วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยมูลไส้เดือนที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและอยู่ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ควบคุมโรคพืชได้กว้าง

Screening of plant growth promoting bacteria from vermicompost and their compatibility with broad spectrum antagonistic bacteria

พิรุณรักษ์ น้อยชุมแพ[1] และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล[1]*

Phirunrak Noichumphae[1] and Petcharat Thummabenjapone[1]*

[1] *สาขากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[1] *Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University*

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากปุ๋ยมูลไส้เดือนที่สามารถอยู่ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ควบคุมโรคพืชได้กว้าง เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เชื้อผสม (ชุมชนแบคทีเรีย) สำหรับควบคุมโรคพืชได้กว้างและช่วยกระตุ้นให้ต้นพืชมีการเจริญเติบโตที่ดี มีผลผลิตเพิ่มมากยิ่งขึ้น ดำเนินการโดยนำปุ๋ยมูลไส้เดือน 2 สายพันธุ์ คือ African night crawler และ Tiger มาแยกเชื้อบนอาหาร NA ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 54 ไอโซเลต ผ่านการทดสอบกับพืชแล้วไม่ก่อโรคบนใบข้าว และใบมะเขือเทศที่เป็นพืชตัวแทน เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ Indole 3-acetic Acid (IAA) พบว่า เชื้อทุกไอโซเลตสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ อยู่ระหว่าง 0.75 ถึง 38.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไอโซเลต Af13 สามารถสังเคราะห์ IAA ได้มากที่สุด เท่ากับ 38.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Tg24 สังเคราะห์ IAA ได้ 34.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต เชื้อจากปุ๋ยมูลไส้เดือน 5 ไอโซเลต ได้แก่ Af1, Af11, Af18, Tg14 และ Tg15 สามารถละลายฟอสเฟตได้ โดยไอโซเลต Tg15 มีค่า phosphate solubilization index (PSI) สูงที่สุด เท่ากับ 2.73 รองลงมา คือ ไอโซเลต Af1 และ Tg14 มีค่า PSI เท่ากับ 2.13 และ 2.11 ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยมูลไส้เดือนจำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ Af1, Af11, Af13, Af18, Af20, Af21, Af25, Tg14, Tg15, Tg18, Tg24 และ Tg31 นำมาทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ได้แก่ เชื้อ*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* NB7-7, *X. oryzae* pv. *oryzae* CN2-1, *X. oryzae* pv. *oryzae* PR5-1, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. euvesicatoria* -toxan, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas* sp. *Acidovorax citrulli* -WM001 และเชื้อราสาเหตุโรคพืช *คือ Rhizoctonia solani, Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris oryzae* และ *Alternaria padwickii* โดยเทคนิค dual culture bioassay พบว่ามีเชื้อที่แยกจากมูลไส้เดือนเพียง 10 ไอโซเลตเท่านั้นที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชเพียงบางชนิดนำมาทดสอบแต่ยังมีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำกว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาใช้เปรียบเทียบ คือ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4 และ *Bacillus*-Ba029 เมื่อนำเชื้อจากปุ๋ยมูลไส้เดือนทั้ง 12 ไอโซเลตมาทดสอบความเข้ากันได้กับเชื้อ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4 และ *Bacillus*-Ba029 และแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ *Bacillus*-PSK พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Af11 สามารถเข้ากันได้ดีมากกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ไอโซเลตโดยไม่มีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้น ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต (*Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4 *Bacillus*-Ba029 *Bacillus*-PSK และ Af11) จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์แบบชุมชนแบคทีเรียที่ดีเยี่ยมเพื่อสนับสนุนการเกษตรแบบยั่งยืนของประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: การควบคุมโรคพืช; จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโต; earthworm vermicompost microbes; microbial consortium

