีรอยย่น (รูปที่ 2.12) สามารถเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative aerobe) และสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 37 °C ถึง 55 °C จึงเรียกว่า thermophile facultative (Wang และคณะ, 2020) อีกทั้งยังมีความสามารถในการเจริญเติบโตในแหล่งอาหารที่หลากหลาย เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) ที่หลากหลาย เช่น โปรตีเอส, ไลเปส, อะไมเลส, กลูแคนเนส, และไคติเนส ทำให้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในทางการแพทย์, ทางการเกษตร, อาหาร และการแปรรูปอาหาร ซึ่งสมบัติเหล่านี้ทำให้ *B. licheniformis* เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญทางอุตสาหกรรม (Rehman และคณะ, 2015)



รูปที่ 2.12 ลักษณะโคโลนีของ *B. licheniformis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทบาทของ *B. licheniformis* ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ

B. licheniformis เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในการใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ แบคทีเรียชนิดนี้มีสมบัติทางสรีรวิทยามากมาย เช่น สามารถสร้างเอนโดสปอร์ เพื่อต้านทานสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย และการผลิตสารต้านจุลชีพต่าง ๆ เช่น ลิโพเพปไทด์, เพปไทด์, ฟอสโฟลิพิด, กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ในสัตว์ พืช และมนุษย์ และยังเป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยกลไกการกระตุ้น รวมถึงการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่กับเชื้อก่อโรค สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ และสารที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ อีกทั้งยังชักนำความต้านทานโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย จึงมีการใช้ *B. licheniformis* อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตขนาดใหญ่ เพราะสามารถผลิต

โปรตีนได้จำนวนมาก (Ji และคณะ, 2020; Yuan และคณะ, 2020) ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่แสดงถึงความสามารถของ *B. licheniformis* ในการยับยั้งราก่อโรค เช่น

He และคณะ (2006) ศึกษาความสามารถของ *Bacillus licheniformis* ZJU12 ซึ่งแยกได้จากดิน พบว่าสามารถยับยั้งราก่อโรค ได้แก่ *Alternaria brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Guignardia* sp., *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani* และยังพบว่าไม่มีผลข้างเคียงต่อหนู

งานวิจัยของ Lee และคณะ (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของ *B. licheniformis* N1 ในการควบคุมราสีเทา (gray mold) ที่เกิดจาก *Botrytis cinerea* ในมะเขือเทศ โดยได้พัฒนาสูตรชนิดผงผสมน้ำของ *B. licheniformis* N1 (N1E) และพบว่าลดความรุนแรงของโรคบนต้นและดอกของมะเขือเทศได้ 90.5% และป้องกันการติดเชื้อของดอก ส่งผลให้ผลมะเขือเทศมีจำนวนเพิ่มขึ้นในแต่ละต้น และยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่มะเขือเทศด้วย

งานวิจัยของ Wang และคณะ (2014) แสดงให้เห็นว่า *B. licheniformis* HS10 สามารถควบคุม *Pseudoperonospora cubensis* ซึ่งก่อโรคราน้ำค้างในแตงกวา (cucumber downy disease) โดยพบว่าโปรตีนจาก *B. licheniformis* HS10 สามารถยับยั้งราโรคพืชได้ 7 ชนิด ได้แก่ *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokinianum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Bipolaris maydis* และ *Gaeumannomyces graminis* และ โปรตีนยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทนความเป็นกรดเบส (pH) ในช่วง 6 ถึง 10 ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

งานวิจัยของ Nawaz และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพของ *B. licheniformis* OE-04 ที่แยกได้จากรากพืช ในการควบคุม *Colletotrichum gossypii* ซึ่งเป็นราก่อโรคแอนแทรคโนสในฝ้าย และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดี เนื่องจากมีสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่ pH และอุณหภูมิในช่วงที่กว้าง และเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้นไปทดสอบกับปลาม้าลาย (*Danio rerio*) พบว่ามีความเป็นพิษต่อปลาน้อยแม้ใช้ที่ความเข้มข้นสูง

งานวิจัยของ Sukkasem และคณะ (2018) ได้ศึกษา *Bacillus licheniformis* CH102 ที่แยกได้จากรากพืช พบว่าสามารถผลิตสารระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ 20-50% นอกจากนี้เมื่อปลูกต้นกล้า Arabidopsis ร่วมกับ CH102 พบว่ามีจำนวนขนราก, น้ำหนักสดเพิ่มขึ้น และยังทำให้พืชสามารถทนต่อความร้อน และความแห้งแล้งได้ นอกจากนี้ยังพบการชักนำ

การแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำให้มีส่วนร่วมในการต้านทานโรค เช่น การเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งทำให้เกิดการดูดซึมไนโตรเจน และผลิตฮอร์โมนที่ใช้ในการส่งสัญญาณ เช่น jasmonic acid (JA) และ abscisic acid (ABA)

จากงานวิจัยของ Ji และคณะ (2020) พบว่า *Bacillus licheniformis* W10 ที่แยกได้จากบริเวณรากของพืช สามารถผลิตโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวของแอปเปิ้ลและพืช และยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งราที่เสถียรที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80, และ 100 องศาเซลเซียส และในช่วงความเป็นกรดเบส 6-12 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ pH 7 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ผลิตจาก W10 สูญเสียการทำงานภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นกรดและยังคงมีความเสถียรภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นด่าง

งานวิจัยของ Li และคณะ (2020) ศึกษาการควบคุม *Phytophthora capsici* ซึ่งทำให้เกิดโรคต้นเหี่ยว (Phytophthora blight) ในการเพาะปลูกพริกไทย และพืชอื่น ๆ ผลการวิจัยพบว่า *Bacillus licheniformis* BL06 ช่วยยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. capsici* 70% และทำให้เกิดการแตกของเส้นใย อีกทั้งยับยั้งการพัฒนาของ sporangia และสายพันธุ์ BL06 ยังยับยั้งการเคลื่อนไหว และย่อยซูโอสปอร์ ทำให้การติดเชื้อ *P. capsici* ในเนื้อเยื่อของพืชเจ้าบ้านลดลง

2.10 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

การใช้สารลดแรงตึงผิวทั่วโลกเพิ่มขึ้นทุกปีและคาดว่าจะสูงถึง 28.8 พันล้านเหรียญสหรัฐในปี 2023 (Brycki และคณะ, 2017) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวมีสมบัติที่สำคัญ เช่น การเกิดอิมัลชัน, การกระจายตัว, การลดแรงตึงผิว และกิจกรรมทางชีวภาพอื่น ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการใช้งานด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ จำนวนมาก ได้แก่ น้ำยาทำความสะอาด, ผงซักฟอก, ผลิตภัณฑ์ดูแลร่างกาย, ผลิตภัณฑ์ยาฆ่าแมลง, ทางด้านเภสัชกรรม, เครื่องสำอาง และเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นต้น ซึ่งต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติ สารลดแรงตึงผิวโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามสภาพขั้วกลุ่มของส่วนหัวที่ชอบน้ำ ได้แก่ ประจุลบ (anionic), ประจุบวก (cationic), ไม่มีประจุ (nonionic) และมีทั้งประจุบวกและลบซึ่งทำให้มีประจุสุทธิเป็นกลาง (zwitterionic) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในครัวเรือน อุตสาหกรรม และการเกษตร ทำให้ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ไม่พึงประสงค์เกิดขึ้นทั้งในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ และในขั้นตอนการใช้งาน และส่งผลทำให้เกิดความกังวลเพิ่มขึ้นทั่วโลก ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา สารลดแรงตึงผิวที่เป็นมิตร

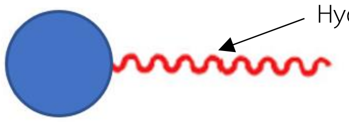
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ต่อสิ่งแวดล้อมที่มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพได้เป็นที่ต้องการอย่างมาก ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่ตอบสนองความต้องการทั้งทางด้านเทคนิค และสิ่งแวดล้อม มักผลิตโดยจุลินทรีย์ ซึ่งมักเรียกรวมว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Chen และคณะ, 2015; Zhu และคณะ, 2020)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active substance) ซึ่งผลิตจากจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิด เป็นสารประกอบแอมฟิฟิลิก (amphiphilic) โดยจะมีส่วนประกอบของส่วนหัวที่ชอบน้ำ (hydrophilic head) เช่น กรด (acid), แคทไอออน (cation) หรือแอนไอออน (anion), เพปไทด์ (peptide) และโมโน, ได หรือพอลิแซ็กคาไรด์ และส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) เช่น โซ่ไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัวหรืออิ่มตัว หรือกรดไขมัน (รูปที่ 2.13) หน้าที่ทางชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ เพิ่มความสามารถในการละลายของสารที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon), ลิพิด (lipid), และสเตอรอล (sterol) ฯลฯ โดยลดแรงตึงผิวระหว่างเฟสของเหลว เช่น น้ำมันกับน้ำ, น้ำกับอากาศ, ส่งเสริมการดูดซึมของเซลล์ให้เพิ่มขึ้น รวมถึงการเกิดอิมัลชัน (emulsification) ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างสองเฟสที่ไม่สามารถละลายเข้าด้วยกันได้ ทำให้เกิดหยดน้ำมันเล็ก ๆ ในน้ำ ทั้งนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนกว่าสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ (Morikawa และคณะ, 1993; Sharma และคณะ, 2015) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับการประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมในทศวรรษที่ผ่านมา โดยมีการใช้งานอย่างกว้างขวาง เพื่อเป็นทางเลือกแทนสารลดแรงตึงผิวจากการสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งผลิตได้จากปิโตรเลียม สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดีที่เหนือกว่าสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพที่ดี มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatability) สามารถใช้ประโยชน์ในการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) จึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการจัดการบำบัดสารพิษในดินที่ปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียม อีกทั้งยังใช้ในการบำบัดโลหะหนักในดินและน้ำที่ปนเปื้อน สิ่งที่น่าสนใจคือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น เซอร์แฟคทิน (surfactin), อิทูริน (iturin), และโซโฟโรลิพิด (sophorolipid) แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย, รา, ไวรัส และแม้กระทั่งมีฤทธิ์ต้านเนื้องอก ที่อาจเกิดขึ้นผ่านกลไกที่พบบ่อยโดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane disruption) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เฉพาะ ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีศักยภาพสูงสำหรับการใช้งานจริง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การดูแลสุขภาพ และอาหาร รวมถึงทางการแพทย์และเภสัชกรรม และยังใช้เป็นสารชุบเคลือบ, สารผสม, โฟม, สารกระจายตัว

และสารปรับสภาพพื้นผิวในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ผงซักฟอก, สิ่งทอ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีประสิทธิภาพสูงภายใต้ภาวะอุณหภูมิ ค่า pH และความเค็มที่สูงมากเกินได้ ดังนั้นจึงมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมปิโตรเลียม เพื่อเพิ่มการเก็บกู้น้ำมัน (Anjum และคณะ, 2016; Farias ละคณะ, 2019) เช่น จากรายงานของ Cazals และคณะ (2019) ซึ่งใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากกลุ่มแบคทีเรียที่แยกจากดินที่ปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAH) ได้แก่ *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ร่วมกับ *Microbacterium, Pseudomonas* และ *Rhodanobacteraceae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAH ไปใช้ในกระบวนการล้างดินควบคู่ไปกับการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) และ Das และ Kumar (2019) ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus safensis* J2 ในการกู้คืนน้ำมันและการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนดีเซล



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกจัดประเภทออกเป็น 5 กลุ่ม ดังตารางที่ 2.2 ตามโครงสร้างทางเคมีตามธรรมชาติ และแหล่งกำเนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งประเภทเหล่านี้ ได้แก่ ไกลโคลิพิด (glycolipid), ฟอสโฟลิพิดหรือกรดไขมัน (phospholipid หรือ fatty acid), ลิโพเพปไทด์หรือลิโพโปรตีน (lipopeptide หรือ lipoprotein), สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ (polymeric surfactant) และสารลดแรงตึงผิวแบบอนุภาค (particulate surfactant)

ตารางที่ 2.2 การจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวโดยโครงสร้างทางเคมี

ที่มา : (Chen และคณะ, 2015)

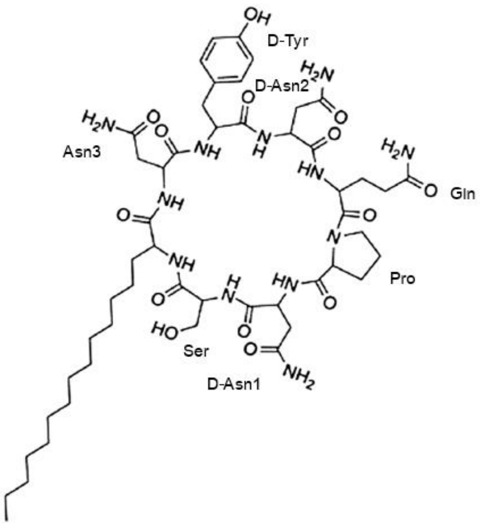
โครงสร้างทางเคมี	**ประเภทสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ**	**แหล่งที่มา**
ไกลโคลิพิด	Rhamnolipids Sophorolipids Cellobiolipids Mannosylerythritol lipids Trehalolipids	*Pseudomonas aeruginosa* *Candida bombicola* *Ustilago* sp. *Pseudozyma* spp. *Rhodococcus* spp.

ตารางที่ 2.2 การจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวโดยโครงสร้างทางเคมี (ต่อ)

ที่มา : (Chen และคณะ, 2015)

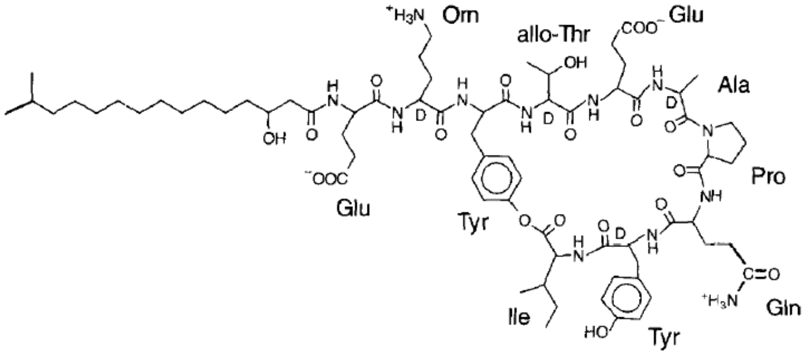
โครงสร้างทางเคมี	**ประเภทสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ**	**แหล่งที่มา**
ฟอสโฟลิพิดหรือกรดไขมัน	Lipid phosphate	*Torulopsis maynoliae*
ลิโพเพปไทด์หรือลิโพโปรตีน	Serrawettin Surfactin Subtilisin Polymyxins Viscosin, amphisin และ putisolvin	*Serratia* spp. *Bacillus* spp. *Bacillus* spp. *B. polymyxa* *Pseudomonas* species
สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์	Liposan Emulsan, Biodispersan Mannan-lipid-protein Carbohydrate-protein-lipid	*Candida lipolytica* *Acinetobacter calcoaceticus* *Candida tropicalis* *Pseudomonas fluorescens*
สารลดแรงตึงผิวแบบอนุภาค	Vesicles และ fimbriae Whole cells	*Acinetobacter calcoaceticus* Variety of bacteria

ยกตัวอย่างเช่น ลิโพเพปไทด์ (lipopeptide) เป็นแอมฟิฟิลลิกโอลิโกเพปไทด์ (amphiphilic oligopeptide) ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่มีส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ถูกสังเคราะห์โดยหลายเอนไซม์ในลักษณะที่ไม่ใช้ไรโบโซม (nonribosomal peptide synthetase; NRPS) และเป็นตัวแทนของสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลาย ตัวอย่างลิโพเพปไทด์เหล่านี้ ได้แก่ อิทูริน เฟนไจซิน (fengycin) และเซอร์แฟคทิน โครงสร้างลิโพเพปไทด์ทั่วไปประกอบด้วยกลุ่มกรดอะมิโนที่ปลายข้างหนึ่งเชื่อมต่อกับกลุ่มคาร์บอกซิล และปลายอีกข้างต่อกับกลุ่มไฮดรอกซิลของกรดไขมันที่ไม่ละลายน้ำ ความแตกต่างในลำดับกรดอะมิโนและการแตกกิ่งของกรดไขมัน ทำให้สามารถจำแนกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) อิทูริน เช่น อิทูริน A (รูปที่ 2.14), มัยคอสับทิลิน (mycosubtilin) และบาซิลโลมัยซิน (bacillomycin), 2) เฟนไจซิน เช่น พลิพาสทาทิน (รูปที่ 2.15) และ 3) เซอร์แฟคทิน (รูปที่ 2.16) ซึ่งได้รับการศึกษามากที่สุดในกลุ่มลิโพเพปไทด์ โดยจะประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก (Vitullo และคณะ, 2012)



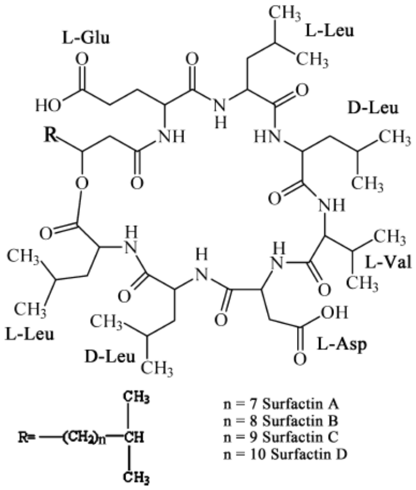
รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของอิทูริน

ดัดแปลงจาก : (Ambrico และ Trupo, 2017; Jiang และคณะ, 2020)



รูปที่ 2. 15 โครงสร้างทางเคมีของพลิพาสทาทิน

ที่มา : (Steller และคณะ, 1999)



รูปที่ 2. 16 โครงสร้างทางเคมีของเซอร์แฟคทิน

ที่มา : (Chen และคณะ, 2015)

อย่างไรก็ตาม การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเชิงพาณิชย์ขนาดใหญ่มีค่าใช้จ่ายสูง ได้ผลผลิตต่ำ และกระบวนการผลิตตอนปลาย (downstream process) มีราคาแพง จึงทำให้สารบริสุทธิ์ที่ได้มีราคาแพง ซึ่งเป็นข้อจำกัด (Araújo และคณะ, 2019; Liu และคณะ, 2020) ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงภาวะการหมัก เพื่อผลิตให้ได้ในปริมาณมาก และลดต้นทุนโดยรวม โดยใช้กระบวนการใหม่ ๆ และความก้าวหน้าทางพันธุวิศวกรรม เพื่อปรับปรุงการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รวมทั้งการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม และภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสาร ซึ่งได้รับอิทธิพลมาจากองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุ เช่น เหล็ก, กำมะถัน, ฟอสฟอรัส และแมงกานีส, อัตราส่วนขององค์ประกอบต่าง ๆ เช่น คาร์บอน:ไนโตรเจน, คาร์บอน: ฟอสฟอรัส, คาร์บอน:เหล็ก หรือคาร์บอน:แมกนีเซียม เป็นต้น ปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ รวมทั้งปัจจัยทางกายภาพ เช่น ปริมาณของหัวเชื้อ ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ เวลา และการเติมอากาศ เป็นต้น ซึ่งการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นมากในการเจริญเติบโตช่วงเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential growth phase) หรือช่วงคงที่ (stationary growth phase) โดยในตลาดโลกปัจจุบัน มีผู้ประกอบการหลายรายที่ให้ความสนใจในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการค้า เช่น เซอร์แฟคทิน จากบริษัท Soft Chemical Laboratories ในแอฟริกาใต้ เนื่องจากมีความต้องการในการใช้สารลดแรงตึงผิวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มขึ้น (Darvishi และคณะ, 2011; Jimoh และ Lin, 2019)

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ที่แตกต่างกัน เพื่อปรับปรุงทั้งการผลิตชีวมวลและการผลิตไซคลิกลิโพเพปไทด์ (cyclic lipopeptide, CLP) ของ *B. amyloliquefaciens* พบว่าน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อัตราส่วน 10:1 ช่วยเพิ่มมวลชีวภาพและผลผลิต CLP อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสูตรอาหารเดิมที่ใช้น้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ CLP ที่ผลิตในอาหารชนิดนี้ยังช่วยให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวเซอร์แฟคทินได้เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังมีไอโซฟอร์ม (isoform) ของเฟนไจซินเพิ่มขึ้นอีกด้วย ทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคแผลจุดในมะเขือเทศและพริกไทยที่เกิดจาก *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแปรผันแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ส่งผลต่อการผลิตและชนิดของ CLP (Medeot และคณะ, 2017)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

