ศักยภาพของเชื้อ *BACILLUS* SPP. คัดแยกจากดินนา เพื่อควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาล *BIPOLARIS* SPP. ในข้าว

POTENTIAL OF *BACILLUS* SPP. ISOLATED FROM PADDY SOIL FOR CONTROLING BROWN SPOT DISEASE, *BIPOLARIS* SPP., IN RICE

อารยา บุญศักดิ์[1]* สุดารัตน์ สุตพันธ์[1] วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ[2] และคณิตา เกิดสุข[3]
Araya Bunsak[1]* Sudarat Sutaphan[1], Weerathep Pongprasert[2] and Kanita Kertsuk[3]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มุ่งศึกษาศักยภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่คัดแยกจากตัวอย่างดินนาเก็บรวบรวมจากพื้นที่ตำบลพรหมพิราม และตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก โดยวิธี soil dilution plate technique ในการควบคุมเชื้อรา *Bipolaris* spp. สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว ผลการคัดแยกเชื้อจากดินพบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท คือ BP01 และ BP02 จากตำบลพรหมพิราม และ BC01 และ BC02 จากตำบลท่าช้าง โดยทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Bipolaris* spp. ได้ ร้อยละ 78.69, 78.87, 75.19 และ 81.81 ตามลำดับ ในระดับที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้ หลังการบ่มเชื้อ ที่ 14 วัน พบว่า BC02 มีขนาดของแนวยับยั้งกว้างที่สุด 3.39 เซนติเมตร รองลงมาคือ BP02, BP01 และ BC01 มีขนาด 2.34, 2.22 และ 1.64 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$)

คำสำคัญ: เชื้อแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส เชื้อราสกุลไบโพลาริส โรคใบจุดสีน้ำตาล การควบคุมโดยชีววิธี

[1]คณะเทคโนโลยีอาหารและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
[1]Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Muang District, Phitsanulok Province 65000
[2]คณะเกษตรทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
[2]Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Muang District, Phitsanulok Province 65000
[3]ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก 65130
[3]Phitsanulok Rice Research Center, Wang Thong District, Phitsanulok Province 65130
*corresponding author e-mail: arayab@psru.ac.th
Received: 16 February 2021; Revised: 3 July 2021; Accepted: 6 July 2021

Abstract

The objective of this research was to study the potential of *Bacillus* sp. isolated by soil dilution plate technique from paddy soil samples collected from Phromphiram and Thachang Sub-districts Phromphiram District, Phitsanulok Province to control brown spot disease (*Bipolaris* sp) in rice. The result revealed that the total of 4 *Bacillus* spp. isolates composed of BP01 and BP02 from Phromphiram Sub-district and BC01 and BC02 from Thachang Sub-district were found. The similar potential efficiency ($p>0.05$) to control *Bipolaris* spp of all isolates was detected at the rate of 78.69, 78.87, 75.19 and 81.81%, respectively. However, the significant differences ($p<.05$) among the size of clear zone from those isolated was found. The widest clear zone was found from BC02 (3.39 cm.) followed by BP02 (2.34 cm), BP01 (2.22 CM.) and BC01 (1.64 cm.) after incubation for 14 days.

Keywords: *Bacillus* spp., *Bipolaris* spp., Brown spot disease, Biological control

บทนำ

ข้าวเป็นพืชที่ปลูกเพื่อบริโภคกันในทุกภาคของประเทศไทย มีประโยชน์และมีคุณค่าต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์อย่างมากตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ในปัจจุบันผลผลิตข้าวในประเทศไทยได้รับผลกระทบจากการเกิดโรคหลายชนิด โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น ซึ่งเหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคขอบใบแห้ง และโรคใบสีส้ม เป็นต้น ซึ่งโรคดังกล่าวเป็นโรคที่พบได้บ่อยครั้งในการผลิตข้าว โดยเฉพาะโรคใบจุดสีน้ำตาลเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งที่ก่อโรคกับข้าว สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Bipolaris* spp. (Rice Department, 2013) ส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าว ทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของเมล็ดข้าว เนื่องจากเชื้อสาเหตุสามารถทำลายทุกส่วนของต้นข้าว ตั้งแต่ กาบใบ ใบ รวง รวมทั้งเมล็ดข้าว และการเข้าทำลายสามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง เกษตรกรจึงนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด เช่น iprodione, propiconazole, azoxystrobin, trifloxystrobin, dithane and carbendazim (Ahmed et al., 2002; Gupta et al., 2013) เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีนั้นมักก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในดิน สภาพแวดล้อม เป็นอันตรายต่อเกษตรกร และผู้บริโภค

