

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* NS-03 ในการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora oryzae*

Efficacy of Biological Product of *Bacillus subtilis* NS-03 to Control Narrow Brown Spot of Rice Caused by *Cercospora oryzae*

ปณณวิชญ์ เย็นจิตต์^{1,*} ศรีณยา เฟ่งพล¹ และ วาริน อินทนา²
Punnawich Yenjit^{1,*}, Sarunya Pengphol¹ and Warin Intana²

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ นครสวรรค์ 60000

² หน่วยวิจัยไม้ผลเขตร้อน สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

¹ Department of Agricultural Technology, Faculty of Agricultural Technology and Industrial Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University, NakhonSawan 60000

² The Tropical Fruit Research Unit, School of Agricultural Technology, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80161

รับเรื่อง: 1 มิถุนายน 2563 Received: 1 June 2020

ปรับแก้ไข: 6 กรกฎาคม 2563 Revised: 6 July 2020

รับตีพิมพ์: 10 กรกฎาคม 2563 Accepted: 10 July 2020

* Corresponding author, Email: punnawich.yenjit@gmail.com

ABSTRACT: The antagonistic bacterium of *Bacillus subtilis* NS-03 was produced as a biological product of 3 formulas by using biochar powder mixed with talcum powder to be carriers. The different ratios of biochar and talcum powders in the 100 g of biological product, formula 1 containing 60 g of biochar powder and 10 g of talcum powder, formula 2 containing 40 g of biochar powder and 30 g of talcum powder, formula 3 containing 20 g of biochar powder and 50 g of talcum powder. After storage at room temperature for 12 months found that biological products contained with the increased proportion of biochar had the increased survival of *B. subtilis* NS-03, which was significantly different ($P < 0.01$). Consequently, formula 1, 2, and 3 had the population of *B. subtilis* NS-02 at 1.2×10^{10} , 1.0×10^9 , and 2.5×10^8 cfu/g, respectively. The results of biological products to inhibit the mycelial growth of *Cercospora oryzae*, the cause of Narrow brown spot of rice cv. Patumthanee 1 on potato dextrose agar, found that formula 1 provided the highest inhibition of *C. oryzae*. The lower treatments were formula 2 and 3 that could inhibit *C. oryzae* by 51.20, 47.78, and 44.63%, respectively. The greenhouse experiment for controlling Narrow brown spot of Patumthanee 1 rice, the use of 3 biological products of antagonistic bacterium sprayed on Patumthanee 1 rice found that had a significant difference ($P < 0.05$) when compared with control treatment. Carbendazim chemicals, the biological products of formula 1, 2 and 3 were able to control the Narrow brown spot by 75.64, 69.33, 56.29, and 41.87% respectively. In addition, the antagonistic bacteria of *Bacillus* spp. colonized rice leave by 62.30–89.26% after 2nd spray of biological products for 14 days.

Keywords: Narrow brown spot disease, biological product, *Bacillus* spp., rice, biological control

บทคัดย่อ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* NS-03 ได้รับการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ จำนวน 3 สูตร โดยใช้ผงถ่านชีวภาพผสมกับทาลคัมเป็นสารพาในสัดส่วนผงถ่านชีวภาพและผงทาลคัมที่ต่างกัน คือ ในผลิตภัณฑ์ 100 กรัม สูตรที่ 1 มีผงถ่านชีวภาพ 60 กรัม และผงทาลคัม 10 กรัม สูตรที่ 2 มีผงถ่านชีวภาพ 40 กรัม และผงทาลคัม 30 กรัม ส่วนสูตร 3 มีผงถ่านชีวภาพ 20 กรัม และผงทาลคัม 50 กรัม หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 เดือน พบว่า ชีวภัณฑ์ที่มีสัดส่วนของผงถ่านชีวภาพเพิ่มขึ้นทำให้แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 มีชีวิตรอดเพิ่มขึ้น แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดย สูตรที่ 1, 2 และ 3 มีจำนวนประชากรของ *B. subtilis* NS-03 เท่ากับ 1.2×10^{10} , 1.0×10^9 และ 2.5×10^8 cfu/g ตามลำดับ ผลของชีวภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cercospora oryzae* สาเหตุโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar พบว่า สูตรที่ 1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. oryzae* ได้สูงสุด รองลงมาคือ สูตรที่ 2 และ 3 สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. oryzae* ได้ เท่ากับ 51.20, 47.78 และ 44.63% ตามลำดับ สำหรับการทดลองในโรงเรือนบนการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าว การใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สูตร พ่นต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมโดยกรรมวิธีการที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม ชีวภัณฑ์สูตร 1, สูตร 2 และ สูตร 3 สามารถควบคุมการเกิดโรคใบขีดสีน้ำตาลได้ เท่ากับ 75.64, 69.33, 56.29 และ 41.87% ตามลำดับ นอกจากนี้พบแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เจริญครอบครองใบข้าว 62.30–89.26% หลังการพ่นชีวภัณฑ์ครั้งที่ 2 เป็นเวลา 14 วัน