งานวิจัยก่อนหน้านี้ จากวิทยานิพนธ์ของบงกช สุทธิวาณิชกุล (2540) รายงานว่า *B. licheniformis* F2.2 สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารแบบกำหนดสูตร (define medium) ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ pH 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าเป็นสารชนิดลิโพเพปไทด์ (Thaniyavarn และคณะ, 2003) และจากงานวิจัยของธัญญพัทธ์ จิราสิตธนวัชร์ (2560) พบว่า *B. licheniformis* F2.2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช และสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำ *B. licheniformis* F2.2 มาแปรผันเพื่อหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช และแสดงลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการควบคุมราก่อโรคในพืชต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. คอร์ก บอเรอร์ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
3. คอลัมน์ C18 reversed phase cosmosil ขนาด 4.6x150 มิลลิเมตร ของบริษัท Nacalai, USA
4. เครื่องแก้วของบริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) Clifton Ceraplate ของบริษัท Nickel-Electro Ltd., UK
6. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็กชนิดให้ความร้อน (hot plate stirrer) EchoTherm รุ่น HS10 ของบริษัท Torrey Pines Scientific, USA
7. เครื่องเขย่า (shaker)
8. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-G ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
9. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, USA
10. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
11. เครื่องบ่มแบบเขย่า (incubator shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hettich Zentrifugen, Germany
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Beckman, Germany
15. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของ บริษัท Scientific Industries Instruments, USA
16. เครื่องระเหยแห้งแบบหมุนเหวี่ยง (centrifuge evaporator) รุ่น Eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech, Germany
17. เครื่องระเหยแห้งแบบหมุนสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
18. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

19. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Scientific, USA และ รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
20. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) รุ่น Agilent 1100 series ของบริษัท Agilent, Germany
21. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
22. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 60x15 มิลลิเมตร ของบริษัท Bio Spectrum, India
23. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
24. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
25. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
26. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
27. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
28. ตู้อบแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum oven) รุ่น Hotpack 273600 Benchtop ของบริษัท Hotpact Co., USA
29. เต้ารับแบบตั้งเวลา (analog timer) Champ ของบริษัท Chaozhou Nanke Electronic Co., Ltd., China
30. ไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม ของบริษัท Sorfa Life Science, China
31. ไมโครปิเปตต์และทิปรุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, USA
32. ไวแอล clear sepcap ขนาด 1 มิลลิลิตร; 8x40 มิลลิเมตร ของบริษัท Thermo Scientific, USA
33. หลอดคิวเวตต์ (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
34. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
2. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
3. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, Germany
4. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) CARLO ERBA Reagents, France
5. ซิงก์ซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($ZnSO_4{\cdot}7H_2O$) ของบริษัท Ajex Finechem, Australia
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany

7. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan
8. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ของบริษัท Ajex Finechem, Australia
9. โซเดียมอะซีเทต (CH_3COONa) ของบริษัท Merck, Germany
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
11. เซอร์แฟคทิน (surfactin) จาก *Bacillus subtilis* ของบริษัท Sigma, USA
12. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท Kemaus, Australia
13. ไตรฟลูออโรอะซีติกแอซิด (trifluoroacetic acid) ของบริษัท Fisher Scientific, UK
14. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
15. น้ำตาลทราย ของบริษัทกลุ่มวังขนาย, ประเทศไทย
16. น้ำผักผสมตรา V8 ของบริษัท Campbell Soup Company, USA
17. เปบโทน (peptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
18. ปุ๋ยตราม้าบิน ของบริษัท ไอ ซี พี เฟอทิไลเซอร์ จำกัด, ประเทศไทย
19. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
20. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Ajex Finechem, Australia
21. โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ของบริษัท Ajex Finechem, Australia
22. ฟรุกโทส (fructose) ของบริษัท Kemaus, Australia
23. เฟอรัสซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($FeSO_4{\cdot}7H_2O$) ของบริษัท Ajex Finechem, Australia
24. เมทานอล (methanol) ของบริษัท Merck, Germany
25. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4{\cdot}7H_2O$) ของบริษัท Ajex Finechem, Australia
26. แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4{\cdot}H_2O$) ของบริษัท Ajex Finechem, Australia
27. อะซีโตรไนไทรล์ (acetonitrile) ของบริษัท Merck, Germany
28. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
29. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
30. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Kemaus, Australia
31. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Merck, Germany
32. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท Ajex Finechem, Australia
33. Tris base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Research Organics, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.1 แบคทีเรีย

นำ *Bacillus licheniformis* F2.2 ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักที่จังหวัดสมุทรสาครโดย บงกช สุทธิวาณิชกุล (2540) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani) agar (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง กรณีต้องการเก็บรักษาเป็นเวลานาน เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว อาหารเหลว LB (Luria Bertani) broth (ภาคผนวก ก2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วผสมกับ 15% กลีเซอรอลปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข1) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 ราก่อโรคพืช

เลี้ยงราก่อโรคในพืช 6 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium proliferatum*, *Acremonium furcatum*, *Pyricularia oryzae*, และ *Colletotrichum gloeosporioides*, บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก3) และเลี้ยง *Phytophthora palmivora* บนอาหารแข็ง V8 (ภาคผนวก ก4) บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน โดยราทั้งหมดมาจากคลังเก็บเชื้อจุลินทรีย์ ภาคจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 สำหรับแบคทีเรีย

อาหารแข็ง LB Agar, อาหารเหลว LB Broth, อาหารเหลว Medium Optimal for Lipopeptide Production (MOLP) (ภาคผนวก ก5), และอาหารเหลวแบบกำหนดสูตร (Defined Medium; DF) (ภาคผนวก ก6)

3.4.2 สำหรับรา

อาหารแข็ง PDA, และ อาหารแข็ง V8

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดย *B. licheniformis* F2.2

3.5.1 ทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วยแบคทีเรีย (dual culture test)

นำชิ้นวุ้นที่เจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของราก่อโรคในพืช 7 สายพันธุ์ (รา 1 ชนิดต่อ 1 เพลท) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *A. furcatum*, *P. oryzae*, และ *C. gloeosporioides* ใช้อาหารแข็ง PDA และ *P. palmivora* ใช้อาหาร V8 จากนั้นขีด *B. licheniformis* F2.2 ลงไป โดยให้มีระยะห่างจากราประมาณ 2 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แล้วสังเกตผลการยับยั้ง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราที่ใช้ทดสอบการยับยั้งด้านที่แคบที่สุดเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ขีดแบคทีเรียทดสอบ คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา (Clarke และคณะ, 2010)

3.5.2 ทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีผสมส่วนใสของแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารเหลว LB broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ นำหัวเชื้อ 1% inoculum ใส่ลงในอาหารเหลว LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์มากรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงผสมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ (cell-free supernatants) ของ *B. licheniformis* F2.2 ลงไปในอาหาร PDA และ V8 ที่หลอมเหลวไว้ โดยสัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร เป็น 1:1 และ 1:10 ซึ่งเตรียมอาหารเป็น 2X (ภาคผนวก ก7, 8) และ 1.2X (ภาคผนวก ก9, 10) ตามลำดับ เพื่อให้อาหารมีความเข้มข้นที่เท่ากันเมื่อผสมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ จากนั้นเทเพลท รอให้อาหารแข็งตัว แล้วนำชิ้นวุ้นที่เจาะด้วย cork borer ของราก่อโรคในพืชมาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราที่ใช้ทดสอบการยับยั้งเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมส่วนใสของแบคทีเรีย คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราตามสูตรของ Clarke และคณะ (2010)

3.6 การทดสอบสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2

3.6.1 ทดสอบแอกทิวิตีการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity test)

การทดสอบแอกทิวิตีการสลายเม็ดเลือดแดงดัดแปลงจาก Sarwar และคณะ (2018) โดยนำ *B. licheniformis* F2.2 มาขีดลงบน blood agar ที่มีเลือดผสมอยู่ 5% (ปริมาตร/ปริมาตร) (ภาคผนวก ก11) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีซึ่งเกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดง

3.6.2 ทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์ (drop collapse test)

การทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์ดัดแปลงจาก Bodour และ Miller-Maierl (1998) โดยเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารเหลว LB broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ นำหัวเชื้อ 1% inoculum ใส่ลงในอาหารเหลว LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์มากรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จะได้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2 นำไปใช้ต่อไป

หยดน้ำมันไซลีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนด้านในของฝาไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้น้ำมันคลุมบริเวณพื้นผิว หยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของฝาไมโครไตเตอร์เพลทที่มีน้ำมันเคลือบอยู่ที่ผิว ตั้งไว้ 1 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข2) เป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้อาหารเหลว LB เป็นตัวควบคุมผลลบ หลังจากนั้นสังเกตลักษณะการยุบตัวของส่วนใสที่หยดลงไป

3.6.3 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement test)

การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันดัดแปลงจาก Morikawa และคณะ (1993) โดยใส่น้ำปราศจากไอออนลงในเพลทขนาด 60x15 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ หยดน้ำมันดิบปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบริเวณกลางเพลท เพื่อให้น้ำมันดิบคลุมเป็นฟิล์มที่ผิวน้ำ แล้วหยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงตรงกลางฟิล์มน้ำมัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้อาหารเหลว LB เป็นตัวควบคุมผลลบ สังเกตการกระจายตัวของน้ำมันที่เกิดขึ้น

3.6.4 ทดสอบการเกิดอิมัลชัน

ใช้น้ำมันไซลีนในการทดสอบ โดยใส่น้ำมันปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดไวแอล (clear sepcap vial) ขนาด 8x40 มิลลิเมตร จากนั้นใส่ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้อาหารเหลว LB เป็นตัวควบคุมผลลบ สังเกตและวัดผลการสร้างอิมัลชัน แล้วคำนวณค่าดัชนีการทำให้เกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E) ที่เวลา 24 ชั่วโมง (E_{24}) ตามสูตรของ Cooper และคณะ (1987) ดังนี้

$$\text{ค่าดัชนีการทำให้เกิดอิมัลชัน (E)} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน (เซนติเมตร)}}{\text{ความสูงทั้งหมดของของเหลว (เซนติเมตร)}} \times 100$$

3.7 การทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืช

3.7.1 ผลของอุณหภูมิ

นำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 20, 37, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส และที่ภาวะ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จึงนำส่วนใสมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืช โดยสัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร เป็น 1:10 ดังข้อ 3.5.2 และการทำให้เกิดอิมัลชันดังข้อ 3.6.4 ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Gong และคณะ (2006)

3.7.2 ผลของความเป็นกรดเบส

นำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาปรับ pH ให้เท่ากับ 2, 4, 6, 8, 10, 12 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข3) และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข4) ตั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืช โดยสัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร เป็น 1:10 ดังข้อ 3.5.2 และการทำให้เกิดอิมัลชันดังข้อ 3.6.4 ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Gong และคณะ (2006)

3.8 การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช

3.8.1 แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

แปรผันแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ ฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส (น้ำตาลทราย) ทริปโตน หรือโซเดียมอะซีเทต (20 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร) และแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต (4 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร) โดยเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ นำหัวเชื้อ 1% inoculum ใส่ลงในอาหาร Medium Optimal for Lipopeptide Production (MOLP) ตามสูตรอาหารของ Gu และคณะ (2005) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโต และการทำให้เกิดอิมัลชันดังข้อ 3.6.4 จากนั้นเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเทียบกับอาหาร

MOLP สูตรเดิม, อาหารแบบกำหนดสูตร (defined medium) ของ Thaniyavarn และคณะ (2003) และอาหาร LB ซึ่งเป็นอาหารสูตรสมบูรณ์ (complete medium) เพื่อนำไปติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

3.8.2 ติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช

เลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ที่ 1% inoculum ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.8.1 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}), ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังข้อ 3.6.4 และฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช โดยสัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร เป็น 1:10 ดังข้อ 3.5.2

3.9 การสกัดและการแสดงลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2

เลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ที่ 2% inoculum เพื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ นำส่วนใสมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Ndlovu และคณะ (2017) และ Zhang และคณะ (2017) โดยตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกจากส่วนใสด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 N ด้วยการปรับค่า pH ของส่วนใสให้ได้ประมาณ 2 แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงและนำตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวน 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเมธานอล 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทิ้งตะกอน จากนั้นนำสารที่สกัดได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุนสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) หลังจากผ่านการระเหยแล้ว หาน้ำหนักแห้ง/ลิตร แล้วละลายสารเข้มข้นที่ได้ด้วยเอธานอล เพื่อชะสารเข้มข้นออกมาให้ได้มากที่สุด จากนั้นระเหยเอธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุนเหวี่ยง (centrifuge evaporator) แล้วละลายสารเข้มข้นที่ได้ด้วย Tris HCl pH 7.5 (ภาคผนวก ข5) ในปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้ว

ทดสอบการทำให้เกิดอิมัลชันดังข้อ 3.6.4, ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันดังข้อ 3.6.3 และทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดยวิธี agar disc diffusion ดังนี้

นำชิ้นวุ้นที่เจาะด้วย cork borer ของราก่อโรคพืชวางตรงกลางเพลทอาหารแข็ง PDA หรือ V8 แล้ววางแผ่นดิสก์ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยให้ห่างจากชิ้นวุ้นของราประมาณ 1.5 เซนติเมตร จำนวน 4 แผ่นดิสก์ต่อเพลท ดิสก์แผ่นที่หนึ่งใช้เป็นแผ่นดิสก์ควบคุมโดยหยด Tris HCl pH 7.5 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และแผ่นดิสก์อีกสามแผ่นใช้ทดสอบด้วยการหยดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ปริมาตรดิสก์ละ 25 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน แล้วสังเกตบริเวณการยับยั้งราที่เกิดขึ้น โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราที่ใช้ทดสอบการยับยั้งเทียบกับชุดควบคุม แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา

นำสารสกัดที่ได้ส่งวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้บริการของห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Thaniyavarn และคณะ (2003) โดยใช้คอลัมน์ C18 reversed phase เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้สารชะหรือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ อะซีโตรไนไทรล์ผสมกับไตรฟลูออโรอะซีติกแอซิด ที่มีการปรับอัตราส่วนตามเวลาที่เปลี่ยนไป (gradient elution) ได้แก่ สารละลาย A (อะซีโตรไนไทรล์ 10% ผสมกับไตรฟลูออโรอะซีติกแอซิด 0.1%) และสารละลาย B (อะซีโตรไนไทรล์ 100% ผสมกับไตรฟลูออโรอะซีติกแอซิด 0.1%) เป็นตัวพาด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เริ่มต้นระบบด้วยการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย A และมีเกรเดียนท์ 30% ของสารละลาย B เป็นเวลา 5 นาที และมีลิเนียร์เกรเดียนท์จาก 30-100% ของสารละลาย B เป็นเวลา 25 นาที หลังจากนี้ชะด้วยเกรเดียนท์ 30% ของสารละลาย B เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เวลาทั้งหมดในการชะคอลัมน์ 35 นาที ตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับเซอร์แฟคทินมาตรฐาน และเก็บตัวอย่างแต่ละพีคบนโครมาโตแกรมในแต่ละช่วงเวลา (retention time) ได้แก่ 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 และ 30-35 นาที จากนั้นนำไปประเหยแห้งด้วยตู้อบแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum oven) แล้วละลายสารที่ได้ด้วยเอธานอล เพื่อชะสารออกมาให้ได้มากที่สุด จากนั้นระเหยเอธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุนเหวี่ยง (centrifuge evaporator) หาน้ำหนักแห้ง แล้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ละลายสารที่ได้ด้วย Tris HCl pH 7.5 ในปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดยวิธี agar disc diffusion

3.10 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคบนต้นข้าว (*in planta*)

3.10.1 เตรียมต้นข้าว

นำเมล็ดข้าวพันธุ์สังข์หยด พัทลุง มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ 2 ครั้ง และแช่ด้วย 70% แอลกอฮอล์ 5 นาที จากนั้นนำเมล็ดมาแช่น้ำปราศจากไอออนในขวดรูปชมพู่ปลอดเชื้อขนาด 100 มิลลิลิตร 1 คืน ในที่มืด เทน้ำออก แล้วบ่มไว้ในที่มืดต่ออีก 1 คืน เมื่อมีรากงอกออกมาจึงให้แสง แล้วเพาะไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารละลายของปุ๋ย (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นข้าวปรับตัวก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.10.2 เตรียม *P. oryzae*

เลี้ยง *P. oryzae* บนเพลท PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บสปอร์ราโดยใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปในเพลท จากนั้นใช้ loop ขูดเส้นใยและสปอร์ของราที่ผิวหน้าอาหาร แล้วนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.10.3 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียในการยับยั้ง *P. oryzae* บนต้นข้าว

วิธีการทดสอบดัดแปลงจากธัญญพัทธ์ จิราสิตธนวัชร์ (2559) โดยทำความสะอาดใบข้าวด้วย 70% แอลกอฮอล์ เพื่อไม่ให้มีเชื้ออื่นปนเปื้อน แล้วทำให้ใบข้าวเป็นแผลด้วยการใช้เข็ม (needle) สะกิดเบา ๆ จากนั้นแบ่งต้นข้าวออกเป็น 10 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

1. ใส่น้ำน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อเป็นชุดควบคุมผลลบ

2. ใส่ *P. oryzae* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบการเกิดโรคบนใบข้าว

3. ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีต่อต้นข้าว

4. ใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ที่มีต่อต้นข้าว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. ใส่ *P. oryzae* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร + น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยจะใส่ราลงบนใบข้าวก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เพื่อทดสอบความสามารถในการรักษาโรคโดยน้ำเลี้ยงเชื้อ

6. ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 5 ไมโครลิตร + *P. oryzae* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยจะใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงใส่ราลงบนใบข้าว เพื่อทดสอบความสามารถในป้องกันการโรคโดยน้ำเลี้ยงเชื้อ

7. ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 5 ไมโครลิตร + *P. oryzae* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร พร้อมกัน เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งโรคโดยน้ำเลี้ยงเชื้อ

8. ใส่ *P. oryzae* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร + สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยจะใส่ราลงบนใบข้าวก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ เพื่อทดสอบความสามารถในการรักษาโรคโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

9. ใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร + *P. oryzae* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยจะใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงใส่ราลงบนใบข้าว เพื่อทดสอบความสามารถในป้องกันการโรคโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

10. ใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร + *P. oryzae* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร พร้อมกัน เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งโรคโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

เลี้ยงต้นข้าวในพื้นที่ทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง และให้แสงม่วงด้วยหลอดไฟเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เนื่องจากเป็นช่วงแสงที่พืชต้องการใช้ในการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสงทำให้เจริญเติบโตได้เร็ว จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนข้าว เป็นเวลา 6 วัน โดยให้คะแนนเป็นระดับการเกิดโรค 0-4 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมผลลบ ดังนี้ 0 = ไม่เกิดโรค, 1 = เกิดโรคเล็กน้อยมีความกว้างของรอยโรค 1-2 มิลลิเมตร และมีจำนวนรอยโรค 1-2 ตำแหน่ง, 2 = เกิดโรคปานกลางมีความกว้างของรอยโรค 3-4 มิลลิเมตร และมีจำนวนรอยโรค 3-4 ตำแหน่ง, 3 = เกิดโรคมากมีความกว้างของรอยโรค 5-6 มิลลิเมตร และมีจำนวนรอยโรค 5-6 ตำแหน่ง), 4 = เกิดโรคมากที่สุดมีความกว้างของรอยโรค 7-8 มิลลิเมตร และมีจำนวนรอยโรค 7-8 ตำแหน่ง นอกจากนี้บันทึกผลจากการวัดความสูงของต้นข้าวและชั่งน้ำหนักในแต่ละชุดการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.11 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปรโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DUNCAN) โดยใช้โปรแกรมสาหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics เวอร์ชัน 22

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4

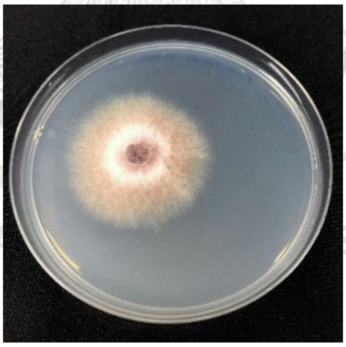
ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดย *B. licheniformis* F2.2

4.1.1 ทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วยแบคทีเรีย (dual culture test)