ดังนั้นการเลือกใช้จุลินทรีย์ปรปักษ์จากธรรมชาติ ทดแทนสารเคมี เพื่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวจึงเป็นทางเลือกที่สำคัญ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการควบคุมได้ดี มีความปลอดภัย ต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญคือ เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียประเภท aerobic bacteria พบได้ทั่วไปในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ (Baker & Cook, 1974)

สามารถสร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ซึ่งมีกลไกที่ทำให้เชื้อสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนความร้อนสูง 30 ถึง 45°C ทนต่อแสงอุลตร้าไวโอเลต และสภาวะกดดันในรูปแบบต่าง ๆ ได้ดี (Calvo & Zúñiga, 2010; Layton et al., 2011; Tejera-Hernández et al., 2011) บทบาทสำคัญของเชื้อสกุล *Bacillus* คือสามารถสร้างสารเมตาโบไลต์ชนิดต่าง ๆ มากมาย ซึ่งมีส่วนสัมพันธ์กับการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคกับพืช (Tejera-Hernández et al., 2011) จึงทำให้มีการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. ชนิดต่าง ๆ จากธรรมชาติเพิ่มขึ้นมากมายและต่อเนื่อง โดยส่วนหนึ่งของการค้นพบนั้นมีเป้าหมายสำคัญคือการพัฒนาเชื้อให้เป็นชีวภัณฑ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ (Zuber et al., 1993)

การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินนา พื้นที่ตำบลพรหมพิราม และตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นพื้นที่นาที่มีลักษณะเป็นที่ราบลุ่ม มีการทำนาอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี และมักประสบปัญหาการระบาดของโรคใบจุดสีน้ำตาลที่มีสาเหตุเชื้อรา *Bipolaris* spp. อยู่เนือง ๆ เป็นประจำ และโดยหลักการของ host-pray interaction relationship (Rauch & Bar-Yam, 2006) พื้นที่ดังกล่าวจึงเป็นพื้นที่มีโอกาสสูงมากในการค้นหาเชื้อแบคทีเรียปรปักษ์ *Bacillus* spp. ที่ควบคุมเชื้อรา *Bipolaris* spp. ตามธรรมชาติ (naturally occurring biological control organisms) ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยเพื่อค้นหาเชื้อแบคทีเรียปรปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Bipolaris* spp. สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าวขึ้น เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกรในการใช้ควบคุมเชื้อราใบจุดสีน้ำตาลในข้าว ลดการใช้สารเคมี และเป็นแนวทางในการทำการเกษตรแบบยั่งยืนต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินนา และแยกเชื้อรา *Bipolaris* spp. จากใบข้าว

1.1 เก็บตัวอย่างดินนาในเขตตำบลพรหมพิราม และตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก ในระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 30 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 โดยสุ่มตัวอย่างดินตามแนวเส้นทแยงมุมของแปลงนาซึ่งอยู่ระหว่างการทำนา โดยข้าวที่ปลูกอยู่ในช่วงระยะการแตกกอหรือออกรวง เก็บตัวอย่างดินพื้นที่ละ 25 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเก็บจากบริเวนผิวหน้าดิน ตัวอย่างละ 100 กรัม ร่อนวัสดุเจือปน เช่น เศษฟางข้าว เศษใบไม้ ฯลฯ ออก บันทึก วัน เดือน ปี และพิกัด ที่เก็บตัวอย่าง นำกลับห้องปฏิบัติการ

1.2 แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินนา โดยวิธี soil dilution plate technique โดยดัดแปลงจาก (Samson et al., 1998) ชั่งดินตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (flask shaped) ที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 30 นาที ดูดสารแขวนลอยดิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด ทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเจือจางจนถึง 6 เท่า นำสารแขวนลอยดินความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar: NA