* Corresponding author: petsir@kku.ac.th

Received: date; February 8, 2024 Revised: date; April 9, 2024

Accepted: date; April 19, 2024 Published: date; July 8, 2024

ABSTRACT: The objective of this research was to screen plant growth-promoting bacteria from vermicompost with compatible with broad spectrum antagonistic bacteria for further development of consortium bacteria bio-product. This consortium bacteria bioproduct is an innovative bioproduct for broad spectrum to control major plant diseases and promote plant growth and yield. A total of 54 isolates of bacteria isolated from vermicompost were tested for their pathogenicity on rice and tomato plants and found that they were not plant pathogens, not any disease symptom was developed. For plant growth promotion ability, all isolates were able to synthesize Indole 3-acetic Acid (IAA) between 0.75 to 38.40 micrograms per milliliter. The best one was Af13 isolate produced IAA as much as 38.40 micrograms per milliliter, followed by Tg24, which produced IAA at 34.42 micrograms per milliliter. Test for phosphate solubilization, the 5 isolates e.g. Af1, Af11, Af18, Tg14 and Tg15 showed capability for phosphate solubilization. The Tg15 isolate has the highest phosphate solubilization index (PSI) of 21.88, followed by Af11 and Tg14 isolates that have PSI values of 17.00 and 16.84, respectively. A total of 12 isolates of plant growth-promoting bacteria (PGPB) from vermicompost were selected, e.g., Af1, Af11, Af13, Af18, Af20, Af21, Af25, Tg14, Tg15, Tg18, Tg24 and Tg31 for testing the capability to be antagonistic bacteria using dual culture bioassay with plant pathogens. The plant pathogenic bacteria including *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*-NB7-7, *X. oryzae* pv. *oryzae*-CN2-1, *X. oryzae* pv. *oryzae*-SP1-1, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. euvesicatoria* -toxan, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas* sp. and *Acidovorax citrulli*-WM001 and plant pathogenic fungi e.g. *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides, Bipolaris oryzae* and *Alternaria padwickii* were tested. Results showed that only 10 isolates of PGPB from vermicompost could inhibit some of tested plant pathogens but lower than the broad-spectrum antagonistic bacteria including *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4 and *Bacillus*-Ba029. The compatibility of 12 isolates of PGPB from vermicompost was tested with *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4 and *Bacillus*-Ba029 and plant growth-promoting bacteria *Bacillus*-PSK by dual culture bioassay. Results showed that the Af11 isolate was the best compatible with all tested bacteria. These 5 bacterial isolates (*Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-PSK and Af11) will be useful for the further development of excellent consortium bacteria bio-products to support sustainable agriculture in Thailand.
Keywords: plant disease control; plant growth promoting bacteria; vermicompost microbes; microbial consortium; sustainable agriculture

บทนำ

ในการปลูกพืชนั้นมีเชื้อโรคเข้าทำลายได้หลายชนิด ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย มอลลิคิวท์ ไวรัส ไวรอยด์ และไส้เดือนฝอย ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อพืช ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิต การลดโรคในพืชให้ได้มากที่สุดมีส่วนสำคัญมากสำหรับการผลิตพืชเพื่อให้ได้ผลผลิตตามเป้าหมาย จากความตระหนักถึงภัยของสารเคมีกำจัดโรคพืช จึงมีการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคมากขึ้น รวมทั้งการใช้ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก ควบคู่กับการใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมีต่างๆเพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพดินที่เสื่อมโทรม เพิ่มผลผลิตให้มีคุณภาพ และที่สำคัญเป็นการลดการใช้สารเคมีที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ซึ่งตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่รักสุขภาพ และตอบ สนองความต้องการทางการตลาดของพืชปลอดภัยหรืออินทรีย์ ที่กำลังขยายตัวอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน (เกศกนก, 2562) การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคได้กว้าง และมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยเข้ามาใช้ร่วมกันในลักษณะที่เป็นชุมชนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (microbial consortium) เป็นแนวทางที่มีศักยภาพสูงมากกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบชนิดเดี่ยว และการใช้สารเคมีหลายชนิดควบคุมโรคพืช หลายงานวิจัยมีการศึกษาและพัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อผสมมาใช้ในการควบคุมโรคพืชและส่งเสริมการเจริญเติบโต เช่น การใช้เชื้อ *Bacillus megaterium*, *B. mojavensis*, *Pseudomonas azotoformans* A70, *P. frederiksbergensis* A176 และ *Arthrobacter nitroguajacolicus* E46 ควบคุมโรคเหี่ยว (sudden wilt disease) ที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium - Alternaria* disease complex ในยาสูบ (Santhanam et al., 2019) การใช้เชื้อร่วมกันของ 1) *Bacillus* sp. SJI, *Bacillus* sp. HI, *Serratia marcescens* ULG1E4 และ *S. marcescens* JBIE3 หรือ 2) *Bacillus* sp. SJI, *Bacillus* sp. HI, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. marcescens* ULG1E4 and *S. marcescens* JBIE3 ในการควบคุมโรคใบจุดสีม่วงที่เกิดจากเชื้อ *Alternaria porri* รวมทั้งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตของหอมแดง (Resti and Liswarni, 2021) การใช้เชื้อ *Bacillus safensis* RF69, *Bacillus* sp. RP103 และ *Bacillus* sp. RP242 ร่วมกันในการควบคุมโรคฝักเน่าของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium verticillioides* (Einloft et al., 2021) Zhang et al. (2019) ได้