เมื่อขีด *B. licheniformis* F2.2 ลงบนเพลทอาหารแข็ง PDA และ V8 โดยให้มีระยะห่างจากชิ้นวุ้นของราประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วสังเกตผลการยับยั้ง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราที่ใช้ทดสอบการยับยั้งด้านที่แคบที่สุดเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ขีดแบคทีเรียทดสอบ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา พบว่า *B. licheniformis* F2.2 สามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชได้ทั้ง 7 ชนิดได้ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.1) โดยที่ *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *P. oryzae*, *C. gloeosporioides*, *P. palmivora* และ *A. furcatum* แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอยู่ที่ 44.5±1.29%, 36.71±1.58%, 34.79±6.29%, 36.52±0.61%, 35.02±2.03%, 41.28±1.03% และ 35.42±1.42% ตามลำดับ (รูปที่ 4.1)

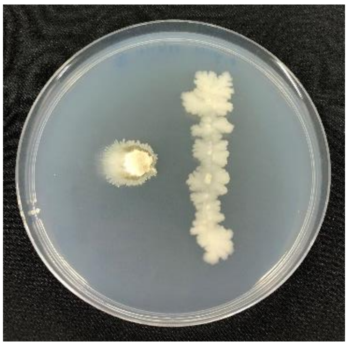
ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วย *B. licheniformis* F2.2

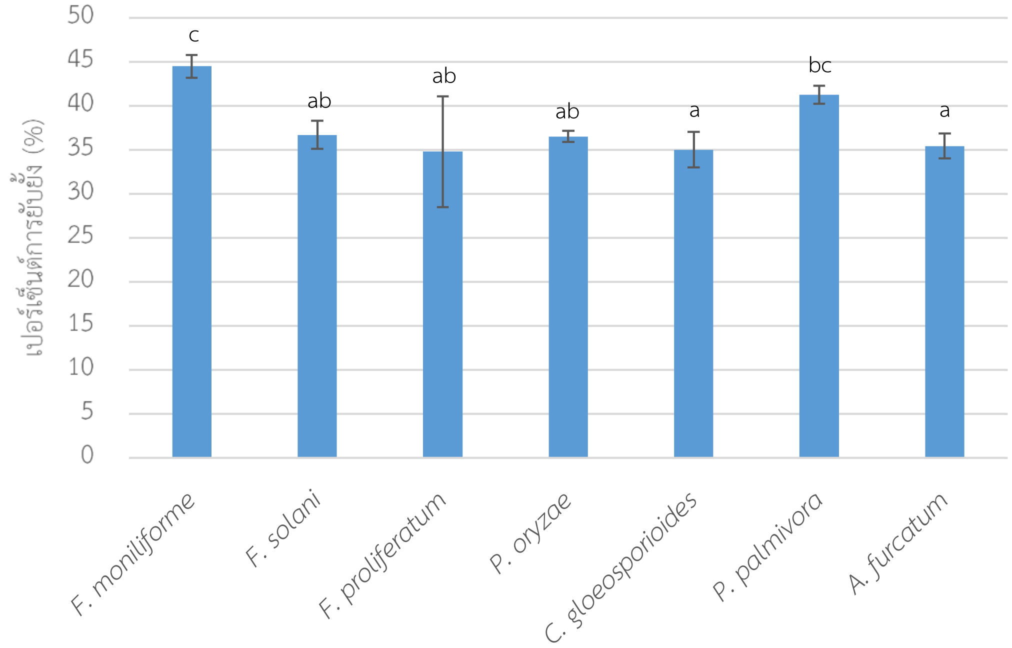
ราก่อโรคในพืช	**ชุดควบคุม**	**การยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วย *B. licheniformis* F2.2**
F. moniliforme		
F. solani		

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วย *B. licheniformis* F2.2 (ต่อ)

ราก่อโรคในพืช	**ชุดควบคุม**	**การยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วย *B. licheniformis* F2.2**
F. proliferatum		
P. oryzae		
C. gloeosporioides		
P. palmivora		

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วย *B. licheniformis* F2.2 (ต่อ)

ราก่อโรคในพืช	**ชุดควบคุม**	**การยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วย *B. licheniformis* F2.2**
A. furcatum		

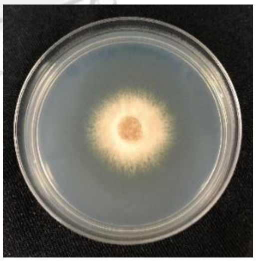
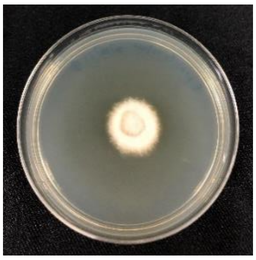
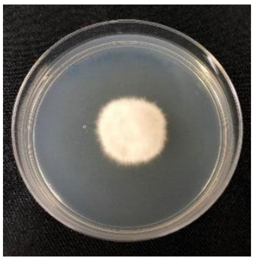
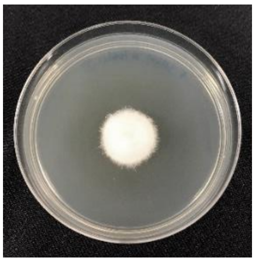


รูปที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของ *B. licheniformis* F2.2
บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

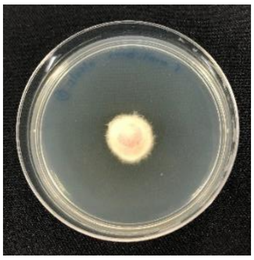
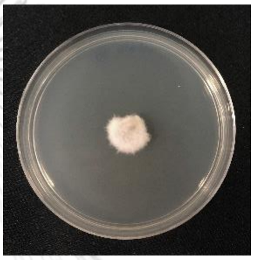
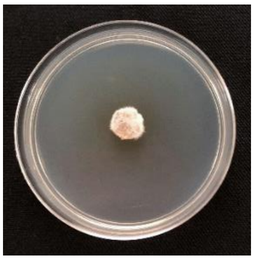
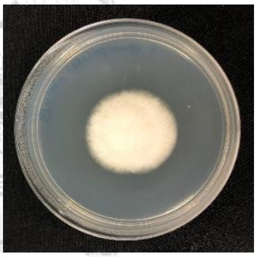
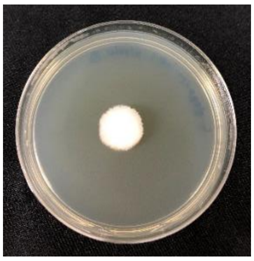
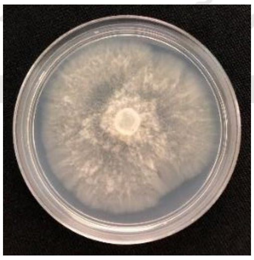
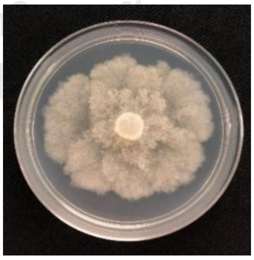
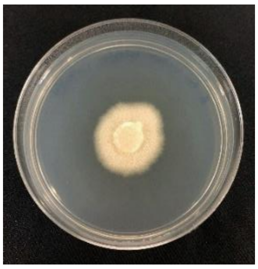
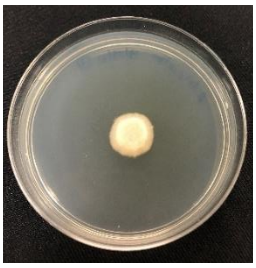
4.1.2 ทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีผสมส่วนใสของแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

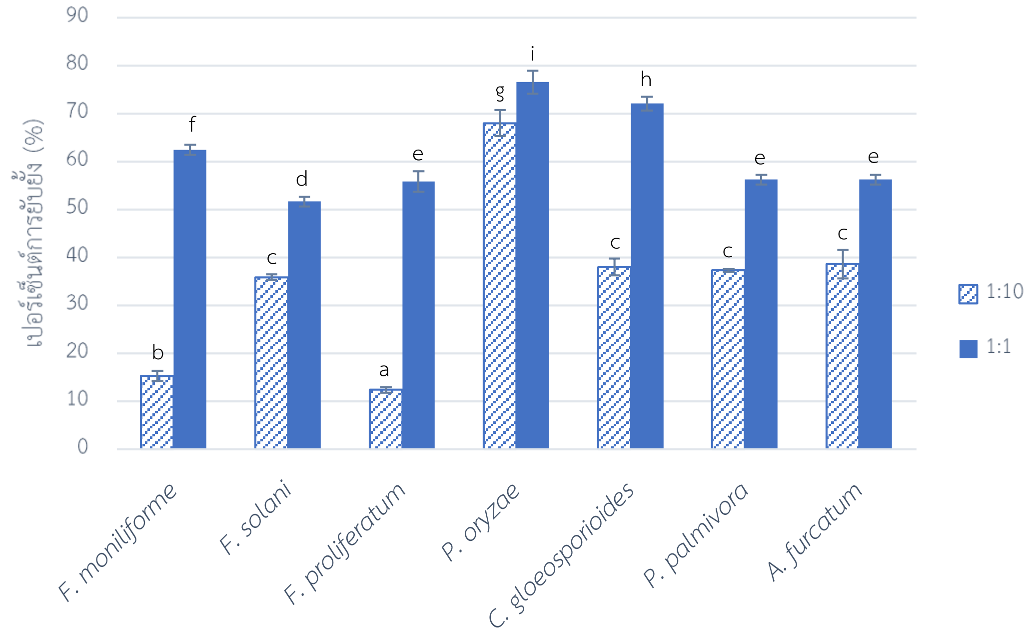
เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2 มาผสมกับอาหารแข็ง PDA และ V8 ที่หลอมเหลวไว้โดยสัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร เป็น 1:1 และ 1:10 แล้วนำชิ้นวุ้นของราก่อโรคในพืชมาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อ บันทึกผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราที่ใช้ทดสอบการยับยั้งเทียบกับชุดควบคุมที่มีการวางชิ้นวุ้นราก่อโรคในพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA และ V8 ที่ไม่ผสมส่วนใสของแบคทีเรีย จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา พบว่า สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:10 และ 1:1 สามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชได้ทั้ง 7 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคข้าวได้มากที่สุด (รูปที่ 4.2) โดยที่สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:1 สามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชโดยเห็นผลได้ชัดเจนดีกว่าสัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:10 (ตารางที่ 4.2) ซึ่งยับยั้งมากเกินไป ทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของการยับยั้งระหว่างเชื้อ และยังพบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ค่อนข้างจะใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่เห็นประสิทธิภาพที่ชัดเจนนัก จึงเลือกสัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:10 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดยวิธีผสมส่วนใสของ *B. licheniformis* F2.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ราก่อโรคในพืช	ชุดควบคุม	สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:10	สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:1
F. moniliforme			
F. solani			

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดยวิธีผสมส่วนใสของ *B. licheniformis* F2.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ต่อ)

ราก่อโรคในพืช	**ชุดควบคุม**	**สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:10**	**สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:1**
F. proliferatum			
P. oryzae			
C. gloeosporioides			
P. palmivora			
A. furcatum			

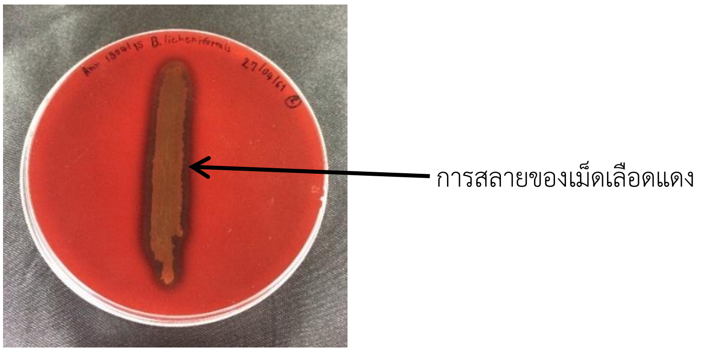


รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของ *B. licheniformis* F2.2 ที่สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:10 และ 1:1
บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

4.2 การทดสอบสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2

4.2.1 ทดสอบแอกทิวิตีการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity test)

เมื่อนำ *B. licheniformis* F2.2 มาขีดลงบน blood agar ที่มีเลือดผสมอยู่ 5% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า เกิดบริเวณใสที่ชัดเจนรอบโคโลนีของแบคทีเรีย ซึ่งเกิดจากการสลายของเม็ดเลือดแดงโดยสมบูรณ์จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้น (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 การสลายเม็ดเลือดแดงของ *B. licheniformis* F2.2 บน blood agar

4.2.2 ทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์ (drop collapse test)

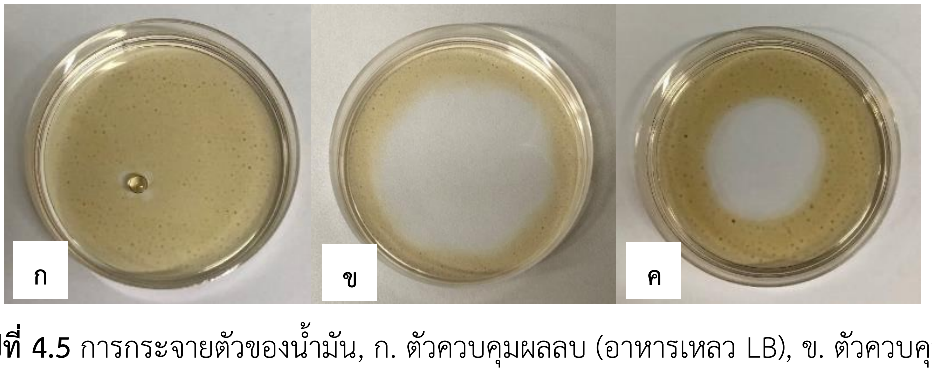
เมื่อหยดน้ำมันไซลีน ลงบนด้านในของฝาไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นหยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ลงไป โดยใช้สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้อาหารเหลว LB เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่า เกิดการยุบตัวของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์บนพื้นผิวของฝาไมโครไตเตอร์เพลทที่มีน้ำมันเคลือบอยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลลบ (อาหารเหลว LB) (รูปที่ 4.4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2 สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำมันที่เคลือบอยู่บนพื้นผิว ทำให้เกิดการยุบตัวลงของน้ำเลี้ยงเซลล์ได้

รูปที่ 4.4 การยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบและชุดควบคุมผลบวก

4.2.3 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement test)

เมื่อใส่น้ำปราศจากไอออนลงในเพลท แล้วค่อย ๆ หยดน้ำมันดิบ ลงบริเวณกลางเพลท เพื่อให้น้ำมันดิบคลุมเป็นฟิล์มที่ผิวน้ำ จากนั้นหยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ ลงตรงกลางฟิล์มน้ำมัน พบว่า เกิดการกระจายตัวของฟิล์มน้ำมันดิบ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลลบ (อาหารเหลว LB) (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่า ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2 สามารถลดแรงตึงผิวของฟิล์มน้ำมันที่คลุมบนผิวน้ำได้ ทำให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันขึ้น

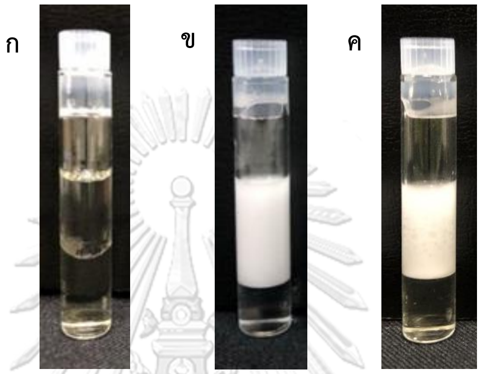
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.5 การกระจายตัวของน้ำมัน, ก. ตัวควบคุมผลลบ (อาหารเหลว LB), ข. ตัวควบคุมผลบวก (SDS) และ ค. ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2

4.2.4 ทดสอบการเกิดอิมัลชัน

เมื่อผสมน้ำมันไซลีนกับส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดไวแอล (clear sepcap vial) แล้ว สังเกตและวัดผลการสร้างอิมัลชัน และคำนวณค่าดัชนีการทำให้เกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E) ที่เวลา 24 ชั่วโมง (E_{24}) พบว่า การเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเซลล์ *B. licheniformis* F2.2 เมื่อเทียบกับ SDS (ตัวควบคุมผลบวก) มีค่า E_{24} เท่ากับ 62.5±0.00% และ 65.97±1.20% ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 การเกิดอิมัลชัน, ก. ตัวควบคุมผลลบ (อาหารเหลว LB), ข. ตัวควบคุมผลบวก (SDS) และ ค. ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *B. licheniformis* F2.2

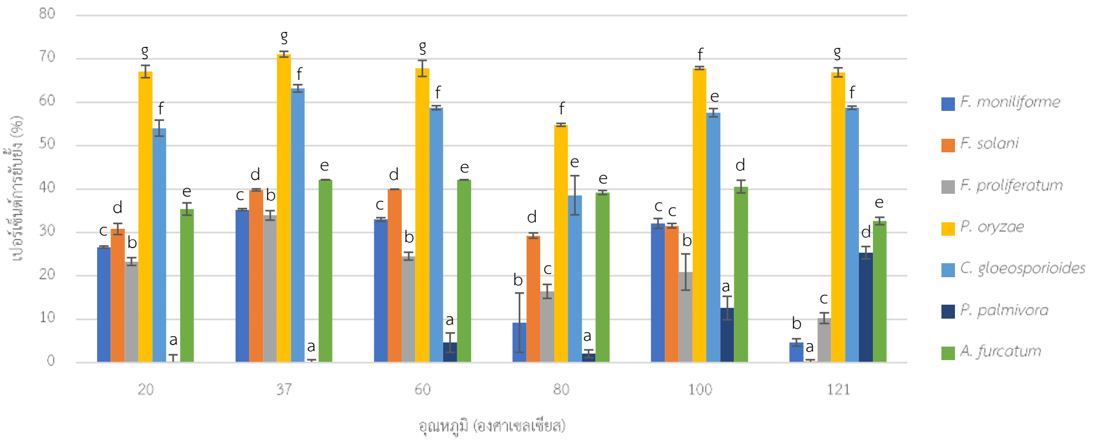
4.3 การทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืช

4.3.1 ผลของอุณหภูมิ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

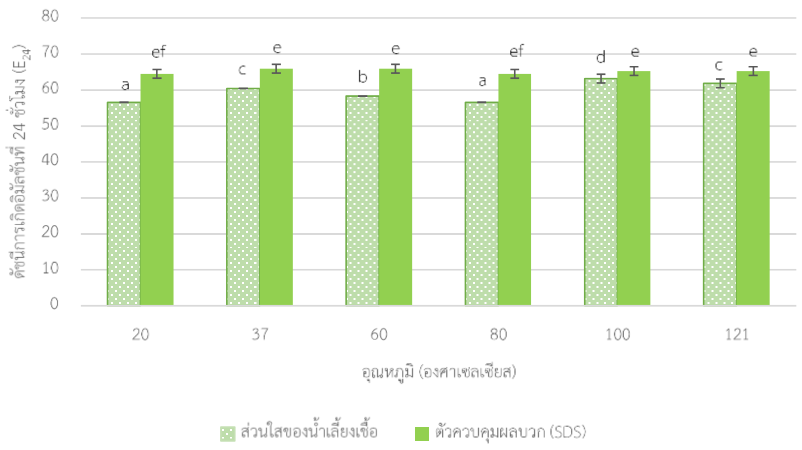
เมื่อนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. licheniformis* F2.2 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 20, 37, 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จึงนำส่วนใสมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืช โดยวิธีผสมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่สัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร เป็น 1:10 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. licheniformis* F2.2 จากทุกอุณหภูมิสามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดได้ แม้กระทั่งที่ 121 องศาเซลเซียส โดยที่ทุกอุณหภูมิพบว่า สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคข้าวได้มากที่สุด รองลงมาคือ *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด (รูปที่ 4.7) สำหรับการทำให้เกิดอิมัลชันโดยใช้ดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) พบว่า ที่อุณหภูมิ 20 และ 80 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนที่อุณหภูมิ 37, 60, 100 และ 121 องศาเซลเซียส มีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ดังรูปที่ 4.8 นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงว่าความสามารถในการยับยั้งและความสามารถในการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 20-121 องศาเซลเซียส และค่า E_{24} ยังคงอยู่ที่ประมาณ 56.52±0.00-63.19±1.20% ซึ่งใกล้เคียงกับตัวควบคุมผลบวก (SDS) (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.7 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2

บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

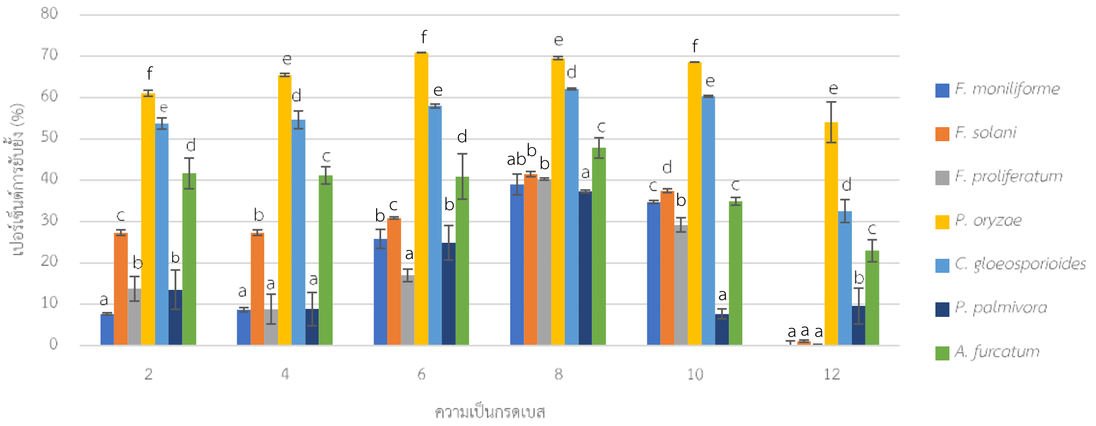


รูปที่ 4.8 ดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 ที่อุณหภูมิ 20-121 องศาเซลเซียส

บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

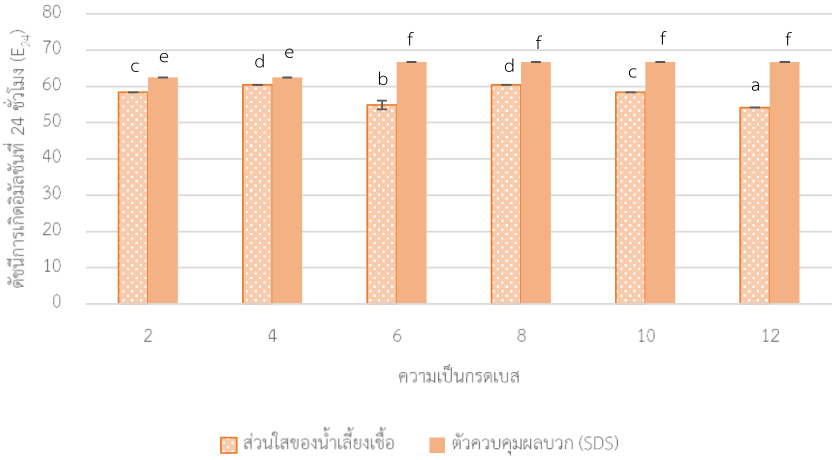
4.3.2 ผลของความเป็นกรดเบส

เมื่อนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาปรับ pH ให้เท่ากับ 2, 4, 6, 8, 10, 12 ตั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืช โดยวิธีผสมส่วนใสของแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่สัดส่วนปริมาตรอาหารต่อส่วนใส เป็น 1:10 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. licheniformis* F2.2 ยังมีความสามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิด ได้ค่อนข้างคงที่ที่ pH 2-10 และลดลงเล็กน้อยที่ pH 12 ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชยังคงเหลืออยู่มากที่สุดที่ pH 8 (รูปที่ 4.9) สำหรับความสามารถในการเกิดอิมัลชัน พบว่า ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) มีความเสถียรอยู่ที่ประมาณ 54.17±0.00-60.42±0.00% เมื่อผ่านการทดสอบที่ pH 2-12 ซึ่งใกล้เคียงกับตัวควบคุมผลบวก (SDS) (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.9 ผลของความเป็นกรดเบสที่มีต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2

บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)



รูปที่ 4.10 ดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 ที่ pH 2-12

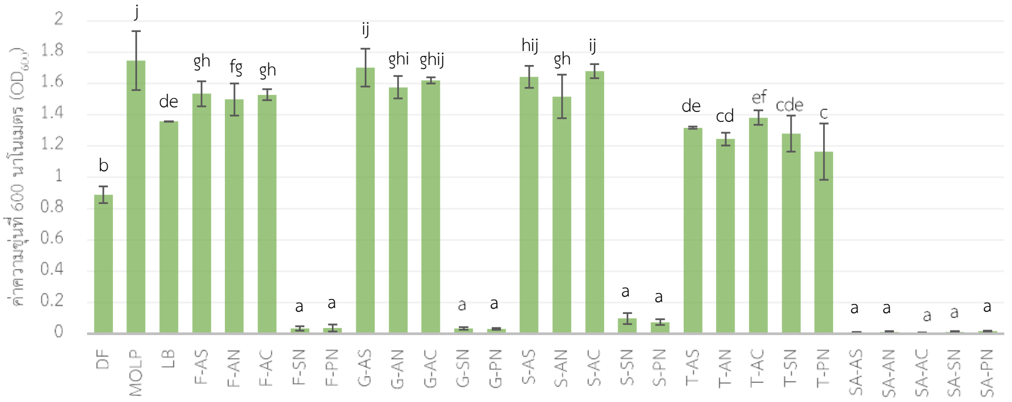
บาร์แสดงส่วนเบียงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

4.4 การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช

4.4.1 แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

เมื่อแปรผันแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอาหาร Medium Optimal for Lipopeptide Production (MOLP) แล้วนำมาตรวจสอบการเจริญเติบโต เทียบกับอาหารแบบกำหนดสูตร (defined medium) ของ Thaniyavarn และคณะ (2003) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Jenny และคณะ (1993), MOLP ตามสูตรอาหารของ Gu และคณะ (2005) และอาหาร LB พบว่า ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ที่ 24 ชั่วโมง ของอาหาร MOLP ให้ค่าสูงที่สุดที่ 1.75±0.19 รองลงมาคือ อาหาร MOLP ที่แปรผันกลูโคส+แอมโมเนียมซัลเฟต (G-AS) เท่ากับ 1.70±0.12 นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่มีโซเดียมอะซีเทตเป็นองค์ประกอบ ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมคลอไรด์, โซเดียมไนเตรต หรือโพแทสเซียมไนเตรต และอาหารที่มีโซเดียมไนเตรตและโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน มีการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* F2.2 น้อยมาก (รูปที่ 4.11) สำหรับการทำให้เกิดอิมัลชัน พบว่า ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของอาหาร MOLP ที่แปรผันฟรุกโทส+แอมโมเนียมไนเตรต (F-AN) ให้ค่าสูงสุดที่ 63.52±2.93% รองลงมาคืออาหาร MOLP ที่ 62.92±2.30% และอาหาร MOLP ที่แปรผันซูโครส+แอมโมเนียมไนเตรต (S-AN) ที่ 62.04±2.41% ตามลำดับ เมื่อคำนึงว่าจะต้องนำไปผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น จึงไม่ได้เลือกอาหารที่มีฟรุกโทสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีราคาสูง เมื่อผลิตแล้วอาจจะไม่คุ้มทุน ดังนั้นจึงเลือกอาหาร MOLP, อาหาร MOLP ที่แปรผันซูโครส+แอมโมเนียมไน

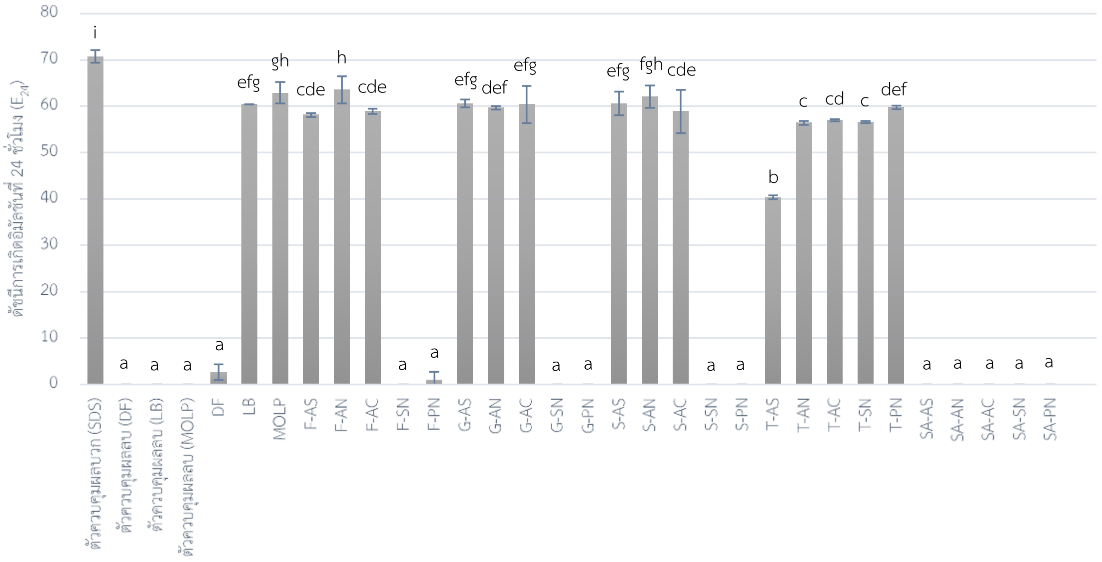
เตรต (S-AN) และอาหาร LB ซึ่งเป็นอาหารสูตรสมบูรณ์ (complete medium) ที่เตรียมง่ายและให้ค่า E_{24} ใกล้เคียงกันที่ 60.42% ไปทดสอบในขั้นต่อไป ส่วนอาหารที่มีโซเดียมอะซีเทตเป็นองค์ประกอบ ร่วมกับ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมคลอไรด์, โซเดียมไนเตรต หรือโพแทสเซียมไนเตรต และอาหารที่มีโซเดียมไนเตรตและโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน รวมถึงอาหารแบบกำหนดสูตร (DF) มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันน้อยมาก เมื่อเทียบกับตัวควบคุมผลบวก (SDS) (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.11 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ที่ 24 ชั่วโมง ของอาหาร MOLP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

*DF = Defined medium ของ Thaniyavarn และคณะ (2003), MOLP = Medium Optimal for Lipopeptide Production ตามสูตรอาหารของ Gu และคณะ (2005), LB = Luria Bertani, F-AS = ฟรุกโทส+แอมโมเนียมซัลเฟต, F-AN = ฟรุกโทส+แอมโมเนียมไนเตรต, F-AC = ฟรุกโทส+แอมโมเนียมคลอไรด์, F-SN = ฟรุกโทส+โซเดียมไนเตรต, F-PN = ฟรุกโทส+โพแทสเซียมไนเตรต, G-AS = กลูโคส+แอมโมเนียมซัลเฟต, G-AN = กลูโคส+แอมโมเนียมไนเตรต, G-AC = กลูโคส+แอมโมเนียมคลอไรด์, G-SN = กลูโคส+โซเดียมไนเตรต, G-PN = กลูโคส+โพแทสเซียมไนเตรต, S-AS = ซูโครส+แอมโมเนียมซัลเฟต, S-AN = ซูโครส+แอมโมเนียมไนเตรต, S-AC = ซูโครส+แอมโมเนียมคลอไรด์, S-SN = ซูโครส+โซเดียมไนเตรต, S-PN = ซูโครส+โพแทสเซียมไนเตรต, T-AS = ทริปโตน+แอมโมเนียมซัลเฟต, T-AN = ทริปโตน+แอมโมเนียมไนเตรต, T-AC = ทริปโตน+แอมโมเนียมคลอไรด์, T-SN = ทริปโตน+โซเดียมไนเตรต, T-PN = ทริปโตน+โพแทสเซียมไนเตรต, SA-AS = โซเดียมอะซีเทต+แอมโมเนียมซัลเฟต, SA-AN = โซเดียมอะซีเทต+แอมโมเนียมไนเตรต, SA-AC = โซเดียมอะซีเทต+แอมโมเนียมคลอไรด์, SA-SN = โซเดียมอะซีเทต+โซเดียมไนเตรต, SA-PN = โซเดียมอะซีเทต+โพแทสเซียมไนเตรต



รูปที่ 4.12 ดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของอาหาร MOLP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

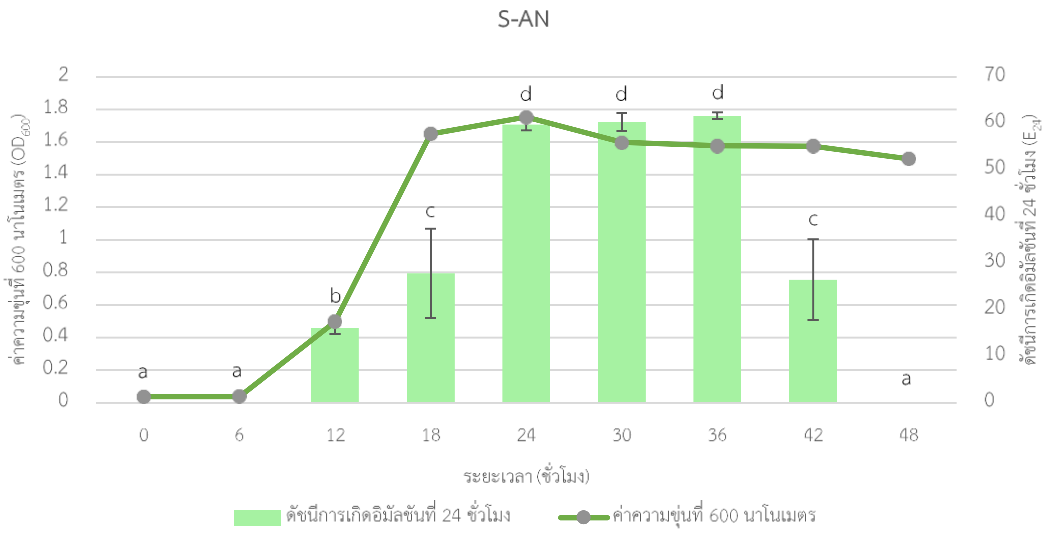
บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$) อักษรย่อเหมือนกันกับรูปที่ 4.11

4.4.2 ติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

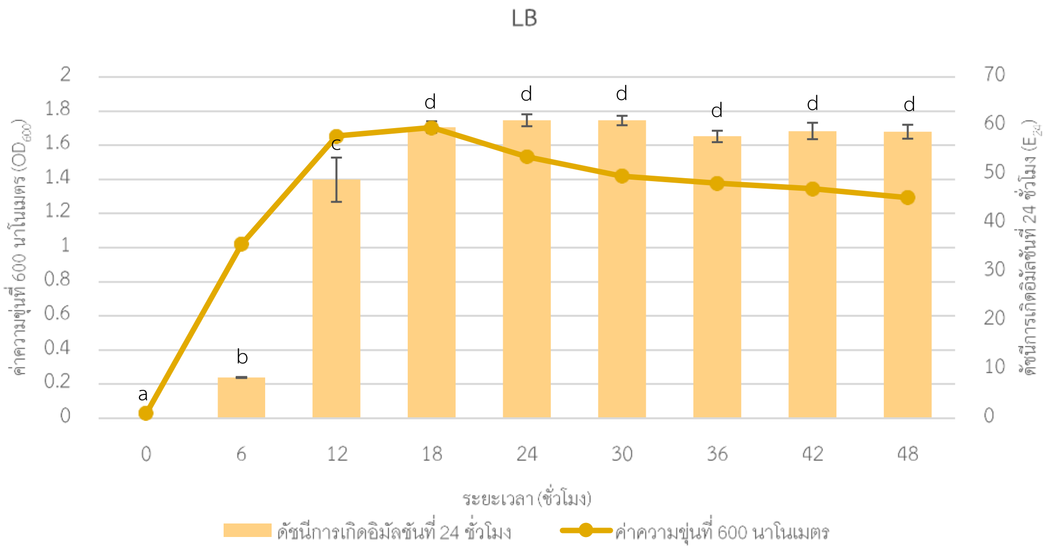
เมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารเหลวอาหาร MOLP ที่แปรผันซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน (S-AN) ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลการทดลองข้างต้น และเก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เทียบกับอาหาร LB และอาหาร MOLP พบว่า ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหาร MOLP ที่แปรผันซูโครส+แอมโมเนียมไนเตรต (S-AN) นั้นการเจริญเข้าสู่ log phase ที่ 6-18 ชั่วโมง, stationary phase ที่ 18-24 ชั่วโมง โดยมีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 1.75±0.00 ที่ 24 ชั่วโมง และการเกิดอิมัลชันเริ่มเกิดขึ้นที่ 12-42 ชั่วโมง โดยให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) สูงสุดเท่ากับ 61.65±0.74% ที่ 36 ชั่วโมง ส่วนอาหาร LB การเจริญเข้าสู่ log phase ที่ 0-12 ชั่วโมง, stationary phase ที่ 12-18 ชั่วโมง โดยมีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 1.70±0.00 ที่ 18 ชั่วโมง และการเกิดอิมัลชันเริ่มเกิดขึ้นที่ 6-48 ชั่วโมง โดยให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) สูงสุดเท่ากับ 61.11±1.20% ที่ 24 ชั่วโมง และอาหาร MOLP การเจริญเข้าสู่ log phase ที่ 0-12 ชั่วโมง,

stationary phase ที่ 12-30 ชั่วโมง โดยมีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 1.92±0.00 ที่ 18 ชั่วโมง และการเกิดอิมัลชันเริ่มเกิดขึ้นที่ 6-48 ชั่วโมง โดยให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) สูงสุดเท่ากับ 63.69±1.07% ที่ 30 ชั่วโมง (รูปที่13, 14, 15) จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหาร MOLP จะส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดี และมีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืชต่อเวลา และพบว่าแสดงความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดได้สูงสุดเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ stationary phase (รูปที่ 4.16) เนื่องจากพบค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) การเจริญเติบโตร่วมกับการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดที่สูง จาก *B. licheniformis* F2.2 ที่เจริญในอาหาร MOLP ตามสูตรอาหารของ Gu และคณะ (2005) ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน, แอมโมเนียมคลอไรด์และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนในชั่วโมงที่ 24 ดังนั้นในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2 จึงกำหนดเวลาในการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง

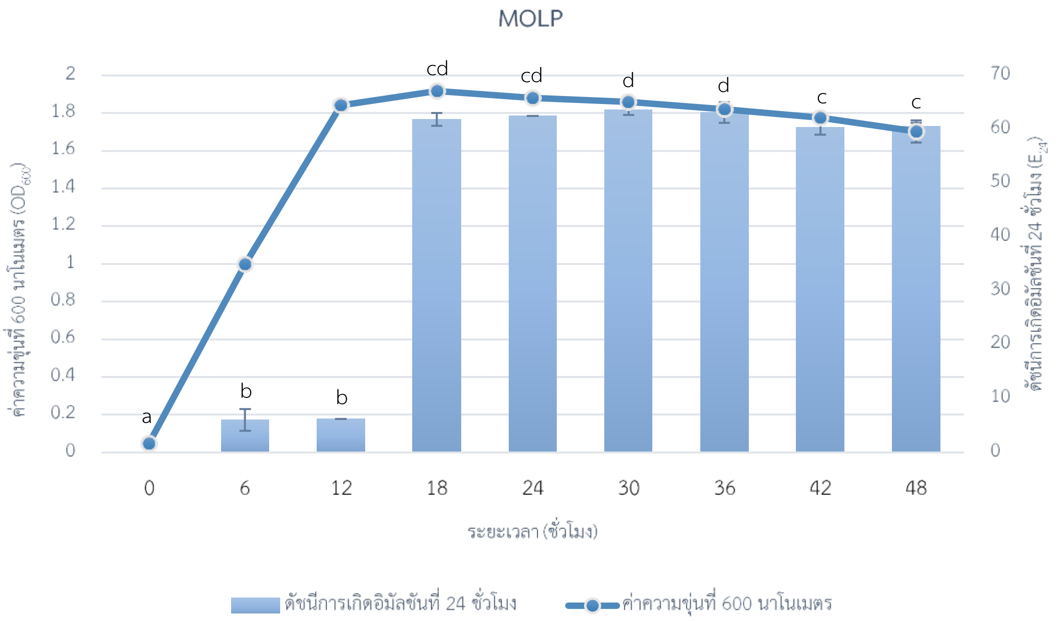


รูปที่ 4.13 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง ของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เลี้ยงในอาหาร MOLP ที่แปรผันซูโครส+แอมโมเนียมไนเตรต (S-AN)

