การใช้สารทุติยภูมิของเชื้อ *Bacillus subtilis* B01 เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้

Application of Secondary Metabolite of *Bacillus subtilis B01* to Inhibit Growth of *Curvularia eragrostidis* Causing Rusty Spot of Orchid

วรรณนิภา มธุรส[1] พัฒน ทวีโภค[2] จุฬาภรณ์ กำเนิดเพชร[3] อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช[4] และ รัตนนุช จันทร์เพ็ญ [5]

Wannipa Maturot[1], Patana Thavipoke[2], Chulaporn Kamnerdpetch[3], Udomsak Lertsuchatavanich[4] and Rattananuch Chunphen[5]

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้สารทุติยภูมิสกัดของ *Bacillus subtilis* B01 ในอาหารเหลว NB PDB และ LB ในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia eragrostidis* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้ คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม และศึกษาระดับความเป็นพิษของสารทุติยภูมิในรูปของค่า MIC และ EC_{50} เปรียบเทียบกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราทางการค้า mancozeb ผลการศึกษาพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 100 มก/มล สารทุติยภูมิของเชื้อ *B. subtilis* B01 ซึ่งเลี้ยงในอาหารชนิด NB และ PDB มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* สูงถึง ร้อยละ 88 และ 86 ตามลำดับ ในขณะที่สารทุติยภูมิสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิด LB ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพียงร้อยละ 14 ค่า MIC และ EC_{50} ของสารทุติยภูมของเชื้อ *B. subtilis* B01 ในอาหารชนิด NB ซึ่งแสดงผลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด มีค่า MIC และ EC_{50} เท่ากับ 0.40 และ 18.9 มก/มล ตามลำดับ แม้ว่าข้อมูลที่ตรวจพบ แสดงถึงแนวโน้มว่าสารที่ผลิตได้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* ต่ำกว่าสารเคมีทางการค้าต้านเชื้อราชนิด mancozeb ที่มีค่า MIC และ EC_{50} เท่ากับ 0.01 และ 0.58 มก/มล ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการใช้สารทุติยภูมิสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* B01 เพื่อต้านการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* ก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราและสนับสนุนให้มีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น

ABSTRACT

The main purpose of this study was to examine antifungal properties of secondary metabolite extracted from cultures of *Bacillus subtilis* B01 in NB, PDB and LB media against growth of *Curvularia eragrostidis* causing orchid rusty spot. Culture media suitable for secondary metabolite production toxicity level in terms of MIC and EC_{50} were determined and compared to a commercial fungicide, mancozeb. The results revealed that at the concentration of 100 mg/l, secondary metabolite extracted from cell free cultures of *B. subtilis* B01 in NB and PDB showed the great inhibition effects against growth of *C. eragrostidis*, which were 88% and 86%, respectively, while that in LB showed only 14% growth suppression. The MIC and EC_{50} of the secondary metabolite extracted from cultures in NB, indicated maximum antifungal effects, were 0.40 และ 18.9 mg/ml, respectively. The metabolites showed lower effect than mancozeb indicating the MIC and EC_{50} of 0.01 และ 0.58 mg/ml, respectively. However, application of the secondary metabolite against

[1] คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

[1] Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170

growth *C. eragrostidis* could be an alternative to reduce conventional chemical fungicide use. Therefore, extensive application of the prepared biofungicide should be encouraged.

Key Words : secondary metabolite / *Curvularia eragrostidis*

e-mail address: mwannipa@hotmail.com

คำนำ

Curvularia eragrostidis เป็นเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิม (Flower rusty spot) ในดอกกล้วยไม้ ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูกกล้วยไม้เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมส่งออกกล้วยไม้ตัดดอก เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวเจริญได้ดีในเนื้อเยื่อของดอกกล้วยไม้ในสภาวะที่มีความชื้นสูงของโรงเรือน อาการของโรคส่วนใหญ่จะสังเกตเห็นได้ชัดในระหว่างการขนส่ง (อารีรัตน์, 2550) ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันปัญหาดังกล่าว เกษตรกรจึงมีความจำเป็นต้องใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดเชื้อรา เนื่องจากความสะดวกในการใช้ และประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อราก่อโรคได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อใช้ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานาน อาจส่งผลทำให้เกิดการต้านทานสารเคมีของเชื้อสาเหตุโรค ทำให้การป้องกันกำจัดโรคไม่ได้ผล เกษตรกรจึงต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่มากขึ้นเรื่อยๆ นอกจากนี้สารเคมีที่ถูกชะล้างออกไปสามารถสะสมและแพร่กระจายได้ในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพของมนุษย์ (De Waard, 1993)