คำสำคัญ: โรคใบขีดสีน้ำตาล, ชีวภัณฑ์, แบคทีเรียบาซิลลัส, ข้าว, การควบคุมโดยชีวภาพ

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของประชากรโลกและยังเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่สร้างรายได้จำนวนมากให้แก่ประเทศไทย แต่การผลิตข้าวในประเทศไทยยังประสบปัญหาการเข้าทำลายจากเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยเฉพาะในกลุ่มข้าวพันธุ์ส่งเสริม (ปทุมธานี 1 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 60 และชัยนาท 1) ที่มีคุณภาพดีและให้ผลผลิตสูง แต่อ่อนแอต่อโรคมามากกว่าข้าวพันธุ์พื้นเมือง (Intana et al., 2018) สำหรับโรคข้าวที่สำคัญ ได้แก่ โรคไหม้ โรคใบขีดสีน้ำตาล โรคกาบใบเน่า และโรคเมล็ดด่าง เป็นต้น ซึ่งโรคใบขีดสีน้ำตาลนั้นเกิดจากรา *Cercospora oryzae* เป็นสาเหตุโรคของข้าวที่สำคัญชนิดหนึ่งที่พบการระบาดสร้างความเสียหายให้แก่การผลิตข้าวในจังหวัดนครสวรรค์ทุกปี และเมื่อเกิดปัญหาโรคพืชระบาดเกษตรกรนิยมแก้ปัญหาด้วยการใช้สารเคมีที่มากเกินไปจนทำให้เกิดปัญหาด้านต้นทุนการผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น เกิดการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดโรคพืช และเกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในผลผลิตข้าวตลอดจนการปนเปื้อนของสารเคมีในสภาพแวดล้อมอีกด้วย การควบคุมโรคของข้าวโดยชีววิธีจึงเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรในกลุ่มปลูกข้าวปลอดภัยจากสารเคมีเลือกใช้ ซึ่งในปัจจุบันมีงานวิจัยการพัฒนาชีวภัณฑ์กำจัดโรคของพืชทั้งที่เป็นรูปแบบผงและรูปแบบน้ำ Chen et al. (2019) พบว่า ชีวภัณฑ์รูปแบบน้ำของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* 5 สามารถควบคุมโรคไหม้ของข้าว (Rice blast disease) ที่เกิดจาก *Magnaporthe oryzae* ได้ 31% ส่วน Noisa et al. (2018) พบว่า ชีวภัณฑ์ *B. siamensis* RRK1-Rif สูตรผงเปียกน้ำ หลังเก็บไว้ 11 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง (25–30°C) สามารถลดการเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ได้ 36.56–48.82% และ Dhitikiattipong et al. (2011) ใช้ผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. BAK-131 และ BAK-088 ซึ่งให้ผลในการลดการเกิดโรคยอดฝักดาบที่เกิด

จากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และเพิ่มผลผลิตของข้าวได้ ส่วนการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* ในการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลที่เกิดจากเชื้อรา *C. oryzae* พบว่า การใช้ *Trichoderma asperellum* NST-009 ร่วมกับ *B. subtilis* NST-002 มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้สูงถึง 73.17 เปอร์เซ็นต์ (Intana *et al.*, 2018) นอกจากนี้ Poralokanon *et al.* (2018) รายงานว่า ชีวภัณฑ์สูตรใหม่จากผงถ่านชีวภาพ โดยสูตร 3 (ผงถ่านชีวภาพ แป้งทาลค์ม โดโลไมต์ แคลเซียมคาร์บอเนต คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส และน้ำสกัดถั่วเหลือง) สามารถคงความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงสุดที่ 2.8×10^{10} cfu/g หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนาน 12 เดือน ดังนั้นการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ และประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เตรียมด้วยผงถ่านชีวภาพและทาลค์ม ในการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าว