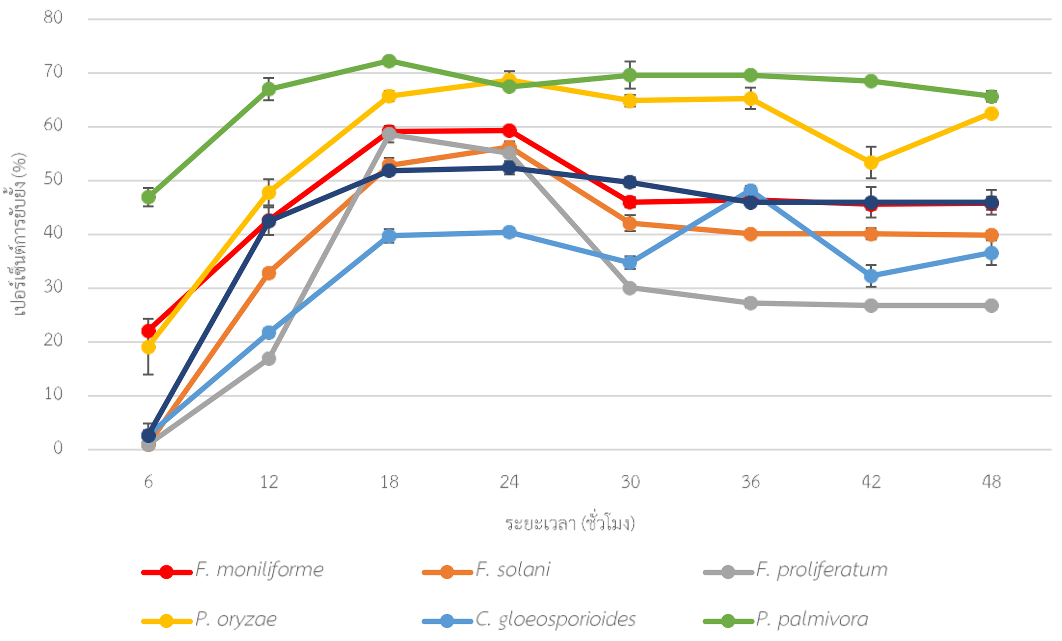
บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)



รูปที่ 4.14 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง ของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เลี้ยงในอาหาร LB บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)



รูปที่ 4.15 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง ของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เลี้ยงในอาหาร MOLP บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

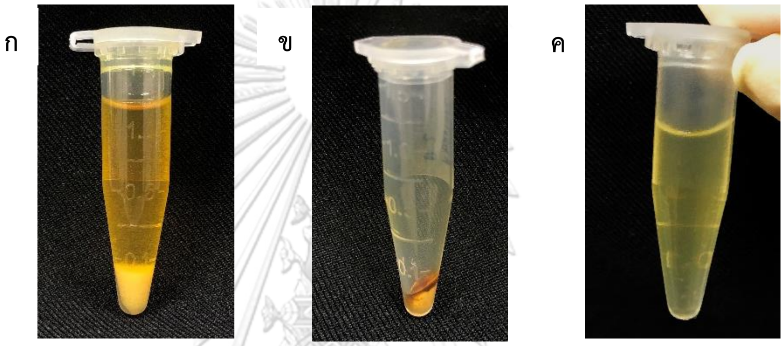


รูปที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เลี้ยงในอาหาร MOLP ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

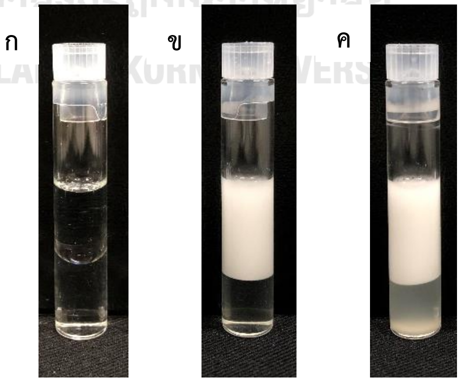
4.5 การสกัดและการแสดงลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2

เมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารเหลว MOLP (500 มิลลิลิตร) ที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเมธานอล 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วนำไประเหยเพื่อให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เข้มข้น ผลการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 1.14 กรัม/ลิตร จากนั้นละลายสารเข้มข้นที่ได้ด้วยเอธานอลในปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.17ก) แล้วระเหยเอธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ ซึ่งได้ตะกอนสีเหลืองเข้มและของเหลวหนืดสีน้ำตาล (รูปที่ 4.17ข) จากนั้นละลายสารเข้มข้นที่ได้ด้วย Tris HCl pH 7.5 ในปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และได้ของเหลวใสสีน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 4.17ค) เพื่อนำไปทดสอบต่อไป จากการทดสอบการทำให้เกิดอิมัลชัน, การกระจายตัวของน้ำมัน และการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดยวิธี agar disc diffusion แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา พบว่า เมื่อสกัดด้วยเมธานอล 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วชะสารสกัดด้วยเอธานอล สารสกัดที่ได้มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) เท่ากับ 66.67±0.00% (รูปที่ 4.18), แสดงการกระจายตัวของฟิล์ม

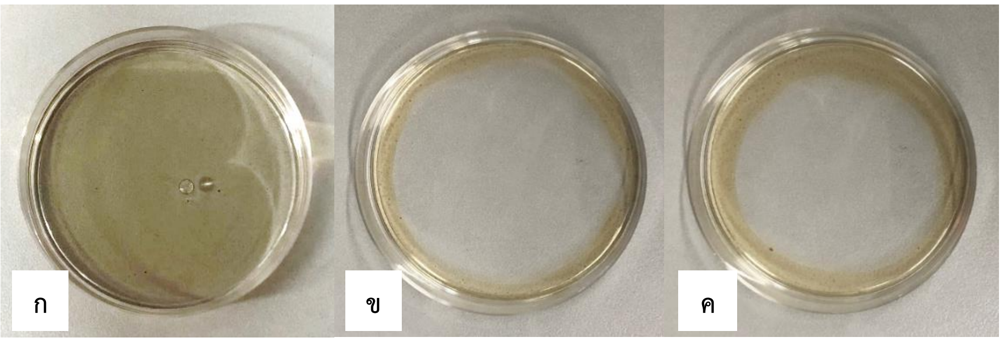
น้ำมันดิบ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลลบ (Tris HCl pH 7.5) และตัวควบคุมผลบวก (SDS) (รูปที่ 4.19) ซึ่งเสนอแนะว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้จาก *B. licheniformis* F2.2 สามารถลดแรงตึงผิวของฟิล์มน้ำมันที่คลุมบนผิวน้ำได้ จึงทำให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันขึ้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้ยังแสดงความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *P. oryzae*, *C. gloeosporioides*, *P. palmivora* และ *A. furcatum* เท่ากับ 36.5±0.00%, 56.67±2.89%, 19.44±2.78%, 33.71±1.95%, 23.21±1.55%, 18.95±4.82% และ 8.33±0.00% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้ง *F. solani* ได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.20, 4.21)



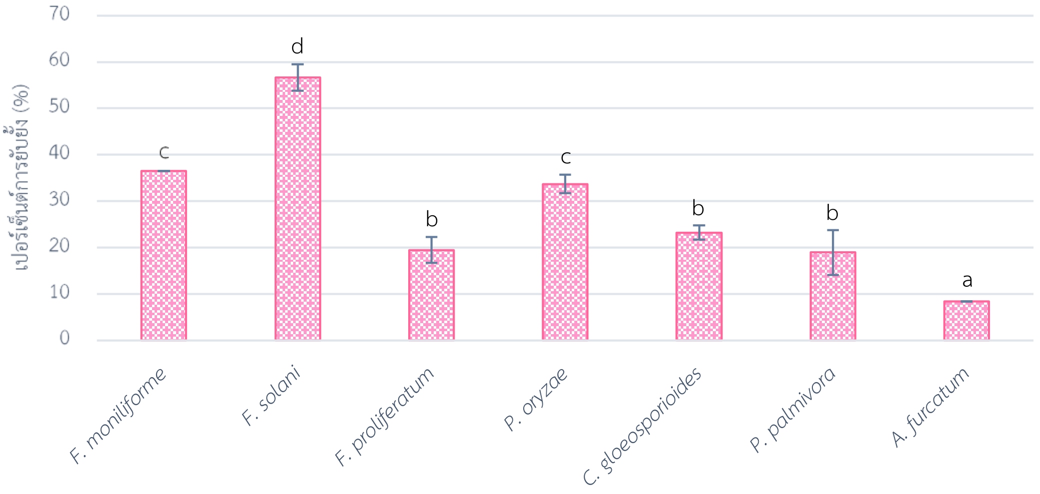
รูปที่ 4.17 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้, ก. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่ละลายด้วยเอธานอล, ข. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่ระเหยแห้งแบบสุญญากาศ เพื่อเอาเอธานอลออก และ ค. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่ละลายด้วย Tris HCl pH 7.5 และผ่านการกรองแล้ว



รูปที่ 4.18 การเกิดอิมัลชัน, ก. ตัวควบคุมผลลบ (Tris HCl pH 7.5), ข. ตัวควบคุมผลบวก (SDS) และ ค. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้

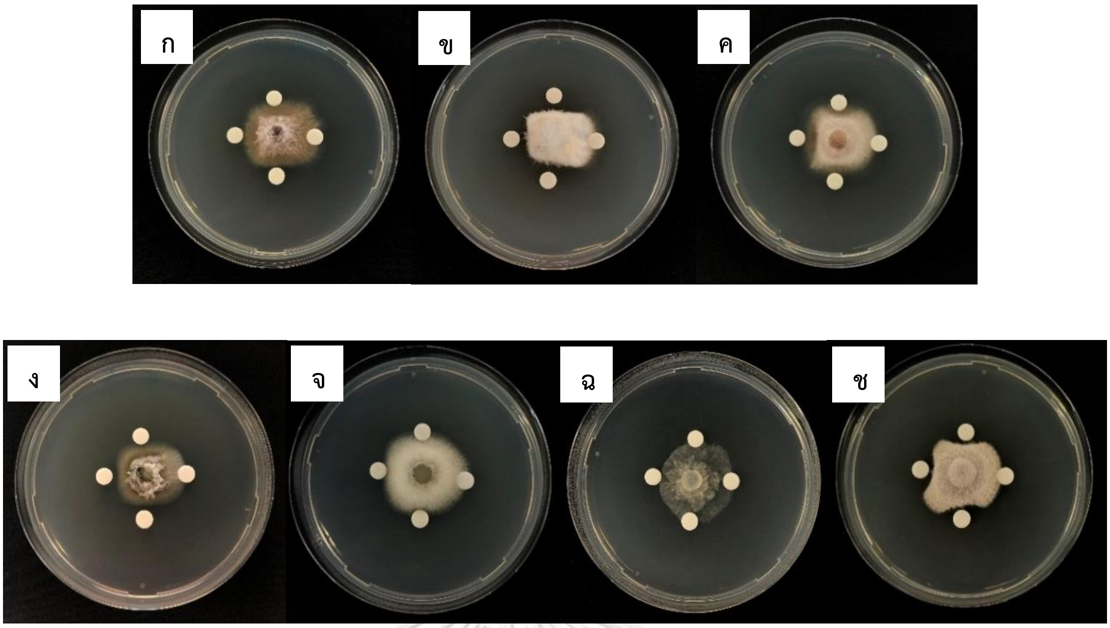


รูปที่ 4.19 การกระจายตัวของน้ำมัน, ก. ตัวควบคุมผลลบ (Tris HCl pH 7.5), ข. ตัวควบคุมผลบวก (SDS) และ ค. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้จาก *B. licheniformis* F2.2



รูปที่ 4.20 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดด้วยเมธานอล 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วชะสารสกัดด้วยเอธานอล

บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)



รูปที่ 4.21 การยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้,
ก. *F. moniliforme*, ข. *F. solani*, ค. *F. proliferatum*, ง. *P. oryzae*, จ. *C. gloeosporioides*,
ฉ. *P. palmivora* และ ช. *A. furcatum*
*แผ่นดิสก์ควบคุมของ Tris HCl pH 7.5 (ขวามือ)

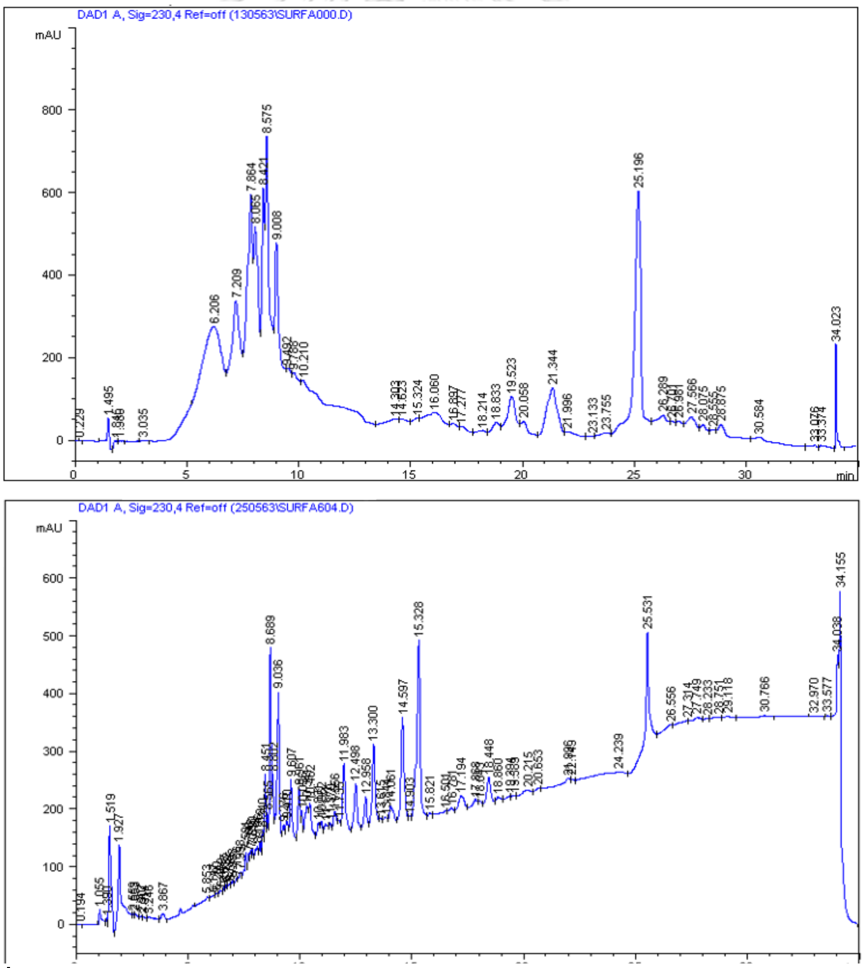
เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เปรียบเทียบกับเซอร์แฟคทินมาตรฐาน (รูปที่ 4.22ก และ 4.22ข ตามลำดับ) พบว่า ลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้มีความคล้ายกันในช่วงเวลาคงอยู่ (retention time) ที่ 5-10 และ 25 นาที แต่ในขณะเดียวกันก็ความแตกต่างกันในบางช่วงเวลา เช่น ที่ 10-15 นาที ในเบื้องต้นจึงสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* F2.2 เป็นสารชนิดเซอร์แฟคทินและแอนะล็อกของเซอร์แฟคทิน รวมทั้งยังประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอื่นด้วย เมื่อเก็บตัวอย่างแต่ละพีคบนโครมาโตแกรมในแต่ละช่วงเวลา (retention time) ได้แก่ 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 และ 30-35 นาที แล้วนำไประเหยแห้งด้วยตู้อบแห้งแบบสุญญากาศ จากนั้นละลายสารที่ได้ด้วยเอธานอลในปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร เมื่อนำไประเหยเอธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุนเหวี่ยง ได้ตะกอนสีเหลืองเข้ม โดยปริมาณตะกอนแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บสารมา ผลการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นด้วยเครื่อง HPLC ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งพบว่าที่ช่วงเวลา 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 และ 30-35 นาที ได้สาร 16, 12.9, 6.2, 14.6, 9.3, 5.9 และ 8.6 มิลลิกรัม ตามลำดับ จากสารสกัดตัวอย่างตั้งต้น 0.57 กรัม เมื่อละลายสารที่ได้ด้วย Tris HCl pH 7.5 ในปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

แล้วนำไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืช โดยวิธี agar disc diffusion แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา พบว่าแสดงความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิด โดยที่ช่วงเวลาคงอยู่ 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 และ 30-35 นาที มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *P. oryzae*, *C. gloeosporioides*, *P. palmivora* และ *A. furcatum* ในช่วงระหว่าง 4.35±1.88-14.13±1.88%, 8.91±1.71-22.05±2.36%, 2.25±0.00-10.11±1.95%, 5.33±2.31-14.67±2.31%, 2±1.73-9±1.73%, 4.35±1.88-13.04±1.88% และ 7.94±2.75-25.40±2.75% ตามลำดับ ซึ่งพบว่า *P. palmivora* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 0-5 นาทีได้ดีที่สุด, *F. moniliforme*, *F. solani* และ *F. proliferatum* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 5-10 นาทีได้ดีที่สุด, *C. gloeosporioides* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 10-15 นาทีได้ดีที่สุด, *A. furcatum* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 15-20 นาทีได้ดีที่สุด และ *P. oryzae* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 20-25 นาทีได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.23, ตารางที่ 4.3 และ 4.4)

ก

ข



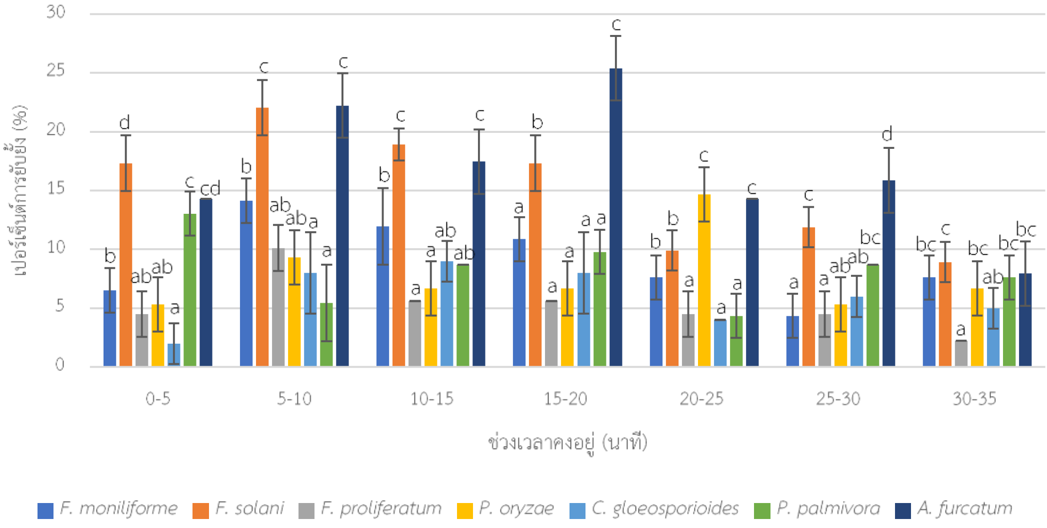
รูปที่ 4.22 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC, ก. สารมาตรฐานเซอร์แฟคทิน และ ข. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. licheniformis* F2.2

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา

ราก่อโรคในพืช	**การยับยั้ง* (%) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา (นาที)**						
	0-5	**5-10**	**10-15**	**15-20**	**20-25**	**25-30**	**30-35**
F. moniliforme	6.52±1.88^{b}	14.13±1.88^{b}	11.96±3.26^{b}	10.87±1.88^{a}	7.61±1.88^{b}	4.35±1.88^{a}	7.61±1.88^{bc}
F. solani	17.32±2.36^{d}	22.05±2.36^{c}	18.90±1.36^{c}	17.32±2.36^{b}	9.9±1.71^{b}	11.88±1.71^{c}	8.91±1.71^{c}
F. proliferatum	4.49±1.95^{ab}	10.11±1.95^{ab}	5.62±0.00^{a}	5.62±0.00^{a}	4.49±1.95^{a}	4.49±1.95^{a}	2.25±0.00^{a}
P. oryzae	5.33 ±2.31^{ab}	9.33±2.31^{ab}	6.67 ±2.31^{a}	6.67 ±2.31^{a}	14.67 ±2.31^{c}	5.33 ±2.31^{ab}	6.67 ±2.31^{bc}
C. gloeosporioides	2±1.73^{a}	8±3.46^{a}	9±1.73^{ab}	8±3.46^{a}	4±0.00^{a}	6±1.73^{ab}	5±1.73^{ab}
P. palmivora	13.04 ±1.88^{c}	5.43±3.26^{a}	8.70±0.00^{a}	9.78±1.88^{a}	4.35±1.88^{a}	8.70±0.00^{bc}	7.61±1.88^{bc}
A. furcatum	14.29±0.00^{cd}	22.22±2.75^{c}	17.46±2.75^{c}	25.40±2.75^{c}	14.29±0.00^{c}	15.87±2.75^{d}	7.94±2.75^{bc}