ใช้แบคทีเรีย *Bacillus cereus* AR156, *Bacillus subtilis* SM21 และ *Serratia* sp. XY21 ร่วมกันสามารถลดการเกิดโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora capsici* และเพิ่มคุณภาพผลผลิตพริกหวานได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานในรูปแบบการใช้ร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อราปฏิปักษ์ เช่น ปัณณวิชญ์ และคณะ (2561) ได้พัฒนาผงเชื้อ *Trichoderma harzianum* NS–03 และ *Bacillus subtillis* NS–02 เพื่อใช้ร่วมกันในการควบคุมโรคเมล็ดด่างที่เกิดจาก *Bipolaris oryzae* ในข้าว Solanki et al. (2019) พบว่าการใช้เชื้อ *Streptomyces atrovirens* N23 และ *Trichoderma lixii* NAIMCC-F-01760 (TL) ร่วมกันสามารถลดการเกิดโรครากเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* ได้ดีและทำให้ความสูงต้น ความยาวราก จำนวนผลผลิตดีกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียว Wong et al. (2019, 2021) ศึกษาการควบคุมโรคตายพรายของกล้วยที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* DRB1 และ *Trichoderma harzianum* CBF2 พบว่า สามารถลดความรุนแรงของโรค และมีผลทำให้กล้วยมีการเจริญเติบโตทางสรีรวิทยาโดยรวมที่ดี ซึ่งได้แก่ ในส่วนน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูงต้น ความกว้างและความยาวใบ เช่นเดียวกับ Bhusal and Mmbaga (2020) ได้ศึกษาการควบคุมเชื้อ *Phytophthora capsici* และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกหวาน โดยใช้เชื้อผสมของบาซิลลัส 3 ชนิด ได้แก่ *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. thuringiensis* พบว่าสามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora capsici* และส่งเสริมการเจริญของพริกหวานในด้านความสูงต้น น้ำหนักต้น ความยาวราก น้ำหนักราก และปริมาณคลอโรฟิลด์ในใบพริก