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อราสาเหตุโรคและชีวภัณฑ์แบคทีเรียบาซิลลัส

เชื้อรา *Cercospora oryzae* แยกได้จากใบข้าว ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ก่อนจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการสร้างสปอร์ แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulation) ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* NS-03 จัดจำแนกชนิดด้วยเครื่อง Biolog Microlog System, Release 4.2 (Vos *et al.*, 2009) ผ่านการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. oryzae* บนจานอาหาร potato dextrose agar แล้วนำมาทำการผลิตเป็นชีวภัณฑ์รูปแบบผงโดยดัดแปลงวิธีการของ Muis (2006) ดังนี้ คือ นำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 ที่เลี้ยงบนอาหาร nutrient glucose agar

(NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1.0×10^8 cfu/g โดยค่าความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์ เมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว NGA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำ *B. subtilis* NS-03 ความเข้มข้น 1.2×10^{15} cfu/ml (ตรวจนับด้วยเทคนิค ten-fold serial dilution) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารพาที่มีสัดส่วนผงถ่านชีวภาพจากไม้ไผ่และผงทาลค์มที่ต่างกัน คือ ในผลิตภัณฑ์ 100 กรัม สูตรที่ 1 มีผงถ่านชีวภาพ 60 กรัม และผงทาลค์ม 10 กรัม สูตรที่ 2 มีผงถ่านชีวภาพ 40 กรัม และผงทาลค์ม 30 กรัม ส่วนสูตร 3 มีผงถ่านชีวภาพ 20 กรัม และผงทาลค์ม 50 กรัม โดยทุกสูตรเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพโดโลไมต์ (ละลายน้ำและแขวนลอยในน้ำได้ดี) และแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัม ซึ่งช่วยให้ *Bacillus* sp. ได้รับธาตุอาหารที่นำมาใช้ในการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (Gilbert *et al.*, 1990; Nikaji, 2016) และสารป้องกันเซลล์ carboxy methyl cellulose (CMC) ปริมาตร 8 กรัม และน้ำสกัดถั่วเหลือง (สกัดด้วยเครื่องโม่ถั่วเหลือง รุ่น HY-08) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ดัดแปลงสูตรจาก Poralokanon *et al.*, 2018) จากนั้น นำใส่ภาดอลูมิเนียมคลุมด้วยฟอยล์ปิดเชื้อ เเจาะฟอยล์ด้วยเข็มหมุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสภายในตู้อบลมร้อน และนำใส่ซองฟอยล์ปิดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ซอง (ซองละ 50 กรัม) หลังการเก็บรักษาในซองฟอยล์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 เดือน ทำการตรวจนับการมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 ในชีวภัณฑ์ด้วยวิธีมาตรฐาน ten-fold serial dilution (Alcamo, 2001) บนอาหาร NGA

ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค

เจาะขึ้นวุ้นเชื้อรา *C. oryzae* ที่มีอายุ 7 วัน ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วย้ายขึ้นวุ้นของเชื้อราวางตรงกลางจานอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้น จึงนำชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 หลังการเก็บรักษาในช่องฟอยล์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 เดือน จำนวน 1 กรัม มาทำการเจือจางด้วยน้ำ 9 มิลลิลิตร เทลงบนจานแก้ว แล้วนำขึ้นกระดาดปลอดเชื้อ (กระดาดกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ถูกตัดด้วยที่เจาะกระดาด และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3 มิลลิเมตร จุ่มเซลล์แขวนลอยของชีวภัณฑ์ นำมาวางบนจานเชื้อให้ห่างจากปลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคเท่ากับ 3 เซนติเมตร จำนวน 4 จุด ในแนวกากบาท วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด CRD ทำการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 จาน บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน บันทึกผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคโดยวัดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรค และคำนวณค่า%การยับยั้งเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) ตามสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \frac{A-B}{B} \times 100$$

เมื่อ A คือ รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชในกรรมวิธีควบคุม และ B คือ รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชในกรรมวิธีทดสอบ (Jantasorn et al., 2016)

ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียในการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืช

ปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในกระถางขนาดกว้าง 12 นิ้ว จำนวน 3 ต้นต่อกระถาง เมื่อต้นข้าวมีอายุ 1 เดือน ตัดใบข้าวออกให้เหลือใบข้าวบริเวณปลายยอด จำนวน 4 ใบต่อต้น (เพื่อให้ได้ใบข้าวที่มีจำนวนขนาด และอายุเท่ากัน) ตามวิธีการของ Intana et al. (2018) เตรียมสปอร์แขวนลอยโดยการเก็บเกี่ยวสปอร์ของเชื้อรา *C. oryzae* ด้วยการล้างและนำสปอร์เจือจางด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ แล้ววัดความเข้มข้นด้วย

haemocytometer จากนั้นจึงทำการปลูกเชื้อรา *C. oryzae* โดยการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 1.8×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อต้น (Srimai and Akarapisarn, 2014) คลุมต้นข้าวด้วยถุงพลาสติก เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำถุงพลาสติกออก และทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียต่อการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาล หลังการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 เดือน โดยการพ่นเซลล์แขวนลอยของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 ซึ่งเตรียมโดยผสมชีวภัณฑ์ด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อในอัตรา 1 กรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร และสารเคมีคาร์เบนดาซิม (50%WP) ในอัตรา 1.5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อต้น จำนวน 2 ครั้ง หลังการปลูกเชื้อรา *C. oryzae* เป็นเวลา 0 และ 14 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด CRD ทำการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 2 กระถาง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีปลูกเฉพาะเชื้อรา *C. oryzae* (control) วิเคราะห์หาค่าความรุนแรงของโรคของโรคใบขีดสีน้ำตาลบนใบข้าวของแต่ละกรรมวิธีหลังการพ่นเซลล์แขวนลอยของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 เป็นเวลา 14 และ 28 วัน โดยให้คะแนนในระดับ 0-10 ซึ่ง 0 = ไม่ได้แสดงอาการใด ๆ, 1 = แสดงอาการ 1-10%, 2 = แสดงอาการ 11-20%, 3 = แสดงอาการ 21-30%, 4 = แสดงอาการ 31-40%, 5 = แสดงอาการ 41-50%, 6 = แสดงอาการ 51-60%, 7 = แสดงอาการ 61-70%, 8 = แสดงอาการ 71-80%, 9 = แสดงอาการ 81-90% และ 10 = แสดงอาการ 91-100% (Srimai and Akarapisarn, 2014) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ตามสูตร [1]

$$\text{การเกิดโรค (\%)} = \frac{\text{Sum (N} \times \text{S)}}{(T \times M)} \times 100 \dots\dots\dots[1]$$

เมื่อ N คือ จำนวนใบที่ติดโรคในแต่ละระดับคะแนน S คือ ระดับคะแนนต่าง ๆ (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10) T คือ จำนวนใบทั้งหมดเท่ากับ 12 และ M คือ ระดับคะแนนสูงสุดเท่ากับ 10 (Chen et al., 2019)

นอกจากนี้ คำนวณ % การควบคุมโรค ตามสูตร [2]

$$\text{การควบคุมโรค (\%)} = (A-B)/A \times 100 \dots\dots [2]$$

เมื่อ A คือ ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุมที่ฉีดเฉพาะเชื้อรา *C. Oryzae* และ B คือ ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ (Jantasorn *et al.*, 2016)

บันทึกปริมาณและการครอบครองใบข้าวของแบคทีเรีย

หลังพ้นชีวภัณฑ์ครั้งที่ 2 เป็นเวลา 14 วัน นำใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในแต่ละกรรมวิธีมาตรวจปริมาณและการครอบครองใบข้าวโดยจุลินทรีย์ ซึ่งในการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ใช้วิธีการ dilution spread plate technique โดยนำตัวอย่างใบข้าวในแต่ละกรรมวิธีปริมาณ 5 กรัม มาผสมในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร ก่อนเขย่าด้วยเครื่องเขย่าดิจิตอล ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น เจือจางสารแขวนลอยใบข้าวที่ 10^{-4} – 10^{-5} เท่า ดูดสารแขวนลอยใบข้าวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient glucose agar (NGA) ก่อนบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน จึงบันทึกปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในแต่ละกรรมวิธี (Intana *et al.*, 2009)

การครอบครองใบข้าวตรวจโดยนำใบข้าวในแต่ละกรรมวิธีมาตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร จำนวน 40 ชิ้น (ข้าละ 10 ชิ้น จำนวน 4 ข้า) ก่อนนำไปใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าด้วยเครื่องเขย่าดิจิตอล ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำชิ้นใบข้าวมาซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำใบข้าววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA โดยวางจานเลี้ยงเชื้อละ 5 ชิ้น จำนวน 8 จานเลี้ยงเชื้อต่อกรรมวิธี บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากชิ้นพืชนำมาทำการ cross streak บนอาหาร NGA เพื่อดูลักษณะโคโลนีและย้อม