* แสดงค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

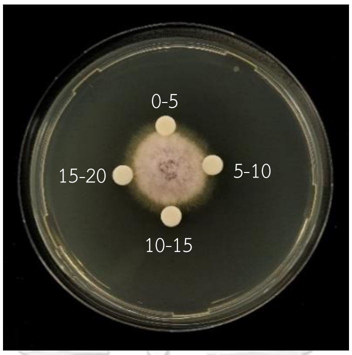
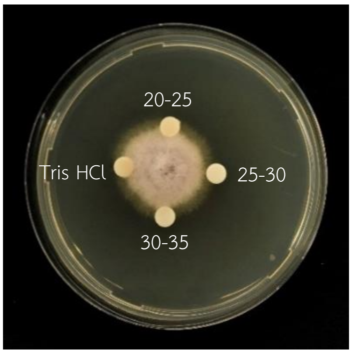
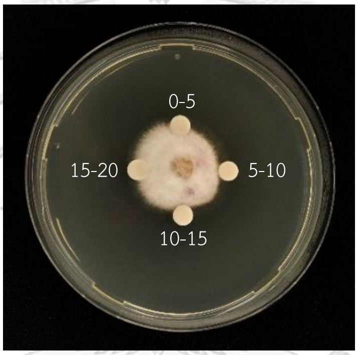
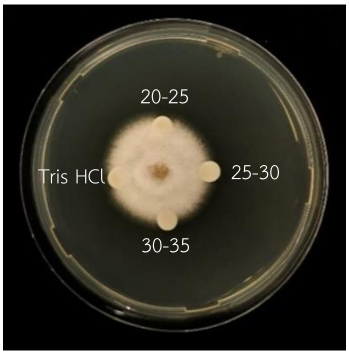
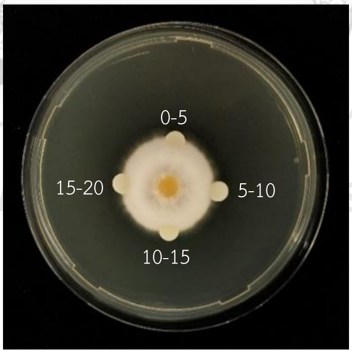
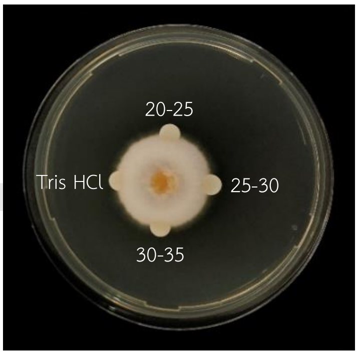
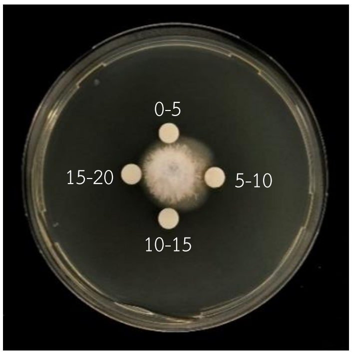
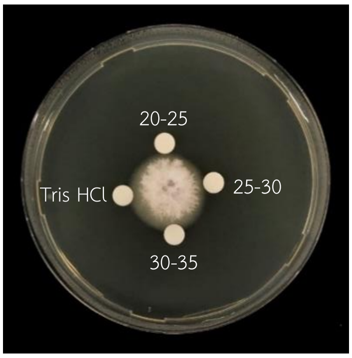
** ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (*P*<0.05)



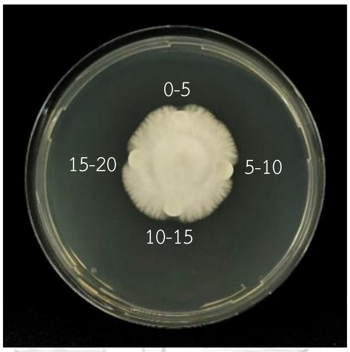
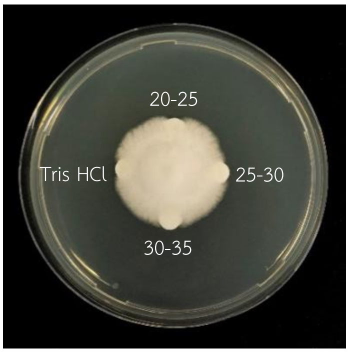
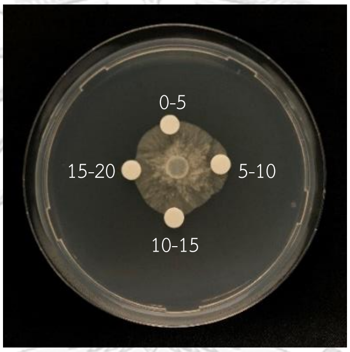
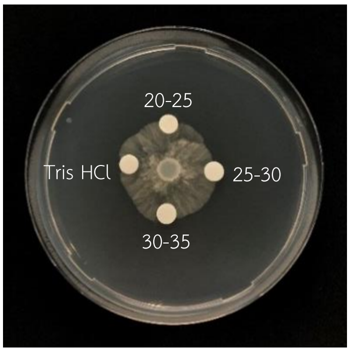
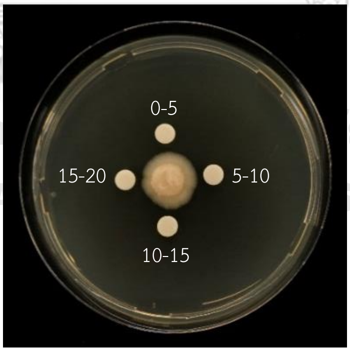
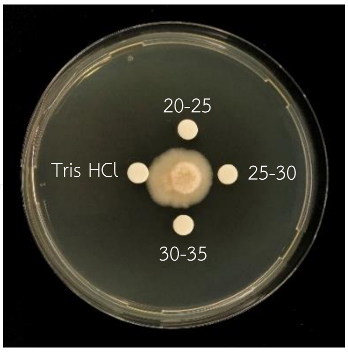
รูปที่ 4.23 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคในพืชของารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา

บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา

<table>
<tr><th>ราก่อโรคในพืช</th><th colspan="2">การยับยั้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา</th></tr>
<tr><td>F. moniliforme</td><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>F. solani</td><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>F. proliferatum</td><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>P. oryzae</td><td>
</td><td>
</td></tr>
</table>

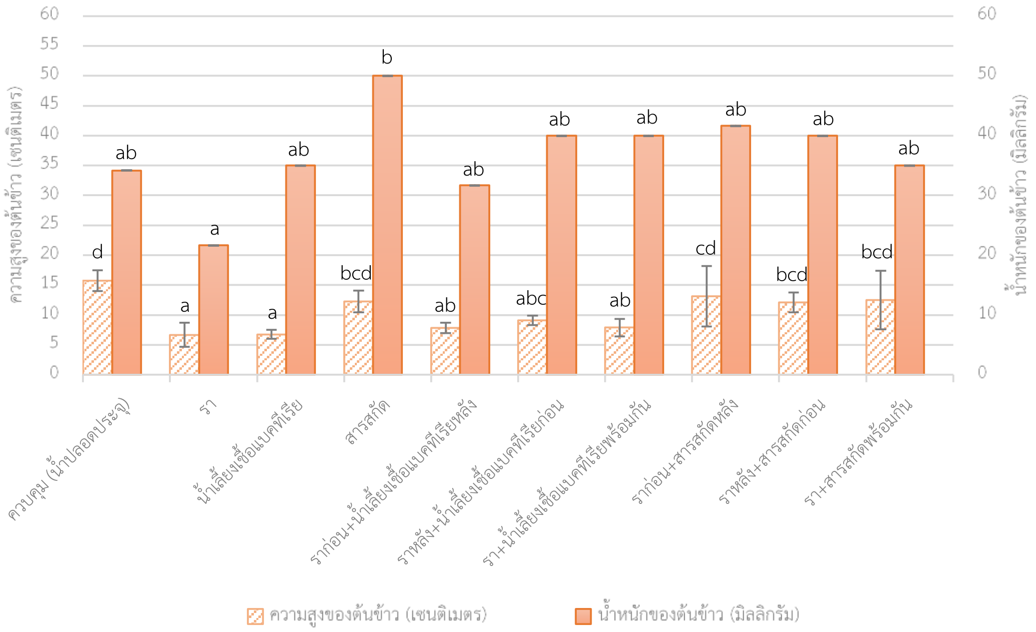
ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในพืชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา (ต่อ)

<table>
<tr><th>ราก่อโรคในพืช</th><th colspan="2">การยับยั้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละช่วงเวลา</th></tr>
<tr><td>C. gloeosporioides</td><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>P. palmivora</td><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>A. furcatum</td><td>
</td><td>
</td></tr>
</table>

4.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคบนข้าว (*in planta*)

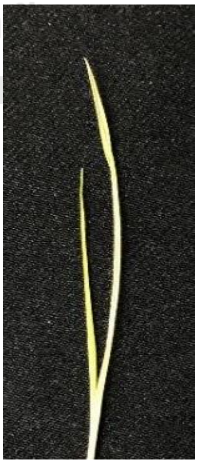
เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียมาทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* บนข้าว ที่เวลา 6 วันของการทดสอบ แล้ววัดความสูงของต้นข้าว (จากโคนต้นถึงปลายยอด) และวัดน้ำหนักสด (รวมราก) ได้ผลดังรูปที่ 4.24 และตารางที่ 4.5 โดยพบว่าชุดควบคุมผลลบที่ใส่น้ำปราศจากไอออน ต้นข้าวมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 15.75±1.73 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเท่ากับ 34.17±0.01 มิลลิกรัม ชุดการทดลองที่ใส่ราเพียงอย่างเดียว ความสูงและน้ำหนักของต้นข้าวลดลงเป็น 6.67±2.01 เซนติเมตร และ 21.67±0.00 มิลลิกรัม ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียอย่างเดียว มีความสูงของต้นข้าวเท่ากับ 6.77±0.75 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเท่ากับ 35±0.02 มิลลิกรัม ชุดการทดลองที่ใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียอย่างเดียว มีความสูงของต้นข้าวเท่ากับ 12.25±1.80 เซนติเมตร และน้ำหนักของต้นข้าวมากถึง 50±0.01 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นน้ำหนักสูงสุดในการทดสอบนี้ สำหรับชุดการทดลองที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหลังจากใส่รา, ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อนใส่รา, และใส่พร้อมกันนั้น พบว่าต้นข้าวมีความสูง 7.83±0.88, 9.1±0.77, 7.88±1.43 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีน้ำหนักของต้นข้าวเท่ากับ 31.67±0.01, 40±0.00, 40±0.01 มิลลิกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อใส่สารสกัด ไม่ว่าจะใส่สารสกัดหลังจากใส่รา, ใส่สารสกัดก่อนใส่รา หรือใส่พร้อมกันนั้น ต้นข้าวมีความสูงมากกว่าการทดลองชุดอื่น ๆ โดยมีความสูงเท่ากับ 13.12±5.05, 12.08±1.66, 12.5±4.87 เซนติเมตร ตามลำดับ และน้ำหนักของต้นข้าวเท่ากับ 41.67±0.01, 40±0.01, 35±0.02 มิลลิกรัม ตามลำดับ (รูปที่ 4.24, ตารางที่ 4.5) เมื่อตรวจสอบการเกิดโรคซึ่งให้คะแนนระดับการเกิดโรคเป็น 0-4 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งพบว่า ชุดควบคุมผลลบที่ใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว, และชุดการทดลองที่ใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียอย่างเดียว มีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 0 (ไม่เกิดโรค) ชุดการทดลองที่ใส่ราอย่างเดียว มีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 4 (เกิดโรคมากที่สุด โดยมีรอยกว้างของรอยโรค 7-8 มิลลิเมตร, มีจำนวนรอยโรค 7-8 ตำแหน่ง และต้นข้าวบางต้นแห้ง) ส่วนชุดการทดลองที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไม่ว่าใส่หลังจากใส่รา, ใส่ก่อนใส่รา และใส่พร้อมกันนั้น มีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 3 (เกิดโรคมาก โดยมีรอยกว้างของรอยโรค 5-6 มิลลิเมตร และมีจำนวนรอยโรค 5-6 ตำแหน่ง) สำหรับชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดที่ได้ ไม่ว่าใส่หลังจากใส่รา, ใส่ก่อนใส่รา, และใส่พร้อมกัน มีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 2 (เกิดโรคปานกลาง โดยมีความกว้างของรอยโรค 3-4 มิลลิเมตร และมีจำนวนรอยโรค 3-4 ตำแหน่ง), 1 (เกิดโรคเล็กน้อย โดยมีความกว้างของรอยโรค 1-2 มิลลิเมตร และมีจำนวนรอยโรค 1-2 ตำแหน่ง), และ 2 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

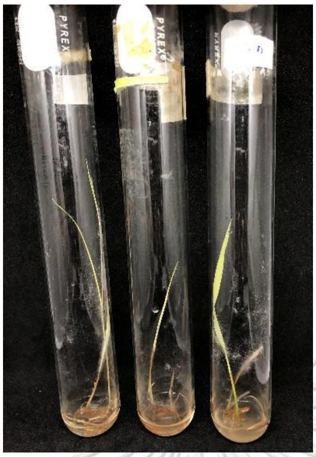


รูปที่ 4.24 ความสูงและน้ำหนักของต้นข้าว ที่เวลา 6 วันของการทดสอบ
บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

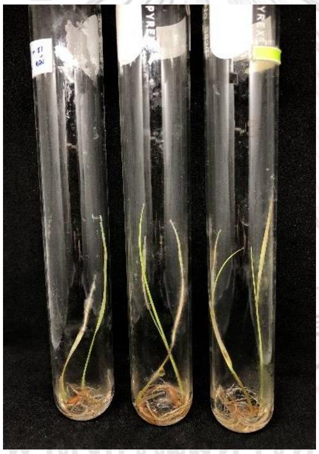
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* บนข้าว โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรีย ที่เวลา 6 วันของการทดสอบ

ชุดการทดลอง	ต้นข้าว	ใบข้าว	ระดับการเกิดโรค
ใส่น้ำปลอดประจุ (ควบคุม)			0

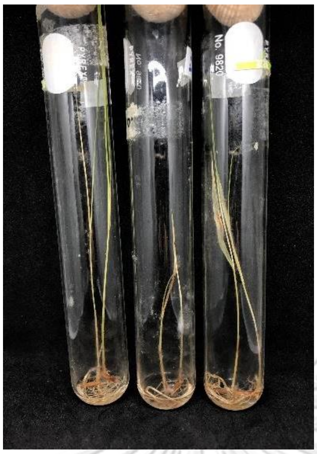
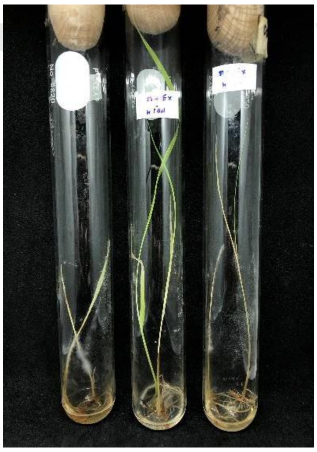
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* บนข้าว โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรีย ที่เวลา 6 วันของการทดสอบ (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ต้นข้าว	ใบข้าว	ระดับการเกิดโรค
ใส่ราอย่างเดียว			4
ใส่น้ำเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว			0
ใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียอย่างเดียว			0

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* บนข้าว โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรีย ที่เวลา 6 วันของการทดสอบ (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ต้นข้าว	ใบข้าว	ระดับการเกิดโรค
ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย หลังจากใส่รา			3
ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ก่อนใส่รา			3
ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย พร้อมใส่รา			3

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* บนข้าว โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรีย ที่เวลา 6 วันของการทดสอบ (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ต้นข้าว	ใบข้าว	ระดับการเกิดโรค
ใส่สารสกัดหลังจากใส่รา			2
ใส่สารสกัดก่อนใส่รา			1
ใส่สารสกัดพร้อมใส่รา			2

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชโดย *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2.2 ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักดอง (Thaniyavarn และคณะ, 2003) ซึ่งพบว่า *B. licheniformis* F2.2 สามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชได้ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *P. oryzae*, *C. gloeosporioides*, *P. palmivora* และ *A. furcatum* ได้ใกล้เคียงกัน ด้วยเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 34.79±6.29-44.51±1.29% นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อทดสอบการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยผสมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยสัดส่วนปริมาตรส่วนใสต่ออาหาร 1:10 สามารถพบเปอร์เซ็นต์ยับยั้งในช่วงระหว่าง 12.5±0.58-68±2.74% โดยพบว่าสามารถยับยั้ง *P. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าวได้มากที่สุด เนื่องจากส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถยับยั้งราได้ ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตขึ้นมา แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์และผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (บงกช สุทธิวาณิชกุล, 2540; ธัญญพัทธ์ จิราสิตธนวัชร์, 2560) เมื่อใช้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ในการทดสอบการยับยั้งรา พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งราน้อยกว่าการยับยั้งราด้วยแบคทีเรีย (dual culture test) เนื่องจากส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มีความเจือจางเมื่อนำไปผสมในอาหารที่หลอมเหลว และการยับยั้งราด้วยแบคทีเรียมีเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียอยู่ด้วย ซึ่งมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดี รวมถึงการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่กับเชื้อก่อโรค และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ตลอด ส่งผลต่อการเจริญและเพิ่มจำนวน จึงสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ (Ji และคณะ, 2020) ผลการทดลองเหล่านี้สอดคล้องกับงานวิจัยมากมาย เช่น จากการศึกษาของ Jeong และคณะ (2017) พบว่า *Bacillus licheniformis* MH48 ที่แยกได้จากดินรอบรากพืช แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคในพืช ได้แก่ *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Phytophthora capsici* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคโดยการผสมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ในอาหารหลอมเหลว PDA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 10, 30 และ 50% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่าทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งราได้ทั้ง 3 ชนิด และประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของส่วนใสที่ปราศจากเซลล์เพิ่มขึ้น โดยที่ 10% และ 50% ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วงระหว่าง 15-30% และ 63.1-100% ตามลำดับ และการศึกษาของ Torres และคณะ (2016) รายงานว่า *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* PGPMori7 และ *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 สามารถยับยั้ง *Macrophomina phaseolina* ที่เป็นสาเหตุของโรครากดำ(charcoal rot) ในถั่วและถั่วเหลือง พบว่าเซลล์แขวนลอย, ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ และ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารสกัดชนิดไลโพเปปไทด์ของ PGPMori7 และ PGPBacCA1 สามารถยับยั้ง *M. phaseolina* ได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ Apolinario Saravia, Campichuelo และ Olleros โดยเซลล์แขวนลอยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากที่สุดอยู่ระหว่าง 50.5-56.5% ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 32.5-37.5% และสารสกัดชนิดไลโพเปปไทด์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 4.9-18.5%

เมื่อทดสอบเพื่อยืนยันสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. licheniformis* F2.2 โดยทดสอบแอกทิวิตีการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity test), ทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเซลล์ (drop collapse test), ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement test) และทดสอบการเกิดอิมัลชัน ซึ่งวิธีการเหล่านี้ใช้ส่วนใสของแบคทีเรียในการทดสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ผลการทดสอบทั้งหมดให้ผลบวกซึ่งแสดงให้เห็นว่า *B. licheniformis* F2.2 มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการทดสอบการเกิดอิมัลชัน เป็นวิธีการเชิงคุณภาพเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น เนื่องจาก แสดงถึงปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีอยู่ในตัวอย่างส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสัมพันธ์กับค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) (Desai และคณะ,1997; Rahman และคณะ, 2003; Sarwar และคณะ, 2018) ในการทดสอบนี้ E_{24} จากส่วนใสของ *B. licheniformis* F2.2 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง มีค่า 62.5±0.00%

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรดเบสต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. licheniformis* F2.2 พบว่าเมื่อผ่านการบ่มน้ำเลี้ยงเชื้อที่ทุกอุณหภูมิที่ทดสอบคือ ที่อุณหภูมิ 20-121 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดยังคงอยู่ โดยสามารถยับยั้ง *P. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าวได้มากที่สุดรองลงมาคือ *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด นอกจากนี้ ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก็ยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 20-121 องศาเซลเซียส โดยค่า E_{24} ยังคงอยู่ในช่วงประมาณ 56.52±0.00-63.19±1.20% ซึ่งใกล้เคียงกับตัวควบคุมผลบวก (SDS) ส่วนผลของความเป็นกรดเบสพบว่าส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. licheniformis* F2.2 ยังมีความสามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิด ได้ค่อนข้างคงที่ที่ pH 2-10 และลดลงเล็กน้อยที่ pH 12 ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชยังคงเหลืออยู่มากที่สุดที่ pH 8 สำหรับความสามารถในการเกิดอิมัลชันพบว่าค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) มีความเสถียรเมื่อผ่านการทดสอบที่ pH 2-12 อยู่ในช่วงประมาณ 54.17±0.00-60.42±0.00% ซึ่งใกล้เคียงกับตัวควบคุมผลบวก (SDS) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ดีกว่าที่เคยรายงานไว้โดย Nawaz