เพื่อลดปัญหาดังกล่าว การใช้สารทุติยภูมิสกัดจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรสามารถเลือกใช้ ซึ่งในปัจจุบันวิธีการนี้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะ สารทุติยภูมิของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่มไลโพเปปไทด์ เช่น surfactin (Besson,1978) iturin (Bechard, 1998) และ fengycin (Chan et al., 2009) โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อราหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Curvularia gudauskasii* (Raton, 2011) *Rhizoctonia solani* (Elkahoui, 2012) และ *Colletotrichum gloeosporioides* (Ruangwong, 2012).

ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพและระดับความเป็นพิษของสารทุติยภูมิ ที่ได้จากการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* B01 ในอาหารสามชนิด ได้แก่ Nutrient Broth (NB) Potato Dextrose Broth (PDB) และ Luria Bertani (LB) เพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการกำจัดเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ทดแทนการใช้สารเคมี และยังช่วยลดปัญหาเรื่องสารพิษตกค้างและมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อ (inoculum) โดยเลี้ยง *B. subtilis* B01 (ห้องปฏิบัติการ)บนอาหารแข็งชนิด Nutrient Agar (NA) เป็น เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป (loop) ลงในอาหารเหลว NB 50 มล บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การเตรียมตัวอย่างเชื้อรา

ทำการเจาะตัวอย่างเชื้อรา *C. eragrostidis* (แยกจากกล้วยไม้หวายแวนด้า) บนอาหาร PDA อายุ 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม เจาะบริเวณขอบโคโลนีแล้ววางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

การเตรียมสารทุติยภูมิสกัดจากเชื้อ *Bacillus subtilis* B01

ทำการถ่ายกล้าเชื้อ *B. subtilis* B01 ลงในอาหารเหลว 3 ชนิด ได้แก่ NB PDB และ LB เขย่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 วัน จากนั้นสกัดสารทุติยภูมิที่เชื้อ *B. subtilis* B01 สร้างโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอกริก ตามวิธีของ Mckeen *et al.,* (1986)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*

นำสารทุติยภูมิที่ได้จากการสกัดจากอาหาร NB PDB และ LB มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. eragrostidis* โดยวิธี paper disc method ทำการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ ต่อ ชนิด อาหาร โดยหยดสารทุติยภูมิที่มีความเข้มข้น 100 มก/มล ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง Whatman No.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม นำกระดาษกรองที่หยดสารทุติยภูมิแล้วมาวางลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA นำชิ้นเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม ที่เจาะจากบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. eragrostidis* ที่มีอายุ 5 วัน วางทับลงบนกระดาษกรอง นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของ เชื้อรา เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 แทนที่สารทุติยภูมิ โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราใน 2 แนวตั้งฉากกัน และคำนวณหาค่าระดับการยับยั้ง (ร้อยละ) จากสมการที่ 1 (Gamliel et al., 1989) เพื่อคัดเลือกชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* B01 ที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* สูงสุด สำหรับนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

$$\text{ระดับการยับยั้ง (ร้อยละ)} = 100 - [R^2 / r^2 \times 100] \qquad \text{สมการที่ 1}$$