และทำการ spread plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 วัน คัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น สี ความวาว รูปร่าง ขอบของโคโลนี และลักษณะของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40x ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี streak plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA กำหนดรหัสของเชื้อตามแหล่งที่พบ หมายเลขโคโลนี และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป (Samson et al., 1988)

1.3 แยกเชื้อรา *Bipolaris* spp. จากใบข้าวจากแปลงนาที่เก็บตัวอย่างดิน โดยตัดใบข้าวส่วนที่เป็นแผลจากเชื้อรา *Bipolaris* spp. ซึ่งมีสีน้ำตาล ลักษณะเป็นวงกลมหรือรูปไข่ ขนาด 1x1 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แช่ในสารละลาย Sodium Hypochlorite 10% เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับให้แห้งในกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางคว่ำลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar: PDA จำนวน 5 ชิ้นต่อจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้อง (28±2°C) เป็นเวลา 7 วัน คัดแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี streak plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

2. การทดสอบศักยภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris* spp.

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และเชื้อรา *Bipolaris* spp. โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากข้อที่ 1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ภายใต้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเลี้ยงเชื้อรา *Bipolaris* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธีการ simple streak plate เลี้ยงเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ทดสอบศักยภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากดินนา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris* spp. โดยวิธี dual culture technique วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ทำ 5 ซ้ำ โดยแบ่งส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็น 2 ส่วนตามเส้นผ่าศูนย์กลาง ส่วนที่หนึ่ง ใช้เข็มเขี่ยปลายลูปแตะเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เพาะเลี้ยงข้างต้น ขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเส้นตรง มีระยะห่างจากขอบจาน และเส้นกึ่งกลางจาน เพาะเชื้อด้านละ 2 เซนติเมตร ส่วนที่สอง ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อรา *Bipolaris* spp. และวางลงบน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในส่วนนี้ ให้มีระยะห่างจากขอบจาน และเส้นกึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อด้านละ 2 เซนติเมตรเช่นกัน และทำการเจาะเส้นใยของเชื้อรา *Bipolaris* spp. วางบนจานเพาะเชื้อ PDA ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อเป็นสิ่งเปรียบเทียบ

บันทึกข้อมูล ขนาดของรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Bipolaris* spp. ทุกวัน เพื่อประเมินร้อยละในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้สูตร percent inhibition of radial growth (PIRG) (Kabir et al., 2012)

$$PIRG = [(R_C-R_B)/R_C]x100$$

R_C คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีเชื้อรา *Bipolaris* spp. ในจานเพาะเชื้อที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

R_B คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีเชื้อรา *Bipolaris* spp. ในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

โดยมีระดับความรุนแรงของเชื้อ ดังนี้

4 = > 75 PIRG (Very high antagonistic activity)

3 = 61-75 PIRG (High antagonistic activity)

2 = 51-60 PIRG (Moderate antagonistic activity)

1 = < 50 PIRG (Low antagonistic activity)

บันทึกการเกิดแนวยับยั้ง (clear zone or inhibition zone) โดยวัดขนาดเฉลี่ยจากระยะบริเวณส่วนใส ระหว่างเชื้อทั้ง 2 ชนิด จำนวน 3 ช่วง คือ ช่วงเริ่มการเกิดแนวยับยั้งทั้ง 2 ด้าน และบริเวณตรงกลางช่วงที่เกิดแนวยับยั้ง

การวิเคราะห์ข้อมูล โดยวิเคราะห์อัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris* spp. ด้วย analysis of variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จากดินนา

ผลการแยกเชื้อจากตัวอย่างดิน 2 พื้นที่ ได้แก่ ดินนาตำบลพรหมพิรามและตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก พื้นที่ละ 25 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง และทำโดยวิธี soil dilution plate technique พบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งมีโคโลนีสีขาวขุ่น บริเวณขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย รูปร่างเซลล์เป็นแท่งตรง สีใส และให้ผลการทดสอบปฏิกิริยาแกรมเป็นบวก ดังภาพที่ 1 (Figure 1) จำนวน 4 ไอโซเลท โดย 2 ไอโซเลท คือ BP01 และ BP02 ได้จากดินนาตำบลพรหมพิราม ซึ่งมีลักษณะเป็นดินเหนียวสีดำ และอีก 2 ไอโซเลท ได้จากดินนาตำบลท่าช้าง มีลักษณะเป็นดินเหนียวปนทรายสีน้ำตาล คือ BC01 และ BC02 ดังตารางที่ 1 (Table 1)