สเปิร์เพื่อดูลักษณะสเปิร์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้น จึงคำนวณ %การครอบครองใบข้าว จากเปรียบเทียบชิ้นใบข้าวที่มีแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และชิ้นใบข้าวทั้งหมดในแต่ละข้า ตามสูตร การครอบครองใบข้าว (%) = $B/A \times 100$ เมื่อ A คือ ชิ้นใบข้าวทั้งหมดในแต่ละข้า และ B คือ ชิ้นใบข้าวที่มีโคโลนีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (ดัดแปลงจาก Intana *et al.*, 2009)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสถิติ Sirichai_6 (Yenjit *et al.*, 2018)

ผลการทดลองและวิจารณ์

เชื้อราสาเหตุโรคและชีวภัณฑ์แบคทีเรียบาซิลลัสหลังการเก็บรักษา

เชื้อรา *Cercospora oryzae* ที่แยกได้จากใบข้าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวตามวิธีการทดสอบของ Koch (Koch's postulation) ส่วนการผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* NS-03 พบว่า การอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น และชีวภัณฑ์สูตรที่มีสัดส่วนของผงถ่านชีวภาพมากขึ้นจะมีการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์มากขึ้นด้วย โดยชีวภัณฑ์สูตร 1 ที่มีสัดส่วนของผงถ่านชีวภาพต่อผงทัลคัม (60 : 10) สูงสุดมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงสุดในช่วง 1.3×10^{17} ถึง 1.2×10^{10} cfu/g หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลา 1–12 เดือน รองลงมาคือชีวภัณฑ์สูตร 2 มีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในช่วง 2.4×10^{16} ถึง 1.0×10^9 cfu/g ในขณะที่ชีวภัณฑ์สูตร 3 มีสัดส่วนของผงถ่านชีวภาพต่อผงทัลคัม (20 : 70) ต่ำสุด จึงมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่ำสุดใน

ช่วง 1.5×10^{15} ถึง 2.5×10^8 cfu/g หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในช่วงเวลา 1–12 เดือน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Table 1) ซึ่งผงถ่านชีวภาพจากไม้ไผ่มีรสปูนจึงสามารถกักเก็บแบคทีเรียปฏิปักษ์ไว้เพื่อทำหน้าที่ครอบครองผิวพืชและควบคุมโรคพืช (Poralokanon *et al.*, 2018) อีกทั้งถือเป็นการ

ลดการใช้ผงทาลค์ (แร่หินทาลค์) ซึ่งเป็นสารพาที่ละลายน้ำและทำให้เชื้อปฏิปักษ์จับใบพืชได้ดี (Anan and Athinuwat, 2016) แต่องค์การอนามัยโลก (WHO) จัดให้เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งต่อมนุษย์และเสี่ยงต่อการก่อให้เกิดมะเร็งรังไข่ของผู้หญิงที่ใช้แป้งทาลค์ประมาณ 30–60% (Amy Keller, 2020)

Table 1 Amount of *Bacillus subtilis* NS–03 antagonist survived in three biological product formulas after stored at room temperature for 1, 3, 6 and 12 months

Biological products ^{1/}	Amount of <i>B. subtilis</i> NS–03 in three biological products (cfu/g)			
	1 st month	3 rd month	6 th month	12 th month
Formula 1	1.3×10^{17a}	1.1×10^{14a}	1.4×10^{12a}	1.2×10^{10a}
Formula 2	2.4×10^{16b}	2.7×10^{13b}	2.1×10^{11b}	1.0×10^{9b}
Formula 3	1.5×10^{15c}	3.2×10^{12c}	2.8×10^{10c}	2.5×10^{8c}
F–test	**	**	**	**
CV (%)	17.26	12.17	14.33	16.42

¹ Formula 1 = 60 g biochar, 10 g talcum, 10 g dolomite, 10 g calcium carbonate, 8 g Carboxy methyl cellulose, and 2 g soybean extract mixed with *B. subtilis* NS–03 (10^{15} cfu/ml) at a ratio 50 ml: 50 g of bio–product. Formula 2 = 40 g biochar, 30 g talcum, 10 g dolomite, 10 g calcium carbonate, 8 g Carboxy methyl cellulose, and 2 g soybean extract mixed with *B. subtilis* NS–02 (10^{15} cfu/ml) at a ratio 50 ml: 50 g of biological product. Formula 3 = 20 g biochar, 50 g talcum, 10 g dolomite, 10 g calcium carbonate, 8 g Carboxy methyl cellulose, and 2 g soybean extract mixed with *B. subtilis* NS–02 (10^{15} cfu/ml) at a ratio 50 ml: 50 g of biological product.