และคณะ (2018) ที่รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. licheniformis* OE-04 แสดงฤทธิ์การต่อต้านอย่างมีนัยสำคัญต่อ *Colletotrichum gossypii* โดยมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงจาก 28 ถึง 100 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพที่ pH 5 ถึง 9 และการศึกษาของ Gong และคณะ (2006) รายงานว่า ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของ *B. subtilis* PY-1 แสดงฤทธิ์การยับยั้ง *Fusarium oxysporum* ค่อนข้างเสถียรที่ pH 5-13 แต่ลดลงที่ pH เป็นกรด (pH 1-4) ซึ่งแสดงฤทธิ์การยับยั้งสูงสุดที่ pH 7 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงจาก 25 ถึง 121 องศาเซลเซียส ด้วยกิจกรรมการยับยั้งราก่อโรคในพืชและความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ช่วงกว้างของอุณหภูมิและ pH จึงเป็นข้อดีสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการเกษตร ในสภาพแวดล้อมที่มีความผันแปรสูงในธรรมชาติเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เช่น เมื่อประยุกต์ใช้กับผักและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวโดยการจุ่มหรือฉีดพ่นน้ำเลี้ยงเชื้อหรือสารที่ผลิตได้ ร่วมกับการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ ก็จะยิ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในพืชได้ (Sharma และคณะ, 2009) โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงและ pH เป็นเบสสูง เช่น ดินที่มี pH สูงกว่า 6.5 มีสารอาหารที่จำกัด จึงจำเป็นต้องใส่ปุ๋ยให้แก่พืช และเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาผสมกับปุ๋ย พบว่าช่วยเพิ่มการละลายของปุ๋ย และมีศักยภาพในการเพิ่มการดูดซึมธาตุอาหารในดินแก่พืชด้วย (Desai และคณะ, 1997; Singh และคณะ, 2018) ซึ่งนอกจากจะมีข้อดีต่อการประยุกต์ใช้ทางการเกษตรแล้ว ยังมีรายงานว่ายังเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ทางด้านการบำบัดสารพิษและการกู้คืนน้ำมันด้วย (Sharma และคณะ, 2018)

เมื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืช พบว่า เมื่อนำมาตรวจสอบการเจริญเติบโต โดยวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ที่ 24 ชั่วโมง อาหาร MOLP ตามสูตรอาหารของ Gu และคณะ (2005) ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน, แอมโมเนียมคลอไรด์และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ค่าสูงที่สุดที่ 1.75±0.19 รองลงมาคือ อาหาร MOLP ที่แปรผันกลูโคส+แอมโมเนียมซัลเฟต (G-AS) เท่ากับ 1.70±0.12 สำหรับการเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารแบบกำหนดสูตร (DF) มีการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* F2.2 น้อยมากเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ส่วนการทำให้เกิดอิมัลชันพบว่าค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของอาหาร MOLP ที่แปรผันฟรุกโทส+แอมโมเนียมไนเตรต (F-AN) ให้ค่าสูงสุดที่ 63.52±2.93% รองลงมาคืออาหาร MOLP ที่ 62.92±2.30% และอาหาร MOLP ที่แปรผันซูโครส+แอมโมเนียมไนเตรต (S-AN) ที่ 62.04±2.41% ตามลำดับ ส่วนอาหารแบบกำหนดสูตร (DF) มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันน้อยมาก เมื่อเทียบกับตัวควบคุมผลบวก (SDS) ถึงแม้ว่าอาหาร MOLP ที่แปรผันฟรุกโทส+แอมโมเนียมไนเตรต (F-AN)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จะให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) สูงสุด แต่ในงานวิจัยนี้ไม่ได้เลือกชุดอาหารนี้เพื่อทำการทดลองต่อ ทั้งนี้เพราะฟรุกโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาค่อนข้างแพง ซึ่งหากนำไปผลิตเพื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในปริมาณมากอาจจะไม่คุ้มทุน ดังนั้นจึงเลือกอาหาร MOLP ตามสูตรอาหารของ Gu และคณะ (2005) เนื่องจากมีการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* F2.2 ได้ดีที่สุด และมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ที่ค่อนข้างสูง (62.92±2.30%) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของบงกช สุทธิวานิชกุล (2540) รายงานว่า เมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารแบบกำหนดสูตร (DF) ที่มีไฮโดรไลเซทของฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (inoculum) 4% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 นั้น มีการเจริญของแบคทีเรียสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ของน้ำมันก๊าด (kerosene) เท่ากับ 71% ซึ่งใกล้เคียงกับที่ได้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 62.92±2.30% งานวิจัยของ Das และ Kumar (2019) รายงานว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus safensis* J2 เลี้ยงในอาหาร Mineral salt medium (MSM) ที่ 72 ชั่วโมง โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นชานอ้อยซึ่งเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร แอมโมเนียมไนเตรตและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อตรวจสอบพบว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโพเปปไทด์ ในกลุ่มเซอร์แฟคทิน ให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 68.66±4.01%, ค่าลดแรงตึงผิวเท่ากับ 34±1.15 mN/m และเกิดการกระจายตัวของน้ำมันเครื่อง และจากงานวิจัยของ Chen และคณะ (2012) รายงานว่า *Bacillus licheniformis* TKU004 ที่แยกได้จากดิน เมื่อเลี้ยงในอาหาร 1% ของผงหมึก (squid pen powder ;SPP) เป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72.30 เป็น 25.42 mN/m ให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมงของน้ำมันเครื่อง เอ็นเฮกเซน และน้ำมันแร่อยู่ระหว่าง 57–68%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืชที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหาร MOLP สามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืชต่อเวลา พบว่าแสดงความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิดได้สูงสุดเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ stationary phase ดังนั้นภาวะที่นำไปใช้ต่อเพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และคณะ (2012) ที่รายงานว่า *B. licheniformis* TKU004 ที่เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แสดงการ

เจริญเติบโตที่สัมพันธ์กับการผลิตลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase รวมทั้งจากการศึกษาของ He และคณะ (2006) พบว่า *B. licheniformis* ZJU12 มีกิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุดในช่วงต้นของ stationary phase และหลังจากนั้นความสามารถในการยับยั้งจะลดลงอย่างช้า ๆ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของบงกช สุทธิวานิชกุล (2540) ที่พบว่า เมื่อ *B. licheniformis* F2.2 เข้าสู่ stationary phase ที่ 24 ชั่วโมง แบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด และมีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวได้ดีที่สุดด้วย โดยจะลดแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 66 mN/m เหลือเท่ากับ 28.3 mN/m และ 39.3 mN/m เมื่อเจือจาง 100 เท่า

เมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารเหลว MOLP (500 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเมธานอล 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ผลการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 1.14 กรัม/ลิตร แล้วชะสารสกัดด้วยเอธานอล เพื่อชะสารเข้มข้นออกมาให้ได้มากที่สุด จากนั้นระเหยเอธานอลออก แล้วละลายสารเข้มข้นที่ได้ด้วย Tris HCl pH 7.5 ในปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร พบว่าสารที่สกัดได้มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) เท่ากับ 66.67±0.00% และเมื่อนำไปทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันพบว่าเกิดการกระจายตัวของฟิล์มน้ำมันดิบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นที่สกัดได้จาก *B. licheniformis* F2.2 สามารถลดแรงตึงผิวของฟิล์มน้ำมันที่คลุมบนผิวน้ำได้ จึงทำให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันขึ้น และนอกจากนี้ยังพบว่าสารที่สกัดได้มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืชทั้ง 7 ชนิด โดยสามารถยับยั้ง *F. solani* ได้มากที่สุด โดยยับยั้งได้ 56.67±2.89 เปอร์เซ็นต์ อันดับรองลงมาคือ *F. moniliforme* โดยยับยั้งได้ 36.54±0.00 เปอร์เซ็นต์ และ *P. oryzae* โดยยับยั้งได้ 33.71±1.95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อและสารที่สกัดได้ พบว่าผลการยับยั้งราหลังการสกัดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราส่วนใหญ่ลดลง ยกเว้นสำหรับ *F. solani* ที่มีผลการยับยั้งหลังการสกัดสูงขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าเนื่องจากในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารระเหย รวมทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Rehman และคณะ, 2015; Sharma และคณะ, 2018; Li และคณะ, 2020) จึงทำงานเสริมกันและส่งผลทำให้ยับยั้งได้ดี แต่เมื่อผ่านการสกัดเพื่อให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น สารออกฤทธิ์ชนิดอื่นมีปริมาณลดลงจนถึงอาจไม่เหลืออยู่เลย จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราชนิดอื่นลดลง แต่การยับยั้ง *F. solani* มีค่าสูงขึ้น อาจเกิดจากฤทธิ์การรยับยั้ง *F. solani* ในน้ำเลี้ยงเชื้อเกิดจากสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นส่วนใหญ่ เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกสกัดให้เข้มข้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ขึ้นจึงแสดงความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* ได้ดีขึ้น จากงานวิจัยของ Gong และคณะ (2015) รายงานว่า *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโพเปปไทด์ได้หลายชนิด ได้แก่ อิทูริน พลิพาสทาทิน และเซอร์แฟคทิน ซึ่งสารสกัดของอิทูริน และพลิพาสทาทิน มีความสามารถในการยับยั้ง *Fusarium graminearum* ได้ดี โดยพบว่าทำให้เซลล์ของราเกิดการรั่วไหล, เกิดช่องว่าง (vacuolation) ภายในเซลล์, ทำลายสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ และทำให้ไม่เกิดการเจริญของรา

P. oryzae เป็นราที่ทำให้เกิดโรคไหม้ (blast) ในพืชตระกูลหญ้าหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะข้าวที่สามารถสร้างความเสียหายให้ข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โรคใบไหม้ในข้าวเป็นหนึ่งในโรคที่ร้ายแรงที่สุดของข้าวที่ปลูก เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียมาทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* บนต้นข้าว (*in planta*) พบว่าชุดการทดลองที่ใส่ราก่อนแล้วตามด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียนั้น มีความสูงของต้นข้าวสูงที่สุดเท่ากับ 13.12±5.05 เซนติเมตร และน้ำหนักของต้นข้าวเท่ากับ 41.67±0.01 มิลลิกรัม ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ โดยเกิดรอยไหม้บนใบข้าวน้อยกว่าชุดการทดสอบที่ใส่ส่วนใสของ *B. licheniformis* F2.2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความสามารถในการรักษาโรคที่มีสาเหตุจาก *P. oryzae* ได้ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในป้องกันการโรค และยับยั้งโรคได้ เมื่อเทียบกับการทดลองชุดอื่น ผลการทดลองในข้าวด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ให้ผลการยับยั้งโรคเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2017) รายงานว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ Z-14 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ที่เป็นราก่อโรคในข้าวสาลี พบว่าสารสกัดหยาบช่วยลดความรุนแรงของโรคในรากต้นอ่อนข้าวสาลีลง 91.3% และข้าวสาลีที่ปลูกในกระถาง 69.8% อีกทั้งยังเพิ่มการเจริญของความยาวรากและน้ำหนักสดเมื่อเทียบกับการควบคุมที่ใส่ราอย่างเดียว และพบว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดอิทูริน การศึกษาของ Li และคณะ (2020) ที่พบว่าเมื่อจุ่มใบพริกไทยในอาหาร LB ที่มี *B. licheniformis* BL06 และใส่ *Phytophthora capsici* ซึ่งทำให้เกิดโรคต้นเหี่ยว (Phytophthora blight) กับพริกไทยและพืชอื่น ๆ พบว่าชุดทดลองที่มี BL06 มีรอยโรคเล็กกว่าชุดควบคุมที่ใส่อาหาร LB และสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ 70.56% และเมื่อใส่ BL06 ลงที่รากของต้นพริกไทยแล้วนำไปปลูก หลังจากนั้นใส่ *P. capsici* ลงไปใกล้ราก พบว่าดัชนีการเกิดโรคในต้นพริกไทยลดลง ซึ่ง BL06 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ยับยั้งการเคลื่อนไหว และย่อยซูโอสปอร์ของราได้ อีกการศึกษาหนึ่งของ Silimela และ Korsten (2007) พบว่าเมื่อสเปรย์น้ำเลี้ยงเชื้อที่มี *B. licheniformis* บนผิวใบมะม่วง

แบคทีเรียสามารถยึดติดบนใบได้อย่างรวดเร็ว และหลังจากนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่ง Silimela และ Korsten รายงานว่าการยึดติดบนเจ้าบ้านเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากเป็นขั้นตอนแรกในการกำหนดการตั้งรกรากและการอยู่รอดของแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อทดสอบการยับยั้งราพบว่า *B. licheniformis* ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส, โรคจุดดำของแบคทีเรีย และโรคเน่าเละได้ ในด้านการส่งเสริมการเจริญ Sukkasem และคณะ (2018) ได้ศึกษา *B. licheniformis* CH102 ที่แยกได้จากรากพืช พบว่า CH102 สามารถผลิตสารระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ 20-50% เมื่อปลูกต้นกล้า *Arabidopsis* ร่วมกับ CH102 พบว่ามีจำนวนขนรากและน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น และยังทำให้พืชสามารถทนต่อความร้อนและความแห้งแล้งได้ และยังพบการชักนำการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำให้มีส่วนร่วมในการต้านทานโรค มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ มีการผลิตฮอร์โมนที่ใช้ในการส่งสัญญาณเพื่อการต้านทานต่อเชื้อก่อโรค เช่น jasmonic acid (JA) และ abscisic acid (ABA) อีกทั้งยังทำให้เกิดการดูดซึมไนโตรเจนเพิ่มขึ้นด้วย

เนื่องจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถผลิตเซอร์แฟคทินได้ (Jimoh และ Lin, 2019; Fei และคณะ, 2020) จึงใช้เซอร์แฟคทินเป็นสารมาตรฐาน เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เปรียบเทียบกับเซอร์แฟคทินมาตรฐาน พบว่า ลักษณะของโครมาโตแกรมของเซอร์แฟคทินมาตรฐานประกอบด้วยพีคหลักที่ช่วงเวลาคงอยู่ 5-10 และ 25 นาที ซึ่งพีคที่ช่วงเวลาคงอยู่ที่แตกต่างกันเหล่านี้เกิดจากการมีเซอร์แฟคทินและแอนะล็อกของเซอร์แฟคทินที่มีความแตกต่างกันที่ความยาวของสายคาร์บอน และการแทนที่ของกรดไขมัน (Biniarz และ Łukaszewicz, 2017; Sigma-Aldrich, 2017) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคล้ายกันกับเซอร์แฟคทินมาตรฐานที่ช่วงเวลาคงอยู่เหล่านี้เบื้องต้นจึงสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* F2.2 เป็นสารชนิดเซอร์แฟคทิน และประกอบด้วยแอนะล็อกของเซอร์แฟคทินซึ่งมีความยาวของสายคาร์บอนแตกต่างกัน แต่ในขณะเดียวกันสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ ยังมีพีคที่บางช่วงเวลาคงอยู่ที่แตกต่างจากเซอร์แฟคทินมาตรฐาน เช่น ที่ 10-15 นาที ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* F2.2 ยังมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอื่นด้วย ซึ่งอาจเป็นพลิพาสทาทินตามที่รายงานไว้โดย Thaniyavarn (2003) เมื่อเก็บตัวอย่างแต่ละพีคบนโครมาโตแกรมในแต่ละช่วงเวลาคงอยู่ ได้แก่ 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 และ 30-35 นาที จากนั้นนำไประเหยแห้งแล้วนำไปทดสอบการยับยั้งรา พบว่าทุกช่วงเวลาคงอยู่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 7 ชนิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สอดคล้องกับโครมาโตแกรมที่ช่วงเวลาคงอยู่ 5-10 และ 25 นาที จึงเป็นไปได้ว่าสารที่สกัดได้น่าจะเป็นเซอร์แฟคทินและอะนาล็อกของเซอร์แฟคทิน และแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งราหลายชนิด ขณะที่ช่วงเวลาคงอยู่อื่นน่าจะมีสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราหลายชนิดได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า *P. palmivora* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 0-5 นาทีได้ดีที่สุด, *F. moniliforme*, *F. solani* และ *F. proliferatum* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 5-10 นาทีได้ดีที่สุด, *C. gloeosporioides* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 10-15 นาทีได้ดีที่สุด, *A. furcatum* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 15-20 นาทีได้ดีที่สุด และ *P. oryzae* ถูกยับยั้งด้วยสารที่เก็บมาช่วง 20-25 นาทีได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแต่ละแอนะล็อกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติในการยับยั้งราได้แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของบงกช สุทธิวาณิชกุล (2540) ที่เลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารแบบกำหนดสูตร (DF) ที่มีไฮโดรไลเซทของฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลของสารลดแรงตึงผิวที่คล้ายกับงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Thaniyavarn (2003) ซึ่งเมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหาร YPD จะผลิตเซอร์แฟคทินและพลิพาสทาทินในปริมาณมาก และเมื่อเลี้ยงในอาหารแบบกำหนดสูตร (DF) ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่านอกจากจะพบการผลิตเซอร์แฟคทินและพลิพาสทาทินแล้ว ยังมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่ BL1193 (non-lipopeptide) ด้วย จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหารต่างชนิด จะทำให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสำหรับงานวิจัยนี้ เพื่อยืนยันผลว่าสารที่สกัดได้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใด อาจต้องทดสอบร่วมกับสารมาตรฐานชนิดอื่นเพิ่มเติม และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่น ๆ เช่น FTIR, NMR และ ESI-MS เป็นต้น

จากงานวิจัยนี้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในพืชจาก *B. licheniformis* F2.2 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* บนข้าวได้ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมราชนิดนี้ในข้าวต่อไป ซึ่งการนำไปใช้สามารถนำไปใช้ได้ทั้งเซลล์ ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ และสารสกัด โดยต้องคำนึงถึงความเข้มข้นที่นำไปใช้และความเหมาะสมต่อการใช้งาน ซึ่งเซลล์อาจจะใช้เวลาในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในขณะที่ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์จะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน และสารสกัดจะเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้ทันที อย่างไรก็ตาม ยังควรศึกษาเพิ่มเติมสำหรับผลการยับยั้งราชนิดอื่นบนพืชชนิดอื่นด้วย เพื่อขยายขอบเขตการใช้งานราทางด้านการเกษตรแบบองค์รวม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

1. อาหารแข็ง Luria Bertani (LB) Agar

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว Luria Bertani (LB) Broth

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth)	24	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4. อาหารแข็ง V8

น้ำผักผสมตรา V8	50	มิลลิลิตร
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเหลว Medium Optimal for Lipopeptide Production (MOLP)

ก.

โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.5	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม

ข.

เฟอรัสซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($FeSO_4{\cdot}7H_2O$)	0.002	กรัม
ซิงก์ซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($ZnSO_4{\cdot}7H_2O$)	0.011	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4{\cdot}7H_2O$)	0.049	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4{\cdot}H_2O$)	0.003	กรัม

ค.

ซูโครส	22.431	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	2.781	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในข้อ ก. ในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็น แล้วเติมส่วนผสมในข้อ ข. ที่เตรียมแยกชนิดเป็น stock solution 1000X และผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารส่วน ก. และเติมส่วนผสมในข้อ ค. ที่เตรียมแยกชนิดเป็น stock solution 10X โดยซูโครสผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็น และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็น

6. อาหารเหลวแบบกำหนดสูตร (Defined Medium; DF)

ก.

กลูโคส	20	กรัม

ข.

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	4	กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.4	กรัม
โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.1	กรัม
กรดฟอสเฟอริก (H_3PO_4)	0.5	มิลลิลิตร
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53	มิลลิกรัม

ค.