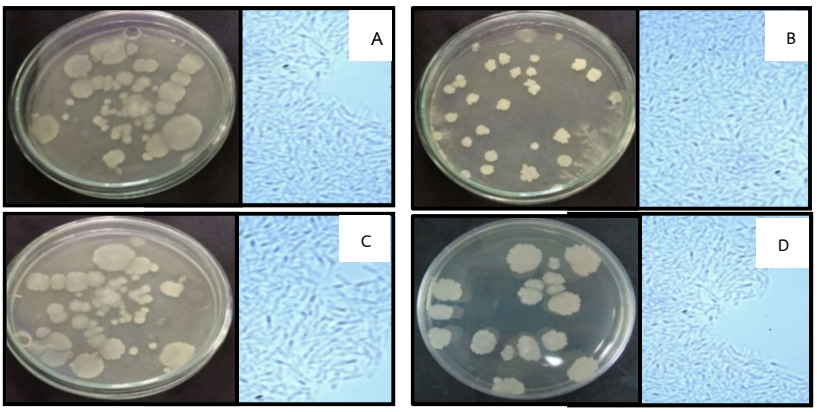

Figure 1 Colony and cell morphology of 4 isolates of *Bacillus* spp. screened from the paddy soils grown on NA culture (A) BP01 (B) BP02 (C) BC01 and (D) BC02

Table 1 Numbers and codes of *Bacillus* spp. isolated from soil samples, soil characteristics, soil color, GPS position of collection sites in Phromphiram District, Phitsanulok Province

Number	Code	Soil characteristics	Soil color	Soil Group	Sub-district	GPS
1	BP01	clay	black	Na	Phromphiram	17°00'54"N 100°09'02"E
2	BP02	clay	black	Na	Phromphiram	17°01'00"N 100°08'40"E
3	BC01	sandy clay	brown	Na	Thachang	16°57'53"N 100°08'54"E
4	BC02	sandy clay	brown	Na	Thachang	16°58'40"N 100°09'36"E

2. ผลการศึกษาศักยภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากดินนาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris* spp.

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลท มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Bipolaris* spp. ได้ ในระดับ 4 เท่ากัน และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<.05) โดยไอโซเลท BC02 มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris* spp. ได้สูงที่สุด เฉลี่ยร้อยละ 81.81 รองลงมา คือ BP02, BP01 และ BC01 มีอัตราการยับยั้งร้อยละ 78.87, 78.69 และ 75.19 ตามลำดับ หลังการทดสอบบ่มเชื้อนาน 14 วัน ดังตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 The average of percentage of inhibition ability of 4 *Bacillus* spp. isolates on *Bipolaris* spp. at 4-14 days after contaction

Bacillus sp. isolates	%PIDG ($\bar{x}$±SD) / days					
	4	6	8	10	12	14
BP01	6.51±2.78	16.48±2.94	30.31±4.74	49.03±1.32	67.41±7.67	78.69±6.78
BP02	6.80±3.81	14.01±2.45	22.84±2.15	41.82±3.68	59.35±4.27	78.87±3.04
BC01	5.14±2.45	16.15±2.59	23.94±4.54	42.02±8.08	63.45±4.90	75.19±7.50
BC02	1.78±0.46	12.70±2.60	25.44±7.06	45.02±5.70	60.75±2.52	81.81±3.47
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. %	32.16	17.85	19.27	11.96	8.26	7.07

Remark $^{a-b}$Means within a column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

เมื่อทำการวัดการเกิดแนวยับยั้ง ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยวัดบริเวณส่วนใส วันที่ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 หลังการบ่มเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถสร้างแนวยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris* spp. ได้ โดยเริ่มพบแนวยับยั้งในวันที่ 4 และขยายเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องภายในระยะเวลา 14 วัน หลังการทดสอบบ่มเชื้อ โดยไอโซเลท (D) BC02 สร้างแนวยับยั้งระยะกว้างที่สุด

คือ 3.39 เซนติเมตร แตกต่างจากไอโซเลท (B) BP02, (A) BP01 และ (C) BC01 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05) ซึ่งระยะกว้าง 2.34, 2.22 และ 1.64 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 2 (Table 3 and Figure 2)