ปุ๋ยมูลไส้เดือนเป็นปุ๋ยหมักชนิดหนึ่งที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้ในการเพาะปลูกพืช มีรายงานจำนวนมากทั้งในประเทศและต่างประเทศที่ศึกษาถึงประสิทธิภาพ ของปุ๋ยมูลไส้เดือนในด้านต่างๆ เช่น ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ปรับปรุงโครงสร้างดิน เพิ่มช่องว่างในดินให้มี การระบายน้ำและอากาศดียิ่งขึ้น ทำให้ระบบรากพืชสามารถแพร่กระจายตัวในดินได้กว้าง (สุลีลัก และ สุชาดา, 2557) ช่วยจัดการกากตะกอนของเสียอินทรีย์จากอุตสาหกรรมเกษตร เพิ่มอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของสารพิษที่ตกค้าง ในดิน ของสารกลุ่ม Organophosphates (Chlopyrifos), Pyrethroids (Cypermethrin) และ Deltametrin (จารุพงศ์ และ ชุลีมาศ, 2556; อานัฐ และคณะ, 2560) และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชที่ปลูก เช่น มะเขือเทศเชอรี่ (เกศกนก, 2562) ผักกาดฮ่องเต้ (Ramnarain, 2018; Benjawan et al., 2020) ผักบุ้งจีน (วนิดา, 2562) ข้าวหอมปทุม (สายชล และคณะ, 2564) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สุลีลัก และ สุชาดา, 2557) ถั่วแขก (Belmeskine et al., 2020) พริก (Rekha et al., 2018) และข้าวโพด (Younas et al., 2021) เนื่องจากไส้เดือนดินและเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ทำให้ภายในสำไส้ของไส้เดือนดินมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการอาศัยอยู่และเกิดกิจกรรมต่างๆของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ต่างๆจะปนออกมากับมูลไส้เดือน (อานัฐ และคณะ, 2560) ทำให้ในปุ๋ยมูลไส้เดือนมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆที่เป็นประโยชน์หลายชนิด ดังมีรายงานของ Blomström et al. (2016) ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในปุ๋ยมูลไส้เดือนมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์เป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน ไฟลัม Proteobacteria ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียหลายกลุ่ม ซึ่งแบคทีเรียที่ดีต่อพืช เช่นแบคทีเรีย ตรึงไนโตรเจน และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชด้วย, ไฟลัม Bacteroidetes ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มักพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ พบ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ไฟลัม Actinobacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบทั่วไปในธรรมชาติ พบ 8.7 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในปุ๋ยมูลไส้เดือนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้กว้างขวาง ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายกลุ่ม (broad-spectrum antagonistic bacteria) แต่มีความสามารถด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในระดับต่ำสำหรับพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์แบบใหม่ที่เป็นเชื้อผสมสำหรับการสร้างชุมชนแบคทีเรีย (consortium bacteria) ที่สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้กว้างหลายกลุ่ม และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต เพิ่มผลผลิตพืชให้มากขึ้น ลดภาวะเครียดจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม (abiotic stress) ไปพร้อมกัน ซึ่งเป็นแนวทางเพื่อสนับสนุนภาคการผลิตเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมี ลดการใช้ปุ๋ยเคมี เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน และส่งเสริมการผลิตผลิตผลทางการเกษตรที่ปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และนำไปสู่การอนุรักษ์ระบบนิเวศน์เกษตรอย่างยั่งยืน

วิธีการศึกษา

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากปุ๋ยมูลไส้เดือน

1.1 การแยกเชื้อจากปุ๋ยมูลไส้เดือน

นำปุ๋ยมูลไส้เดือนที่ผลิตจากไส้เดือน 2 สายพันธุ์ คือ African night crawler (*Eudrilus eugeniae*) และ Tiger (*Eisenia foetida*) จากฟาร์มแก่นพะยอม จังหวัดขอนแก่น มาแยกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการ Serial dilution บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยคัดเลือกเก็บทั้งแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแตกต่างกัน จากนั้นทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate แล้วย้ายลงในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาคุณสมบัติประจำตัวพื้นฐานโดยนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA โดยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ทดสอบชนิดแกรมโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการมาตรฐานในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

1.2 การพิสูจน์การเกิดโรคกับพืช

ใช้ต้นกล้าข้าวกข.6 อายุ 21 วัน และต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์เพชรชมพู อายุ 28 วันมาทำการทดสอบ โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA โดยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมเป็นเชื้อแขวนลอยความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ค่าการดูดซับแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.3 (10^8 cfu/ml) สำหรับการปลูกเชื้อบนใบข้าวโดยวิธีตัดใบ (Clipping method) โดยใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในเชื้อแขวนลอยแล้วตัดใบข้าว ให้มีความยาวจากปลายใบเข้ามา 3-5 เซนติเมตร (Kauffman et al., 1973) จำนวน 2 ใบต่อต้น ทำการทดลอง 3 ต้นต่อกรรมวิธี ประเมินผลการทดสอบที่เวลา 3 วัน โดยวัดความยาวของแผลที่ลามเข้าไปจากจุดตัดใบเทียบเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ) และกรรมวิธี Disease control (เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*) สำหรับการปลูกเชื้อบนใบมะเขือเทศใช้วิธีอัดใบ (Infiltration method) ดัดแปลงจาก Hoshikawa et al. (2019) โดยใช้เชื้อแขวนลอยความเข้มข้น OD_{600} เท่ากับ 0.1 (10^6 cfu/ml) ทำการทดลองจำนวน 3 ใบต่อต้น ทำการทดลอง 3 ต้นต่อกรรมวิธี ประเมินผลการทดสอบที่เวลา 2 วันหลังปลูกเชื้อ โดยประเมินจากการเกิดร่องรอยของโรค (รอยแผลฉ่ำน้ำและต่อมาเป็นจุดแผลเนื้อเยื่อตาย ขอบแผลมีสีเหลือง) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ) และกรรมวิธี Disease control คือ เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เช่นเดียวกัน

2. ประเมินคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2.1 การตรวจสอบการสังเคราะห์ IAA โดยใช้ Salkowski's reagent

นำเชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ย้าย single colony ลงเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผสม 2 mM tryptophan เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดที่เพาะเลี้ยงไว้มาตรวจสอบปริมาณความเข้มข้น IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีดัดแปลงจาก Khamna et al. (2009) เริ่มจากดูดน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (bacterial broth culture) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในmicro centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์ (bacterial cell pellet) ตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แล้วจึงดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ และเติม 85% orthophosphoric acid จำนวน 2 หยด พร้อมเขย่า หลังจากนั้นเติม Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงบ่มในที่มืด นาน 30 นาที นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดความเข้มของสี ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร โดยหากมี IAA สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู และนำค่า OD_{530} เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ IAA วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวนกรรมวิธีละ 6 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยโปรแกรม SAS

2.2 ตรวจสอบกิจกรรมการละลายฟอสเฟต

นำเชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่ แล้วจึงย้ายชิ้นวุ้นลงบนอาหาร Pikovskaya's agar ที่ผสม 0.5% insoluble tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) (Pikovskaya, 1948) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (Franco-Correa et al., 2010) ถ้ามีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตเกิดขึ้น อาหารบริเวณขอบของชิ้นวุ้นจะเปลี่ยนจากลักษณะขุ่นเป็นวงใส (halo zone) ล้อมรอบ แสดงว่าแบคทีเรียไอโซเลตนั้นๆมีกิจกรรมการละลายฟอสเฟต แล้วจึงประเมินค่า solubilization index (S.I.) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นวุ้น+วงใส) / ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นวุ้น วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยโปรแกรม SAS

3. ทดสอบศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Dual culture bioassay

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนที่ไม่ก่อโรคให้กับพืชและมีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จำนวน 12 ไอโซเลต (Af1, Af11, Af13, Af18, Af20, Af21, Af25, Tg14, Tg15, Tg18, Tg24 และ Tg31) และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces*-PR87 และเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 9 ไอโซเลต (*Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-BS, *Bacillus*-PSK, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Bi1, *Bacillus*-KU01, *Bacillus*-KU02, และ *Bacillus*-KU03) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และมีข้อมูลแสดงถึงศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชจากการทดลองในห้องปฏิบัติการมาใช้ทดลองเปรียบเทียบ โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี Streak plate เชื้อ *Streptomyces*-PR87 เลี้ยงบนอาหาร Arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน 12 ไอโซเลต และเชื้อ *Bacillus* 9 ไอโซเลต เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ได้แก่ เชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *X. euvesicatoria* -toxan, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas* sp., *Acidovorax citrulli* -WM001 และ *Pectobacterium carotovorum* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA โดยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมเป็นเชื้อแขวนลอย ความเข้มข้น OD_{600} เท่ากับ 0.1 ใช้ cotton bud นึ่งฆ่าเชื้อ จุ่มเชื้อแขวนลอยให้เปียกชุ่ม แล้วนำไปทาลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่เตรียมไว้ใช้ในการทดสอบ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน หรือ เชื้อ *Streptomyces*-PR87 หรือ *Bacillus* spp. ไอโซเลตต่างๆ เจริญอยู่ได้เป็น culture disk และย้ายชิ้นวุ้นลงไปวางบนอาหาร NA ที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ใช้ชิ้นวุ้นอาหาร NA เป็นกรรมวิธีควบคุม ส่วนเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (3 ไอโซเลต: PR5-1, CN2-1 และ NB7-7) นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Sucrose peptone agar (SPA) โดยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมเป็นเชื้อแขวนลอย ความเข้มข้น OD600 เท่ากับ 0.4 ทำการ pour plate โดยผสมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในอาหาร SPA อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีเชื้อ *Streptomyces*-PR87 หรือ *Bacillus* spp. เจริญอยู่ได้เป็น culture disk และย้ายชิ้นวุ้นลงไปวางบนอาหาร SPA ที่มีเชื้อ ทาด้วยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เจริญอยู่เปรียบเทียบกับชิ้นวุ้นอาหาร NA เป็นกรรมวิธีควบคุม วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดแนวยับยั้ง (clear zone) รอบๆ ชิ้นวุ้นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ แล้วนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยโปรแกรม SAS

4. ทดสอบศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Dual culture bioassay

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนที่ไม่ก่อโรคให้กับพืชและมีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จำนวน 12 ไอโซเลต (Af1, Af11, Af13, Af18, Af20, Af21, Af25, Tg14, Tg15, Tg18, Tg24 และ Tg31) และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces*-PR87 และเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 9 ไอโซเลต (*Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-BS, *Bacillus*-

PSK, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Bi1, *Bacillus*-KU01, *Bacillus*-KU02, และ *Bacillus*-KU03) โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี Streak plate เชื้อ *Streptomyces*-PR87 เลี้ยงบนอาหาร Arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน 12 ไอโซเลต และเชื้อ *Bacillus* 9 ไอโซเลต เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

นำเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Rhizoctonia solanai*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris oryzae และ Alternaria padwickii* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ย้ายไปวางบนอาหาร PDA จานใหม่ โดยวางให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ด้านตรงข้ามกับเชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน หรือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces*-PR87 หรือ เชื้อ *Bacillus* spp. ที่วางห่างกัน 5 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ที่วางชิ้นวุ้นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแทนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดความยาวของรัศมีเส้นใยเชื้อราที่เจริญออกมาในกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีทดสอบ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (percent inhibition of radial growth; PIRG) = รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในชุดควบคุม – รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ / รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในชุดควบคุม x 100 จากนั้นนำเส้นใยมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเปรียบเทียบกับเส้นใยเชื้อราในกรรมวิธีควบคุม

5. ศึกษาความเข้ากันได้ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธี Dual culture bioassay

นำเชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนที่ผ่านการคัดเลือกคุณสมบัติด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและไม่ก่อโรคให้กับพืชมาทำการทดสอบความเข้ากันได้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces*-PR87 และเชื้อ *Bacillus* spp. โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA โดยวิธี Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Streptomyces*-PR87 เลี้ยงบนอาหาร AGMA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็นเชื้อแขวนลอยความเข้มข้น OD600 = 0.1 ใช้ cotton bud นึ่งฆ่าเชื้อ จุ่มสารแขวนลอยเชื้อให้เปียกชุ่ม แล้วนำไปทาลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่เตรียมไว้ใช้ในการทดสอบ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีเชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน, เชื้อ *Streptomyces*-PR87 หรือ *Bacillus* spp. เจริญอยู่ได้เป็น culture disk และย้ายชิ้นวุ้นลงไปวางบนอาหาร NA ที่ทาด้วยเชื้อเป้าหมาย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตแนวยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ ชิ้นวุ้น มีเกณฑ์ในการประเมินผลคือ 1) เชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนชิ้นวุ้นมีการปล่อยสารทุติยภูมิยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารรอบๆ ชิ้นวุ้นอย่างชัดเจนสังเกตเห็นเป็นวงใส แทนด้วยเครื่องหมาย - คือ อยู่ร่วมกันไม่ได้ , 2) เชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนชิ้นวุ้นมีการปล่อยสารทุติยภูมิยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารรอบๆ ชิ้นวุ้นไม่ชัดเจน แทนด้วยเครื่องหมาย - /+ คือ อยู่ร่วมกันได้ดีระดับหนึ่ง และ 3) เชื้อแบคทีเรียบนชิ้นวุ้นไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารรอบๆชิ้นวุ้น แทนด้วยเครื่องหมาย + คือ เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถอาศัยอยู่ร่วมกันได้ดีมาก