^{a, b, c} Mean values within the same columns followed by the different superscript letters are significantly different according to the Duncan’s new multiple range test ($P < 0.01$)

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* NS–03 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. oryzae* หลังการบ่มไว้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชีวภัณฑ์

แบคทีเรีย *B. subtilis* NS–03 สูตร 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. oryzae* สูงสุดที่ 51.20% รองลงมาคือ ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* NS–03 สูตร 2 และ สูตร 3 ซึ่งมีการยับยั้ง เท่ากับ 47.78 และ 44.63% ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Table 2) ทั้งนี้เนื่องจากชีวภัณฑ์สูตร 1 มีจำนวน

แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 มากกว่าสูตร 2 และสูตร 3 สอดคล้องกับการทดลองของ Poralokanon *et al.* (2018) ที่พบว่า ชีวภัณฑ์ (สูตร 3) ที่มีจำนวนแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TU-Orga 13 มากกว่าสามารถยับยั้งและควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้สูงกว่าสูตรอื่น ๆ กลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค

ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. เกิดจากการสร้างเอนไซม์และสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) ซึ่ง Nagy *et al.* (2012) รายงานว่า *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ Iturin A, Bacilomycin, Mycosubtilin Fungistatin และ Subsporin เป็นต้น

Table 2 Efficacy of *Bacillus subtilis* NS-03 biological products to inhibit the growth of *Cercospora oryzae*

Treatments	Inhibition of <i>C. oryzae</i> (%) ¹
Formula 1	51.20 ^a
Formula 2	47.78 ^{ab}
Formula 3	44.63 ^b
Control (Sterile distilled water)	0.00 ^c
F-test	*
CV (%)	21.78

¹ Inhibition (%) = (A – B)/A × 100, when A is the mycelial growth of *C. oryzae* in a control treatment and B is the mycelial growth of *C. oryzae* in the testing treatments

^{a,b,c} Mean values within the same columns followed by the different superscript letters are significantly different according to the Duncan's new multiple range test (P < 0.05)

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียในการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืช

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* NS-03 ในการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *C. oryzae* ในสภาพโรงเรือน พบว่า หลังการพ่นชีวภัณฑ์ครั้งที่ 2 เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 สามารถควบคุมการเกิดโรคใบขีดสีน้ำตาลได้ 41.87–69.33% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและมีความรุนแรงของโรคใบขีดสีน้ำตาลในช่วง 21.53–40.81% ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม สามารถควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลได้ดี

75.64% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3) ซึ่งมีรายงานว่าผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (รูปแบบผงทลัคัมของ *Bacillus firmus* E65) สามารถลดความรุนแรงโรคไหม้ (Blast disease) และกาบใบแห้ง (Sheath blight) ของข้าวในโรงเรือนปลูกพืช (Suryadi *et al.*, 2013) ส่วน Dhitikiattipong *et al.* (2011) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถควบคุมโรคเมล็ดต่างของข้าวได้ นอกจากนี้ Srimai and Akarapisarn (2014) ยังพบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจากราในกลุ่ม *Cercospora* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีกลไกในการสร้างสารปฏิชีวนะไปทำลายเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา

Table 3 Efficacy of *Bacillus subtilis* NS-03 biological products to control narrow brown spot disease caused by *Cercospora oryzae*

Treatments	Severity index ¹	Disease control (%) ²
Formula 1 (1 g/100 mL)	21.53 ^{de}	69.33 ^b
Formula 2 (1 g/100 mL)	30.69 ^c	56.29 ^c
Formula 3 (1 g/100 mL)	40.81 ^b	41.87 ^d
Carbendazim 50%WP (1.5 g/L)	17.10 ^e	75.64 ^a
Sterile distilled water (Control)	70.21 ^a	0.00 ^e
F-test	*	*
CV (%)	28.11	31.02

¹ Severity index of narrow brown-spot disease on the rice plants was defined as the percentage of diseased leaf area, where 0: plants did not show any symptoms, 1: 1–10%, 2: 11–20%, 3: 21–30%, 4: 31–40%, 5: 41–50%, 6: 51–60%, 7: 61–70%, 8: 71–80%, 9: 81–90% and 10: 91–100%