Table 3 The average distance of inhibition zone from 4 *Bacillus* spp. isolates on the mycelial growth area of *Bipolaris* spp. during 4-14 days of incubation

Bacillus spp. isolates	Inhibition zone distance (cm) ($\bar{x}$±SD)/days					
	4	6	8	10	12	14
BP01	1.26b ± 0.42	1.51b ± 0.34	1.75b ± 0.37	1.99b ± 0.37	2.11b ± 0.36	2.22b ± 0.35
BP02	1.36ab ± 0.45	1.57b ± 0.49	1.79b ± 0.58	2.07b ± 0.41	2.20b ± 0.42	2.34b ± 0.33
BC01	0.73b ± 0.17	1.07b ± 0.21	1.22b ± 0.30	1.40b ± 0.35	1.53b ± 0.39	1.64b ± 0.44
BC02	1.91a ± 0.48	2.54a ± 0.60	2.96a ± 0.70	3.12a ± 0.78	3.30a ± 0.75	3.39a ± 0.69
F-test	*	*	*	*	*	*
C.V. %	**30.36**	**25.99**	**26.70**	**23.59**	**22.08**	**19.83**

Remark $^{a-b}$Means within a column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

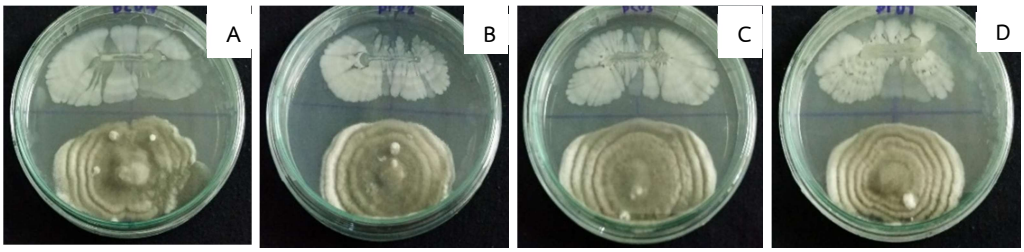

Figure 2 In vitro antifungal signs (inhibition zone) of antagonistic bacteria *Bacillus* spp. against *Bipolaris* spp. on PDA at 14 days after inoculation in dual culture. (A) BP01 (B) BP02 (C) BC01 and (D) BC02

อภิปรายผล

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถเจริญเติบโตได้ในหลายสภาพแวดล้อมทั้งในดิน อินทรีย์วัตถุ เศษซากใบพืช (Czaczyk et al., 2000; FÖldes et al., 2000; Intana et al., 2010) การค้นหาเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินชนิดต่าง ๆ และแหล่งของดินที่หลากหลายทั้งในสภาพป่า และพื้นที่เพาะปลูก รวมทั้งบริเวณรอบรากพืช จึงเป็นแนวทางสำคัญที่ใช้โดยทั่วไป ซึ่งทำให้ค้นพบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ชนิดต่าง ๆ มากมายในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา (Vargas-Ayala et al., 2000; McSpadden, 2004; Usuwan, 2007; Prasanna Kumar, 2017) เช่น Sha et al., (2020) คัดแยกเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินนาได้มากถึง 232 ไอโซเลท เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้แหล่งเก็บตัวอย่างดินเป็น

พื้นที่ดินนา 2 แหล่ง คือเขตตำบลพรหมพิราม และตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งทั้ง 2 พื้นที่มีระยะห่างกัน 10 กิโลเมตร และแม้ว่าดินจากทั้งสองพื้นที่มีลักษณะโครงสร้างของเนื้อดินและสีของดินแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยดินจากตำบลพรหมพิรามเป็นดินเหนียวสีดำในขณะที่ดินจากตำบลท่าช้างเป็นดินเหนียวปนทรายมีสีน้ำตาล แต่ถูกจัดไว้เป็นชุดดินเดียวกัน คือ ชุดดินน่าน ซึ่งเกิดจากการทับถมของตะกอนน้ำ มีความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5-8.0 มีการระบายน้ำบนผิวดินเกิดขึ้นอย่างช้ามาก จึงเหมาะกับการเป็นพื้นที่ทำนามาก (Land Development Department, 2021) อย่างไรก็ตาม การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยอาหาร NA พบเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายเพียง 4 ไอโซเลต เท่านั้น โดยทุกไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกันมาก คือ มีสีขาวขุ่น โคโลนีมีขนาดใหญ่ รูปร่างแบนแห้ง และขอบของโคโลนีมีลักษณะเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย และเปลี่ยนแปลงไปตามอายุของโคโลนี สอดคล้องกับ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารแข็ง NA และงานวิจัยของ Kittikanokrat (2003) ที่รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีโคโลนีขนาดใหญ่ มีผิวลักษณะแบน แห้ง และอาจเปลี่ยนแปลงไปตามอายุได้