เมื่อ R = รัศมีเฉลี่ยของเชื้อราที่เจริญบนชุดทดสอบ

r = รัศมีเฉลี่ยของเชื้อราที่เจริญบนชุดควบคุม

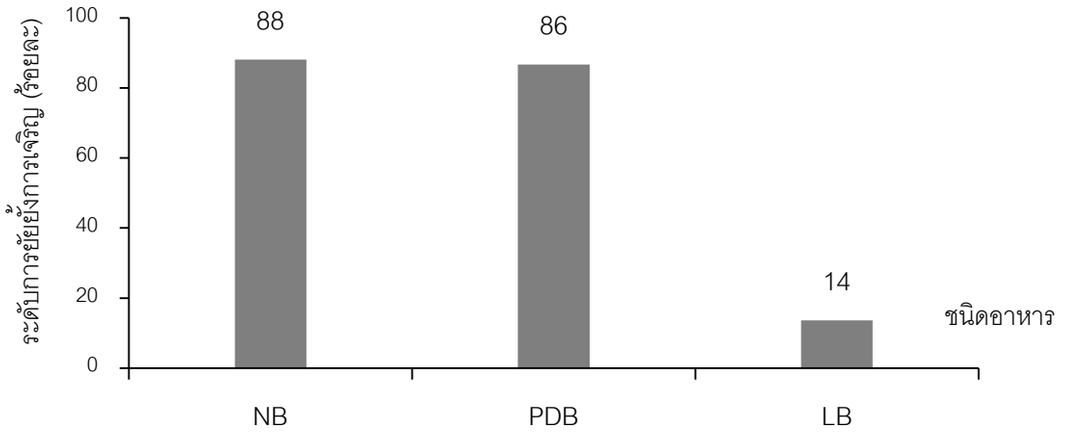
การศึกษาระดับความเป็นพิษของสารทุติยภูมิและสารเคมีกำจัดเชื้อราชนิด mancozeb

ทำการเจือจางสารทุติยภูมิที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย และสารเคมีกำจัดเชื้อราชนิด mancozeb โดยใช้หลักการเจือจางแบบลำดับขั้น จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* บันทึกการเจริญเติบโตของเชื้อรา เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา ในแนวตั้งฉากกัน คำนวณหาค่าระดับการยับยั้ง (ร้อยละ) จากสมการที่ 1 แล้วคำนวณหาค่า MIC และ EC_{50} ด้วยวิธี Probit analysis โดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS 11.5

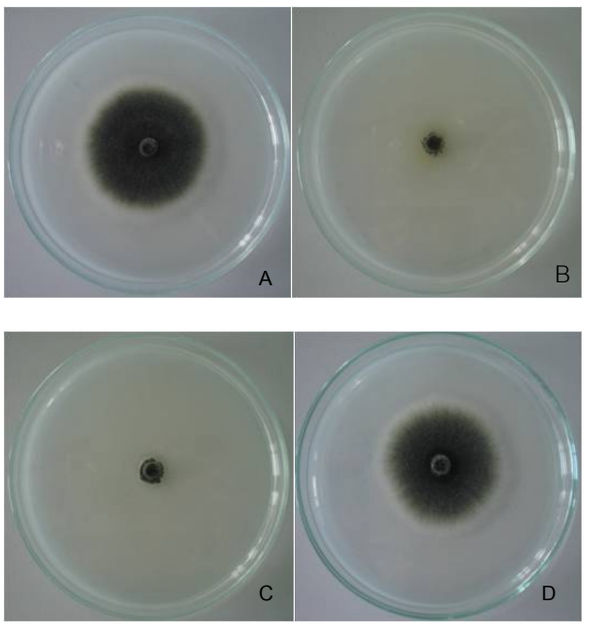
ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*

จากการศึกษาพบว่าสารทุติยภูมิสกัดของแบคทีเรีย *B. subtilis* B01 ที่สกัดจากอาหารเหลวเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด NB PDB และ LB สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้แตกต่างกัน โดยพบว่า สารทุติยภูมิสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรีย *B. subtilis* B01 ในอาหารชนิด NB และ PDB มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงถึง ร้อยละ 88 และ 86 ตามลำดับ ในขณะที่สารทุติยภูมิสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิด LB ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพียง ร้อยละ 14 ดังแสดงผลในภาพที่ 1 และ 2



ภาพที่ 1 ผลของสารทุติยภูมิ ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สกัดจากอาหาร NB PDB และ LB ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* (n=3)



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *C. eragrostidis* บนอาหารชนิดต่างๆที่มีสารทุติยภูมิของเชื้อ *B. subtilis* B01 ที่สกัดจากอาหารเหลวชนิดต่างๆ ;