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.284	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	1.71	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดตโมโนไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot H_2O$)	0.7	มิลลิกรัม
ซิงก์ซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.9	มิลลิกรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	4.3	มิลลิกรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.1	มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200	มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโทธีเนต (calcium-pantothenate)	1.176	ไมโครกรัม
ไบโอติน (biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดโฟลิก (folic acid)	5.88	ไมโครกรัม
ไอโนซิทอล (inositol)	0.588	มิลลิกรัม
ไนอะซิน (niacin)	1.176	มิลลิกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid)	0.588	มิลลิกรัม
ไพริดอกซีน-ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (riboflavin)	0.588	มิลลิกรัม
ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม

นำส่วนผสมในข้อ ก. ที่เตรียมแยกชนิดเป็น stock solution 10X ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็นผสมกับส่วนผสมในข้อ ข. ที่นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็น และเติมส่วนผสมในข้อ ค. ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

7. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (2X PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth)	48	กรัม
ผงวุ้น	30	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหารแข็ง V8 (2X V8)

น้ำผักผสมตรา V8	100	มิลลิลิตร
ผงวุ้น	30	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (1.2X PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth)	28.8	กรัม
ผงวุ้น	18	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. อาหารแข็ง V8 (1.2X V8)

น้ำผักผสมตรา V8	60	มิลลิลิตร
ผงวุ้น	18	กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. Blood Agar

แบคโตเปบโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนอาหารมีอุณหภูมิเย็นลงประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่เลือดลงไป 50 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

1. กลีเซอรอล 15%

กลีเซอรอล 87%	17.24	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	82.76	มิลลิลิตร

ผสมกลีเซอรอลให้เข้ากันกับน้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย 1% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1	กรัม

ค่อย ๆ ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร โดยทำในตู้ดูดควัน และต้องใส่มาสก์ปิดจมูกเพื่อป้องกันฝุ่นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต อาจต้องอุ่นด้วยความร้อนเพื่อช่วยการละลาย เมื่อละลายหมดเติมน้ำปราศจากไอออนให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1000	มิลลิลิตร

ผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เข้ากันกับน้ำ จากนั้นเก็บไว้ในขวดพลาสติกพอลิโพรไพลีน

4. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์	50	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	50	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันจากนั้นเก็บในขวดสีชา

5. สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH 7.5

Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)	121	กรัม

ละลายสารเคมีในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

6. สารละลายของปุ๋ย

ปุ๋ยตราม้าบินสูตร 15-15-15 1.25 กรัม

ละลายสารเคมีในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2561). ข้อมูลเตือนภัยการเกษตร. http://at.doa.go.th/ew/pdf/145_aug61_1.pdf. เข้าถึงเมื่อ 20 กรกฎาคม 2561.

ไทยรัฐฉบับพิมพ์. (2560). ฉบับวันที่ 7 พฤศจิกายน 2560. โรคเน่ารุกสวนทุเรียน 4 จว. ผู้เชี่ยวชาญฯ แนะวิธีรับมือ. https://www.thairath.co.th/content/1118292. เข้าถึงเมื่อ 17 มิถุนายน 2561.

ธัญญพัทธ์ จิราสิตธนวัชร์. (2560). การคัดกรองจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตรึงผิวชีวภาพจากดินตัวอย่างที่มีความสามารถในการยับยั้งราโรคพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ระดับปริญญาบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บงกช สุทธิวาณิชกุล. (2540). การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์จาก *Bacillus licheniformis* F2.2 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รพีวรรณ โสวรรณปรีชา. (2559). สารออกฤทธิ์จาก *Bacillus subtilis* N3 และ *Pseudomonas aeruginosa* RS1 ในการยับยั้งราก่อโรคในกล้วยไม้. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย ภาสบุตร, สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ. (2562). สำรวจ รวบรวม และจำแนกรา *Fusarium* สาเหตุโรคพืช, Surveying, Collecting and Identification of Plant Pathogenic *Fusarium*. http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=1865. เข้าถึงเมื่อ 25 เมษายน 2563.

Agrios GN. 2005. chapter eleven - Plant Diseases Caused by fungi. in *PLANT PATHOLOGY (FIFTH EDITION)* (ed. GN Agrios), pp. 385-614. Academic Press, San Diego.

Ambrico A, Trupo M. 2017. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology* **134**: 5-10.

Anjum F, Gautam G, Edgard G, Negi S. 2016. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource Technology* **213**: 262-269.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Araújo HWC, Andrade RFS, Montero-Rodríguez D, Rubio-Ribeaux D, Alves da Silva CA, Campos-Takaki GM. 2019. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microbial Cell Factories* **18**: 2-2.

Avasthi S, Gautam AK, Bhaduaria R. 2018. Changes in biochemical components in *Aloe vera* (L.) Burm. f. leaves infected with *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **11**: 61-66.

Azizi P, Osman M, Hanafi MM, Sahebi M, Yusop MR, Taheri S. 2019. Adaptation of the metabolomics profile of rice after *Pyricularia oryzae* infection. *Plant Physiology and Biochemistry* **144**: 466-479.

Bach E, dos Santos Seger GD, de Carvalho Fernandes G, Lisboa BB, Passaglia LMP. 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology* **99**: 141-149.

Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit NV. 2014. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology* **5**: 697.

Barrios-Roblero C, Rosas-Quijano R, Salvador-Figueroa M, Gálvez-López D, Vázquez-Ovando A. 2019. Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Bioscience* **29**: 47-54.

Ben Amira M, Lopez D, Triki Mohamed A, Khouaja A, Chaar H, Fumanal B, Gousset-Dupont A, Bonhomme L, Label P, Goupil P et al. 2017. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control* **110**: 70-78.

Biniarz P, Łukaszewicz M. 2017. Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**: 4747-4759.

Boddy L. 2016. Chapter 8 - Pathogens of Autotrophs. in *The FUNGI (THIRD EDITION)* (eds. SC Watkinson, L Boddy, NP Money), pp. 245-292. Academic Press, Boston.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Bodour AA, Miller-Maier RM. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **32**: 273-280.

Brycki B, Kowalczyk I, Szulc A, Kaczerewska O, Pakiet M. 2017. Multifunctional Gemini Surfactants: Structure, Synthesis, Properties and Applications. in *APPLICATION and CHARACTERZATION of SURFACTANTS* (ed. R Najjar), pp. 97-156. IntechOpen, Rijeka, Croatia.

Chang KF, Hwang SF, Conner RL, Ahmed HU, Zhou Q, Turnbull GD, Strelkov SE, McLaren DL, Gossen BD. 2015. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada. *Crop Protection* **67**: 52-58.

Chen W-C, Juang R-S, Wei Y-H. 2015. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Chemical Engineering Journal* **103**: 158-169.

Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süssmuth R, Piel J, Borriss R. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology* **140**: 27-37.

Chen Y-C, Chiang T-J, Liang T-W, Wang IL, Wang S-L. 2012. Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **1**: 62-69.

Chinnapun D, Tian M, Day B, Churngchow N. 2009. Inhibition of a Hevea brasiliensis protease by a Kazal-like serine protease inhibitor from *Phytophthora palmivora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**: 27-33.

Clarke K, Ballot F, Reid S. 2010. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphate limitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**: 2179-2184.

Cooper DG, Goldenberg BG. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 224-229.

Cruz CD, Valent B. 2017. Wheat blast disease: danger on the move. *Tropical Plant Pathology* **42**: 210-222.

Darvishi P, Ayatollahi S, Mowla D, Niazi A. 2011. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **84**: 292-300.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Das AJ, Kumar R. 2019. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation* **16**: 100450.

de Menezes HD, Tonani L, Bachmann L, Wainwright M, Braga GÚL, von Zeska Kress MR. 2016. Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **164**: 1-12.

Desai JD, Banat IM. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 47-64.

Dimkić I, Živković S, Berić T, Ivanović Ž, Gavrilović V, Stanković S, Fira D. 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control* **65**: 312-321.

Dugan FM, Lupien SL, Hellier BC. 2019. Infection by *Fusarium proliferatum* in aerial garlic bulbils is strongly reduced compared to rates in seed cloves when both originate from infected bulbs. *Crop Protection* **116**: 43-48.

Eke P, Chatue Chatue G, Wakam LN, Kouipou RMT, Fokou PVT, Boyom FF. 2016. Mycorrhiza consortia suppress the fusarium root rot (*Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biological Control* **103**: 240-250.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* **88**: 282-291.

España MD, Arboleda JW, Ribeiro JA, Abdelnur PV, Guzman JD. 2017. Eucalyptus leaf byproduct inhibits the anthracnose-causing fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Industrial Crops and Products* **108**: 793-797.

Farias JM, Stamford TCM, Resende AHM, Aguiar JS, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA. 2019. Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules* **129**: 853-860.

Fei D, Liu F-F, Gang H-Z, Liu J-F, Yang S-Z, Ye R-Q, Mu B-Z. 2020. A new member of the surfactin family produced by *Bacillus subtilis* with low toxicity on erythrocyte. *Process Biochemistry* **94**: 164-171.

Feng G, Zhang X-S, Zhang Z-K, Ye H-C, Liu Y-Q, Yang G-Z, Chen C, Chen M, Yan C, Wang L-Y et al. 2019. Fungicidal activities of camptothecin semisynthetic derivatives against *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* and in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology* **147**: 139-147.

Fernandez J, Orth K. 2018. Rise of a Cereal Killer: The Biology of *Magnaporthe oryzae* Biotrophic Growth. *Trends in Microbiology* **26**: 582-597.

Forlani G, Occhipinti A, Bossi S, Bertea CM, Varese C, Maffei ME. 2011. *Magnaporthe oryzae* cell wall hydrolysate induces ROS and fungistatic VOCs in rice cell cultures. *Journal of Plant Physiology* **168**: 2041-2047.

Gong A-D, Li H-P, Yuan Q-S, Song X-S, Yao W, He W-J, Zhang J-B, Liao Y-C. 2015. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* **10**: e0116871.

Gong M, Wang JD, Zhang J, Yang H, Lu XF, Pei Y, Cheng JQ. 2006. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (iturin A). *Acta biochimica et biophysica Sinica* **38**: 233-240.

Gu XB, Zheng ZM, Yu HQ, Wang J, Liang FL, Liu RL. 2005. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. *Process Biochemistry* **40**: 3196-3201.

Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot CK. 2016. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Food Microbiology* **232**: 134-143.

Hamza F, Kumar AR, Zinjarde S. 2018. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus licheniformis* in protecting *Artemia salina* against *Vibrio alginolyticus* and *Pseudomonas gessardii*. *Microbial Pathogenesis* **116**: 335-344.

Han J, Wang F, Gao P, Ma Z, Zhao S, Lu Z, Lv F, Bie X. 2017. Mechanism of action of AMP-jsa9, a LI-F-type antimicrobial peptide produced by *Paenibacillus polymyxa* JSa-9, against *Fusarium moniliforme*. *Fungal Genetics and Biology* **104**: 45-55.

Han Y-c, Zeng X-g, Xiang F-y, Zhang Q-h, Guo C, Chen F-y, Gu Y-c. 2018. Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. *Journal of Integrative Agriculture* **17**: 1391-1400.

Hanada RE, Pomella AWV, Soberanis W, Loguercio LL, Pereira JO. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control* **50**: 143-149.

Harris DC, Cardon JA, Justin SHFW, Passey AJ. 1984. *Phytophthora palmivora* on cultured roots of coconut. *Transactions of the British Mycological Society* **82**: 249-255.

He DC, Zhan JS, Xie LH. 2016. Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view. *Journal of Integrative Agriculture* **15**: 705-715.

He L, Chen W, Liu Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like pepitdes by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research* **161**: 321-326.

Hebbar KP, Atkinson D, Tucker W, Dart PJ. 1992. Suppression of *Fusarium moniliforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry* **24**: 1009-1020.

Huang R, Feng Z, Chi X, Sun X, Lu Y, Zhang B, Lu R, Luo W, Wang Y, Miao J et al. 2018. Pyrrolnitrin is more essential than phenazines for *Pseudomonas chlororaphis* G05 in its suppression of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research* **215**: 55-64.

Chulalongkorn University

Hung PM, Wattanachai P, Kasem S, Poaim S. 2015. Biological control of *Phytophthora palmivora* causing root rot of pomelo using *Chaetomium* spp. *Mycobiology* **43**: 63-70.

Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T, Borriss R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* **148**: 2097-2109.

Jamalizadeh M, Etebarian HR, Aminian H, Alizadeh A. 2011. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPO Bulletin* **41**: 65-71.

Jenny K, Deltrieu V, Käppeli O. 1993. Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. in *Biosurfactants: Production, Properties, Applications* (ed. N Kosaric), pp. 135-156. Marcel Dekker, New York.

Jeong M-H, Lee Y-S, Cho J-Y, Ahn Y-S, Moon J-H, Hyun H-N, Cha G-S, Kim K-Y. 2017. Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. *Microbial pathogenesis* **110**: 645-653.

Ji Z-L, Peng S, Chen L-L, Liu Y, Yan C, Zhu F. 2020. Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent. *International Journal of Biological Macromolecules* **145**: 594-603.

Jiang C, Li Z, Shi Y, Guo D, Pang B, Chen X, Shao D, Liu Y, Shi J. 2020. *Bacillus subtilis* inhibits *Aspergillus carbonarius* by producing iturin A, which disturbs the transport, energy metabolism, and osmotic pressure of fungal cells as revealed by transcriptomics analysis. *International Journal of Food Microbiology* **330**: 108783.

Jiang C, Song J, Zhang J, Yang Q. 2017. Identification and characterization of the major antifungal substance against *Fusarium sporotrichioides* from *Chaetomium globosum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **33**: 108.

Jiang ZQ, Guo YH, Li SM, Qi HY, Guo JH. 2006. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against *Phytophthora* blight of bell pepper. *Biological Control* **36**: 216-223.

Jimoh AA, Lin J. 2019. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **184**: 109607.

Kilani-Feki O, Ben Khedher S, Dammak M, Kamoun A, Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M, Tounsi S. 2016. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biological Control* **95**: 73-82.

Krishnan N, Velramar B, Velu RK. 2019. Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **155**: 101-107.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Lee JP, Lee S-W, Kim CS, Son JH, Song JH, Lee KY, Kim HJ, Jung SJ, Moon BJ. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control* **37**: 329-337.

Lei S, Wang L, Liu L, Hou Y, Xu Y, Liang M, Gao J, Li Q, Huang S. 2019. Infection and colonization of pathogenic fungus *Fusarium proliferatum* in rice spikelet rot disease. *Rice Science* **26**: 60-68.

Li Y, Feng X, Wang X, Zheng L, Liu H. 2020. Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* BL06 on *Phytophthora capsici* in pepper by multiple modes of action. *Biological Control*: 104210.

Liu B, Liu J, Ju M, Li X, Yu Q. 2016. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollution Bulletin* **107**: 46-51.

Liu F, Tu K, Shao X, Zhao Y, Tu S, Su J, Hou Y, Zou X. 2010. Effect of hot air treatment in combination with *Pichia guilliermondii* on postharvest anthracnose rot of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology* **58**: 65-71.

Liu K, Sun Y, Cao M, Wang J, Lu JR, Xu H. 2020. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **45**: 57-67.

Medeot DB, Bertorello-Cuenca M, Liaudat JP, Alvarez F, Flores-Cáceres ML, Jofré E. 2017. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media. *Biological Control* **115**: 119-128.

Mercier J, Jiménez JI. 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology* **31**: 1-8.

Moreno-Chacón AL, Camperos-Reyes JE, Ávila Diazgranados RA, Romero HM. 2013. Biochemical and physiological responses of oil palm to bud rot caused by *Phytophthora palmivora*. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**: 246-251.

Morikawa M, Daido H, Takao T, Murata S, Shimonishi Y, Imanaka T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology* **175**: 6459-6466.

Mota MS, Gomes CB, Souza Júnior IT, Moura AB. 2017. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Brazilian Journal of Microbiology* **48**: 62-70.

Nawaz HH, Nelly Rajaofera MJ, He Q, Anam U, Lin C, Miao W. 2018. Evaluation of antifungal metabolites activity from *Bacillus licheniformis* OE-04 against *Colletotrichum gossypii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **146**: 33-42.

Ndlovu T, Rautenbach M, Vosloo JA, Khan S, Khan W. 2017. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express* **7**: 108.

Purwantara A, McMahon P, Susilo AW, Sukamto S, Mulia S, Nurlaila, Saftar A, Purung Hb, Lambert S, Keane P et al. 2015. Testing local cocoa selections in Sulawesi: (ii) resistance to stem canker and pod rot (black pod) caused by *Phytophthora palmivora*. *Crop Protection* **77**: 18-26.

Rahman KSM, Rahman TJ, Lakshmanaperumalsamy P, Marchant R, Banat IM. 2003. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta Biotechnologica* **23**: 335-345.

Rajaofera MJN, Wang Y, Dahar GY, Jin P, Fan L, Xu L, Liu W, Miao W. 2019. Volatile organic compounds of *Bacillus atrophaeus* HAB-5 inhibit the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **156**: 170-176.

Raymaekers K, Ponet L, Holtappels D, Berckmans B, Cammue BPA. 2020. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biological Control* **144**: 104240.

Rehman HU, Siddique NN, Aman A, Nawaz MA, Baloch AH, Qader SAU. 2015. Morphological and molecular based identification of pectinase producing *Bacillus licheniformis* from rotten vegetable. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **13**: 139-144.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Ron EZ, Rosenberg E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* **3**: 229-236.

Rosales AM, Mew TW. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. *Plant Disease* **81**: 49-52.

Sankaran S, Mishra A, Ehsani R, Davis C. 2010. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture* **72**: 1-13.

Sarwar A, Brader G, Corretto E, Aleti G, Ullah MA, Sessitsch A, Hafeez FY. 2018. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS One* **13**: e0198107.

Savary S, Ficke A, Aubertot J-N, Hollier C. 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* **4**: 519-537.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* **3**: 430-439.

Sen R. 2010. Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **672**: 316-323.

Sharma D, Saharan BS, Chauhan N, Procha S, Lal S. 2015. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *Springerplus* **4**: 4-4.

Sharma R, Singh J, Verma N. 2018. Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **16**: 132-139.

Sharma RR, Singh D, Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* **50**: 205-221.

Sigma-Aldrich. (2017). Product information, surfactin from *Bacillus subtilis*. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/s3523pis.pdf. เข้าถึงเมื่อ August 27, 2020.

Silimela M, Korsten L. 2007. Evaluation of pre-harvest *Bacillus licheniformis* sprays to control mango fruit diseases. *Crop Protection* **26**: 1474-1481.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Singh A, Chaudhary S, Shankar A, Prasad V. 2019. Chapter 5 - Enhanced Resistance to Fungal Pathogens Through Selective Utilization of Useful Microbial Genes. in *NEW and FUTURE DEVELOPMENTS in MICROBIAL BIOTECHNOLOGY and BIOENGINEERING* (eds. HB Singh, VK Gupta, S Jogaiah), pp. 87-93. Elsevier, Amsterdam.

Singh R, Glick B, Rathore D. 2018. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: a review. *Pedosphere* **28**: 170-189.

Steller S, Vollenbroich D, Leenders F, Stein T, Conrad B, Hofemeister J, Jacques P, Thonart P, Vater J. 1999. Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chemistry & Biology* **6**: 31-41.

Sugar D, Spotts RA. 1999. Control of postharvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. *Plant Disease* **83**: 155-158.

Sukkasem P, Kurniawan A, Kao T-C, Chuang H-w. 2018. A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **155**: 541-551.

Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, de Hoog GS, Starink M, Rosete YA, Guarro J, Scott JA. 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology* **68**: 139-162.

Thaniyavarn J, Roongsawang N, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. 2003. Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **67**: 1239-1244.

Torres MJ, Brandan CP, Petroselli G, Erra-Balsells R, Audisio MC. 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.

Vismer HF, Shephard GS, van der Westhuizen L, Mngqawa P, Bushula-Njah V, Leslie JF. 2019. Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology* **296**: 31-36.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Vitullo D, Pietro AD, Romano A, Lanzotti V, Lima G. 2012. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* **61**: 689-699.

Wang N, Sadiq FA, Li S, He G, Yuan L. 2020. Tandem mass tag-based quantitative proteomics reveals the regulators in biofilm formation and biofilm control of *Bacillus licheniformis*. *Food Control* **110**: 107029.

Wang Z, Wang Y, Zheng L, Yang X, Liu H, Guo J. 2014. Isolation and characterization of an antifungal protein from *Bacillus licheniformis* HS10. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **454**: 48-52.

Yuan F, Li K, Zhou C, Zhou H, Liu H, Chai H, Lu F, Zhang H. 2020. Identification of two novel highly inducible promoters from *Bacillus licheniformis* by screening transcriptomic data. *Genomics* **112**: 1866-1871.

Zhang D, Gao T, Li H, Lei B, Zhu B. 2017. Identification of antifungal substances secreted by *Bacillus subtilis* Z-14 that suppress *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biocontrol Science and Technology* **27**: 237-251.

Zhao Q, Mei X, Xu Y. 2016. Isolation and identification of antifungal compounds produced by *Bacillus* Y-IVI for suppressing *Fusarium* wilt of muskmelon. *Plant Protection Science* **52**: 167-175.

Zhao Z, Wang Q, Wang K, Brian K, Liu C, Gu Y. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology* **101**: 292-297.

Zhu X, Wang Z, Sun Y, Gu L, Zhang L, Wang J, Huang Y, Yang Z. 2020. Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of Scenedesmus obliquus and the implications for ecological risk assessment. *Environmental Pollution* **261**: 114131.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสิริตา เสียมไหม
วัน เดือน ปี เกิด	19 ธันวาคม 2535
สถานที่เกิด	จังหวัดตรัง
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2558 เข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2559
ผลงานตีพิมพ์	ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 5th EnvironmentAsia International Conference (EnvironmentAsia 2019) ระหว่างวันที่ 13-15 มิถุนายน 2562 ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง “Potential alternative to conventional fungicides to control fungal phytopathogen by biosurfactant-producing Bacillus licheniformis F2.2”

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University