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลากหลายชนิดเช่น Usuwan (2010) พบเชื้อ *Bacillus* spp. คัดแยกได้จากดินแปลงปลูกองุ่นจำนวน 61 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfs*i ได้ดี และผลการศึกษาของ Muenkun, (2004) ที่พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 69 ไอโซเลท ที่แยกเชื้อได้จากธรรมชาติ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *Fusarium oxysporum* เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นต้น

ในการศึกษานี้ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลทที่พบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Bipolaris* spp. ได้ดี ในช่วงร้อยละ 75.79-81.81 ซึ่งค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับรายงานผลการศึกษาของ Chiangsin et al. (2018) ที่คัดแยกเชื้อแบคทีเรีย 20 ไอโซเลท จากผิวเมล็ดข้าว แต่มีเชื้อแบคทีเรียเพียง 4 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris* spp. ได้ดีในช่วงร้อยละ 13.3-66.1 โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือเชื้อ *Bacillus subtilis* และผลการศึกษาของ Nalk et al. (2016) ที่พบ *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ *Bipolaris oryzae* ได้ร้อยละ 52.2

ทั้งนี้ กลไกยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบได้หลายรูปแบบขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (Kumar et al., 2009; Layton et al., 2011; Tejera-Hernández et al., 2011; Huang et al., 2012; Meena & Kanwar, 2015; Shafi et al., 2017) เช่น การเจริญเติบโตที่รวดเร็วของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จนครอบคลุมเส้นใยของเชื้อรา และใช้เส้นใยของเชื้อราเป็นแหล่งอาหารทำให้กิจกรรมการเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง หรือสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง

การเจริญของเชื้อราโดยตรงทำให้เกิดเป็นวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เรียกว่า แนวยับยั้ง รอบโคโลนีของเชื้อรา (Bernal et al., 2002; Shirokov et al., 2002) ซึ่งในการศึกษานี้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่พบสร้างแนวยับยั้งทั้งหมด โดยพบแนวยังยั้งชัดเจนตั้งแต่วันที่ 4 หลังการบ่มเชื้อ เป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการศึกษาของ Chiangsin et al. (2018)

ดังนั้นจากผลการศึกษาคณะผู้วิจัยได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียรหัส BC02 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อศึกษาในรายละเอียดชนิดของเชื้อและกลไกการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรารวมทั้งพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในลำดับต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเพื่อค้นหาเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพควบคุมเชื้อรา *Bipolaris* spp. สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว โดยการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินนาเก็บรวบรวมจากพื้นที่ตำบลพรหมพิราม และตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก โดยวิธี soil dilution plate technique พบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris* spp. ระหว่างร้อยละ 75.79-81.81 โดยเชื้อแบคที่เรียรหัส BC02 มีประสิทธิภาพสูงสุด และสร้าง inhibition zone ขนาดกว้างมากที่สุดเฉลี่ย 3.39 เซนติเมตร และมีแนวโน้มสามารถพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ในรูปแบบของชีวินทรีย์ทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ หลักสูตรสาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร ตลอดจนผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Ahmed MF, Khalequzzaman KM, Islam MN. et al. Effect of fungicides against *Bipolaris oryzae* of rice under in vitro condition. Pakistan Journal of Phytopathology 2002;1(1):4-7.

Bake KF, James Cook R. Biological Control of Plant Pathogen. Freeman WH, San Francisco; 1974.

Bernal G, IllanesS A, Ciampi L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. Electronic Journal of Biotechnology 2002;5(1):12-20.