A: ชุดควบคุม B: อาหาร NB C: อาหาร PDB และD: อาหาร LB

ผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อชนิดและคุณสมบัติของสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Akpa *et al.,* 2001; Elkahoui *et al.,* 2012) โดยองค์ประกอบสำคัญของอาหารที่แบคทีเรียใช้ในการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (carbon source) แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) โลหะหนักที่ต้องการในปริมาณต่ำ (trace element) (Al-Ajlani *et al.,* 2007; Ghribi and Ellouze-Chaabouni, 2011) จากการศึกษา พบว่า อาหารชนิด LB มีองค์ประกอบของอาหารที่ ไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* ในขณะที่สารทุติยภูมิที่แบคทีเรีย *B. subtilis* B01 ผลิตขึ้นจากการเลี้ยงในอาหารชนิด NB และ PDB มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* ในระดับสูงใกล้เคียงกัน (ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ) แต่เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองมีองค์ประกอบที่เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารทุติยภูมิที่ผลิตโดยการเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นชนิดที่แตกต่างกัน จากผลศึกษาวิจัยที่เกี่ยวกับสารทุติยภูมิผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ผ่านมา พบว่า สารทุติยภูมิส่วนใหญ่ที่แบคทีเรียผลิต เป็นสารในกลุ่มประเภทไลโพเปปไทด์ (Asaka and Shoda, 1996) ซึ่งมีชนิดและการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราต่างๆกัน เช่น สารในกลุ่ม Iturin ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Klich *et al.,* 1991) โดยมีผลทำให้เกิดการรั่วของโพแทสเซียมไอออนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค ส่งผลต่อการงอกหรือการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (Han *et al*., 2005) ส่วนสารในกลุ่ม surfactin เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ (Maget-Dana *et al.,* 1992) ซึ่งสารทุติยภูมิสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารทั้งสองชนิดจะจัดอยู่ในกลุ่มของสารชนิดใดนั้นจำเป็นต้องใช้กระบวนการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

ตารางที่ 1 ชนิดและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	องค์ประกอบ		
	แหล่งไนโตรเจน	แหล่งคาร์บอน	อื่นๆ
Nutrient Broth (NB)	Beef extract, peptone	-	-
Potato Dextrose Broth (PDB)	-	Potato infusion, Dextrose	-
Luria Bertani (LB)	Bacto-yeast extract, Bacto-tryptone,	-	Sodium chloride

ที่มา: Difco

การศึกษาระดับความเป็นพิษของสารทุติยภูมิและสารเคมีกำจัดเชื้อราชนิด Mancozab

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิ ที่ผลิตโดย *B. subtilis* B01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NB กับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb ต่อการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* โดยทำการเปรียบเทียบค่าระดับความเป็นพิษในรูปของค่า MIC และ EC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อราร้อยละ 50 ผลการศึกษาพบว่า สารทุติยภูมิ ที่ผลิตโดย *B. subtilis* B01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NB มีค่า MIC และค่า EC_{50} เท่ากับ 0.40 และ 18.90 มก/มล และสารกำจัดเชื้อรา mancozeb มีค่า MIC และค่า EC_{50} เท่ากับ 0.01 และ 0.58 มก/มล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งความเป็นพิษของสารจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่า MIC และค่า EC_{50} (มลิวรรณ, 2552) จากผลจากศึกษาจึงเห็นได้ว่าสารทุติยภูมิ มีค่าความเป็นพิษต่อเชื้อรา *C. eragrostidis* ต่ำกว่าสารเคมี mancozeb แสดงให้เห็นว่าหากมีการนำสารดังกล่าวไปใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา จำเป็นที่ต้องใช้ในระดับความเข้มข้นของสารที่สูงกว่าการใช้สารเคมี mancozeb แต่เนื่องจากสารทุติยภูมิ จัดเป็นสารชีวภาพ ดังนั้นผลกระทบในด้านการตกค้างในสิ่งแวดล้อม และความเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้ จึงน้อยกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์ (Matar et al., 2009) ดังนั้นการนำสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *B. subtilis* B01ไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคดอกจุดสนิม จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้

ตารางที่ 2 ค่า MIC and EC_{50} ของสารทุติยภูมิ ที่ผลิตโดย *B. subtilis* B01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NB ต่อการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* เปรียบเทียบกับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb

ชนิดสาร	MIC		EC_{50}	
	MIC (mg/ml)	95% confidence	EC_{50} (mg/ml)	95% confidence
สารทุติยภูมิ	0.40	0.23 - 0.62	18.90	16.09 – 22.67
mancozeb	0.01	0.01 - 0.02	0.58	0.45 - 0.79

สรุป

สารทุติยภูมิของ แบคทีเรีย *B. subtilis* 01 ในอาหารชนิด NB มีประสิทธิภาพ การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* ร้อยละ 88 ซึ่งมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารทุติยภูมิสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* 01 ในอาหารชนิด PDB และ LB ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) และค่า EC_{50} ของสารทุติยภูมิ ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* B01 ในอาหารชนิด NB เท่ากับ 0.40 และ 18.90 มก/มล ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความเป็นพิษต่ำกว่าสาร mancozeb ซึ่งมีค่า MIC และค่า EC_{50} เท่ากับ 0.01 และ 0.58 มก/มล ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติที่สนับสนุนทุนในการวิจัย และขอขอบคุณ รศ.ดร. นิพนธ์ ทวีชัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*

เอกสารอ้างอิง

มลิวรรณ บุญเสนอ. 2552. **นิเวศพิษวิทยา**. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทน์. นครปฐม.

อารีรัตน์ เทียนขาว. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Akpa, E., P. Jacques, B. Wathelet, M. Paquot, R. Fucks, H. Budzikiewcz and P. Thonart. 2001. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry Biotechnology** 91: 551-561.

Al-Ajlani, M. M., M. A. Sheikh, Z. Ahmad and S. Hasnain. 2007. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. **Microbial Cell Factories** 6 (7): 1-8.

Asaka, O.and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off tomato with *Bacillus subtilis* RB 14. **Applied and Environmental Microbiology** 62 (11); 4081-4085.

Bechard, J., K. C. Eastwell, P. L. Sholberg, G. Mazza and B. Skura. 1998. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produce by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of . Agricultural and Food Chemistry** 46: 5355-5361.

Besson, F., F. Peypoux, G. Michel and L. Delcambe. 1978. Identificatition of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. **The Journal of Antibiotics** 4: 284-288.

Chan, Y, K., M, E. Savard, L, M. Reid, T. Cyr. W. A. McCormick and C. Seguin (2009). Identification of lipoeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. **BioControl** 54: 567-574.

De Waard, M. A. 1993. Chemical control of plant diseases: problems and prospects. **Annu. Rev. Phylopathol** 31: 403-421.

Elkahoui, S., N. Djebali, O. Tabbene, A. Hadjbrahim, B. Mnasri, R . Mhamdi, M. Shaaban and F. Limam. 2012. Evaluation of antifungal activity from *Bacillus strains* against *Rhizoctonia solani*. **African Journal of Biotechnology** 11 (18): 4196-4201.

Gamliel, A., J. Kantan and E. Cohon. 1989. Toxcity of choronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as realted to their structure. **Phytopasrasitica** 17: 101-106.

Ghribi, D. and S. Ellouze-Chaabouni. 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. **Biotechnology Research International**, 6 pp.

Klich, M, A., A.R. Lax and J.M. Bland, 1991. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. **Mycopathologia** 116: 77-80.

Maget-Dana, R., L. Thimon. F. Peypoux and M. Ptak. 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie** 74: 1047-1051.

Martar, S. M., S. A. Kazzaz, E. E. Wagih, A. I. El-Diwany, H. E. Moustafa, G. A. Abo-Zaid, H. E. Abd-Elsalam and E. E. Hafez. 2009. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi I. **Biotechnology** 8(1): 53-61.

Mckeen, C.D., C.C. Reilly and P.L. Pusey. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. **Ecology and Epidermiology** 76: 136-139.

Raton, T.O., Z. G. Giro, M. S. Diaz and S. R. Perez. 2011. *In vitro* growth inhibition of *Curvularia gudauskasii* by *Bacillus subtilis*. **Annals of Microbiology** 62: 545-551.

Ruangwong, O-U., C-I.Chang, S. A. Lamine and W-J. Liang. 2012. Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control antracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides.* **African Journal of Microbiology Research** 6 (16): 3732-3738.