² Disease control = (A – B)/A × 100, when A is the severity index in a control treatment and B is the severity index in the testing treatments

a, b, c, d, e Mean values within the same columns followed by the different superscript letters are significantly different according to the Duncan's new multiple range test (P < 0.05)

ปริมาณและการครอบครองใบข้าวของแบคทีเรีย

จากการตรวจนับจำนวนประชากรของแบคทีเรียบนใบข้าวพบแบคทีเรีย *Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 2.9×10^4 ถึง 3.2×10^5 cfu/g ในกรรมวิธีที่ทำการฉีดพ่นชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 ในขณะที่กรรมวิธีการพ่นสารเคมีคาร์เบนดาซิมไม่พบแบคทีเรีย *Bacillus* spp. นอกจากนี้ พบการครอบครองใบข้าวของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 62.30–89.26% (Table 4) ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงว่ามีแบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 อยู่ด้วย เนื่องจากปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และการเจริญครอบครองใบข้าวทุกกรรมวิธีมีค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (control) อย่างชัดเจน นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่ม

เดิมเกี่ยวกับความมีชีวิตอยู่รอดของ *B. subtilis* NS-03 บนใบข้าว โดยการใช้เทคนิคด้านโมเลกุลหรือการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 สายพันธุ์ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ ตามเทคนิควิธีการของ Chamswang *et al.* (2017) ที่พบแบคทีเรีย *B. siamensis* RRK1–Rif มีชีวิตอยู่รอดบนใบข้าว 63.33–93.33% หลังพ่นชีวภัณฑ์บนต้นข้าว 24 ชั่วโมง ส่วน Wiwattanapatapee *et al.* (2007) รายงานการตรวจพบแบคทีเรีย *B. megaterium* ในปริมาณ 10^6 cfu/g บนใบข้าวหลังพ่นชีวภัณฑ์ เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีความแปรผันสูงบนส่วนที่อยู่เหนือดินของพืชได้ (Demoz and Korsten, 2006)

Table 4 Populations of *Bacillus* spp. on rice leaf and rice leaf colonization at 14 days after second spraying under greenhouse conditions

Treatments	<i>Bacillus</i> spp. population (cfu/g) ¹	Rice leaf colonization (%) ²
Formula 1 (1 g/100 mL)	3.2×10^{5a}	89.26 ^a
Formula 2 (1 g/100 mL)	1.3×10^{5ab}	71.54 ^{ab}
Formula 3 (1 g/100 mL)	2.9×10^{4b}	62.30 ^b
Carbendazim 50%WP (1.5 g/L)	0.0×10^{0d}	0.00 ^d
Sterile distilled water (Control)	1.1×10^{1c}	7.15 ^c
F-test	*	*
CV (%)	29.51	34.22

¹ Population of *Bacillus* spp. on rice leaf when assay by dilution spread plate technique using nutrient glucose agar

² Rice leaf colonization was defined as the percentage of rice leaf piece that found *Bacillus* spp. colonies from measuring colony on nutrient glucose agar

^{a,b,c,d} Mean values within the same columns followed by the different superscript letters are significantly different according to the Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$)

สรุป

ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* NS-03 ที่มีสัดส่วนของผงถ่านชีวภาพเพิ่มขึ้นทำให้แบคทีเรีย *B. subtilis* NS-03 มีชีวิตรอดเพิ่มขึ้นหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 เดือน ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 ซึ่งมีส่วนผสมของผงถ่านชีวภาพสูง (60%) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora oryzae* สาเหตุโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้สูงสุด การใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมมีประสิทธิภาพควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวได้สูงสุด รองลงมาคือ ชีวภัณฑ์สูตร 1 และสูตร 2

นอกจากนี้ ตรวจพบแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถมีชีวิตรอดและเจริญครอบคลุมใบข้าวได้หลังการพ่นชีวภัณฑ์ 14 วัน