Calvo Py, Zúñiga D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Ecología Aplicada 2010:31-39.

Chiangsin R, Kesee C, Sangchote S. Biological control of *Bipolaris oryzae* with *Bacillus Subtilis* and the development of a formulation for rice seed treatment. Thai Journal of Agricultural Science 2018;51(3):139-151.

Czaczyk K, Stachowiak B, Trojanowska K. Antifungal activity of *Bacillus* sp. isolated from compost. Folia Microbiologica 2000;45(6):552-554.

Földes T, Bánhegyi I, Herpai Z. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-born pathogenic and spoilage microorganisms. Journal of Applied Microbiology 2000;89:840-846.

Gupta V, Shamas N, Razdan VK. et al. Foliar application of fungicides for the management of brown spot disease in rice (*Oryza sativa* L.) caused by *Bipolaris oryzae*. African Journal of Agricultural Research 2013;8(25):3303-3309.

Huang TP, Der-Syh Tzeng D, Wong ACL, et al. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. PLoS One 2012;7(7):e42124.

Intana W, Yenjit P, Suwanno T. et al. Efficacy of antifungal metabolites of *Bacillus* spp. for controlling tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. Walailak Journal of Science and Technology 2010;5(1):29-38.

Kabir L, Sang WK, Yun SK, et al. Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on pepper. Mycobiology 2012,40: 244-251.

Kittikanokrat W. Study of Formulation and shelf-life of *Bacillus subtilis* TISTR 001 product. master of science in biotechnology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, 2003.

Kumar A, Saini S, Shrivastava JN. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian Journal of Experimental Biology 2009;47(1):57-62.

Land Development Department. Soil series 1:25,000 scale map, 2021. Available at: http://eis.ldd.go.th/lddeis/SoilView.aspx. Accessed April 25, 2021.

Layton C, Maldonado E, Monroy L. et al. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 2011;9:177-187.

McSpadden Gardener BB. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. Agricultural Systems. Phytopathology 2004;94:1252-1258.

Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. BioMed Research International 2015;1-9.

Muenkun S. Diversity and antagonistic potential of *Bacillus* sp. for Controlling of Plant Phatology. Master of Science in Plant Phatology, Khon Kaen University, 2004.

Nalk RM, Akila R, Thiruvudainambi S. Management approaches for brown spot of rice caused by *Bipolaris oryzae*. Journal of Farm Science 2016;29(3):370-376.

Prasanna Kumar MK, Narayanappa Amruta CP, Manjula ME, et al. Characterisation, screening and selection of *Bacillus subtilis* isolates for its biocontrol efficiency against major rice diseases. Biocontrol Science and Technology 2017;27(4):581-599.

Rauch, EM, Bar-Yam Y. Long-range interactions and evolutionary stability in a predator-prey system. Physical Review Journals 2006;73:e020903.

Rice Department. Plantwise Factsheets for Farmers. Plantwise Knowledge Bank, 2013. Available at: https://www.plantwise.org/FullTextPDF/2016/20167800194.pdf. Accessed November 10, 2019.

Samson R A, Evans H C, Latge J P. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, Berlin, 1988.

Sha Y, Zeng Q, Sui S. Screening and application of *Bacillus* strains isolated from nonrhizospheric rice soil for the biocontrol of rice blast. Journal of Plant Pathology 2020;36(3):231-243.

Shafi J, Tian H, Ji M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology and Biotechnological Equipment 2017;31:446-459.

Shirokov AV, Loginov ON, Melent'ev AI, et al. Protein and peptide factors from *Bacillus* sp. 739 inhibit the growth of phytopathogenic fungi. Applied Biochemistry Microbiology 2002;38:139-143.

Tejera-Hernández B, Rojas-Badía MM, Heydrich-Pérez YM. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas 2011;42:131-138.

Usuwan P. Biocontrol of Grape Fungal Diseases by *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in crop production technology suranaree university of technology, 2007.

Vargas-Ayala R, Rodríguez-Kábana R, Morgan-Jones G, et al. Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*), cropping systems to control root-knot nematodes. Biological Control 2000,17:11-22.

Zuber P, Nakano MM, Marahiel MA. Peptide antibiotics. In: Sonenshein AC, Hooh JA, Losick R. eds. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology: Washington DC; 1993: 897-917.