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ ที่อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Alcamo, E.I. 2001. Fundamentals of Microbiology. 6th Edition. Jones and Bartlett Publishers Inc., USA.
- Amy Keller, R.N. 2020. Does Talc Cause Cancer? Available Source: <https://www.drugwatch.com/talcum-powder/does-talc-cause-cancer/>, May 27, 2020.
- Anan, K. and D. Athinuwat. 2016. Bio-Formulation Development from *Bacillus subtilis* TU-Orga1 for Controlling the Important Diseases of Chinese Kale. Thai J. Sci. Technol. 24(5) (Suppl.): 793–812. (in Thai)
- Chamswarn, C., W. Intanoo and B. Noisai. 2017. Efficacy of biological products of *Bacillus siamensis* RRK1–Rif for reducing sheath blight and dirty panicle of rice. Agricultural Sci. J. 49(1): 1–14. (in Thai)
- Chen, W.C., T.Y. Chiou, A.L. Delgado and C.S. Liao. 2019. The control of rice blast disease by the novel biofungicide formulations. Sustainability 11: 3449.
- Demoz, B.T. and L. Korsten. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem–end rot pathogens. Biol. Control 37(1): 68–74.
- Dhitikiattipong, R., P. Srikoorn, W. Rattanakarn and W. Khemmuk. 2011. Efficacy of powder formulation of antagonistic bacteria to control rice bakanae disease in the field. Agricultural Sci. J. 42(2) (Suppl.): 157–160.
- Gilbert, G.S., J. Handelsman and J.L. Parke. 1990. Role of ammonia and calcium in lysis of zoospores of *Phytophthora cactorum* by *Bacillus cereus* strain UW85. Exp. Mycol. 14: 1–8.
- Intana, W., A. Promwee and P. Yenjit. 2018. Increasing the Efficacy to control narrow brown spot of rice using combination of *Trichoderma asperellum* NST–009 and *Bacillus subtilis* NST–002. Agricultural Sci. J. 49(2): 147–159. (in Thai)
- Intana, W., C. Chamswarn, C. Ngamriabsakul and K. Chantrapromma. 2009. The increased efficacy of tangerine root rot control by using combination of mutant strains of *Trichoderma harzianum*. Philipp. Agric. Scientist. 92(1): 39–45.
- Jantasorn, A., J. Mongon, B. Moungrimuangdee and T. Oiuphisittraiwat. 2016. Antifungal activity of *Talaromyces flavus* Bodhi001 and *Talaromyces trachyspermus* Bodhi002 crude extracts isolated from riparian forest soils against plant pathogenic fungi causing economic crop diseases. Agricultural Sci. J. 47(2): 121–131. (in Thai)

- Muis, A. 2006. Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. Indones. J. Agric. Sci. 7(2): 51–56.
- Nagy, A., L. Manczinger, D. Tombácz, L. Hatvani, J. Györfi, Z. Antal, E. Sajben, C. Vágvolgyi and L. Kredics. 2012. Biological control of Oyster mushroom green mold disease by antagonistic *Bacillus* species. IOBC–WPRS Bull. 78: 289–293.
- Nikaji, J. 2016. Development of formulation and application of *Bacillus subtilis* for controlling soft rot disease of Chinese mustard. MS Thesis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. (in Thai)
- Noisai, B., C. Chamswarng and W. Intanoo. 2018. Efficacy of *Bacillus siamensis* RRK1–Rif wettable powder formulations against sheath blight and dirty panicle diseases and on yield enhancement of rice. Khon Kaen Agr. J. 46(4): 633–642.
- Poralokanon, P., D. Athinuwat and C. Boonnadukul. 2018. Pilot scale production of novel biopesticide wet table powder formulation to control canker disease of lime in large field application. Thai J. Sci. Tech. 7(5): 491–515.
- Srimai, K. and A. Akarapisarn. 2014. *Bacillus subtilis* LBF02 as biocontrol agent against leaf spot diseases caused by *Cercospora lactucae-sativae* in lettuce. J. Agricultural Sci. 6(3): 151–158.
- Suryadi, Y., D.N. Susilowati, T.S. Kadir, Z.R. Zaffan, N. Hikmawati and N.R. Mubarik. 2013. Bioformulation of antagonistic bacterial consortium for controlling blast, sheath blight and bacterial blight diseases on rice. Asian J. Plant Pathol. 7(3): 92–108.
- Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer and W.B. Whitman. 2009. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Springer–Verlag)). 2nd Edition. 323 pp.
- Wiwattanapatapee, R., A. Chumthong, A. Pengnoo and M. Kanjanamaneesathian. 2007. Effervescent fast–disintegrating bacterial formulation for biological control of rice sheath blight. J. Control Release 119: 229–235.
- Yenjit, P., T. Dethoup and W. Intana. 2018. The combined application of *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. powders to control dirty panicle disease caused by *Bipolaris oryzae* in rice. Agricultural Sci. J. 49(1): 15–26. (in Thai)