ผลการศึกษา

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากปุ๋ยมูลไส้เดือน

1.1 การแยกเชื้อจากปุ๋ยมูลไส้เดือน

ผลการแยกเชื้อจากปุ๋ยมูลไส้เดือนพบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 54 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากมูลไส้เดือนสายพันธุ์ African night crawler จำนวน 25 ไอโซเลต (ประกอบด้วยเชื้อแกรมบวก 9 ไอโซเลต และเชื้อแกรมลบ 16 ไอโซเลต) และเชื้อที่แยกได้จากมูลไส้เดือนสายพันธุ์ Tiger จำนวน 29 ไอโซเลต (ประกอบด้วยเชื้อแกรมบวก 13 ไอโซเลต และเชื้อแกรมลบ 16 ไอโซเลต) ซึ่งเชื้อทุกไอโซเลตที่แยกได้เมื่อนำมาศึกษาลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่ามีลักษณะโคโลนีและสีที่แตกต่างกัน (**Figure 1, 2 และ Table1**)

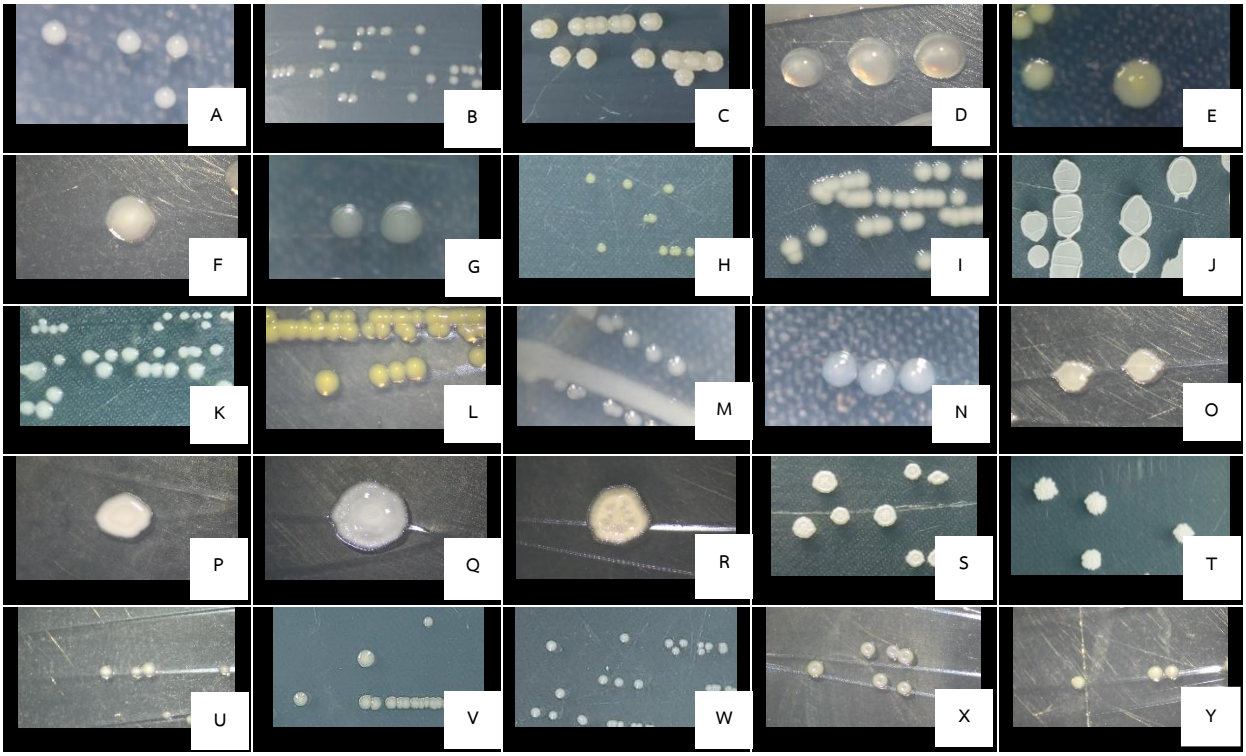


Figure 1 Colony type of 25 isolated bacteria from vermicompost- African night crawler.
(A) Af1, (B) Af2, (C) Af3, (D) Af4, (E) Af5, (F) Af6, (G) Af7, (H) Af8, (I) Af9, (J) Af10, (K) Af11, (L) Af13, (M) Af14, (N) Af16, (O) Af17, (P) Af18, (Q) Af20, (R) Af21, (S) Af22, (T) Af23, (U) Af25, (V) Af26, (W) Af29 (X) Af30 and (Y) Af31

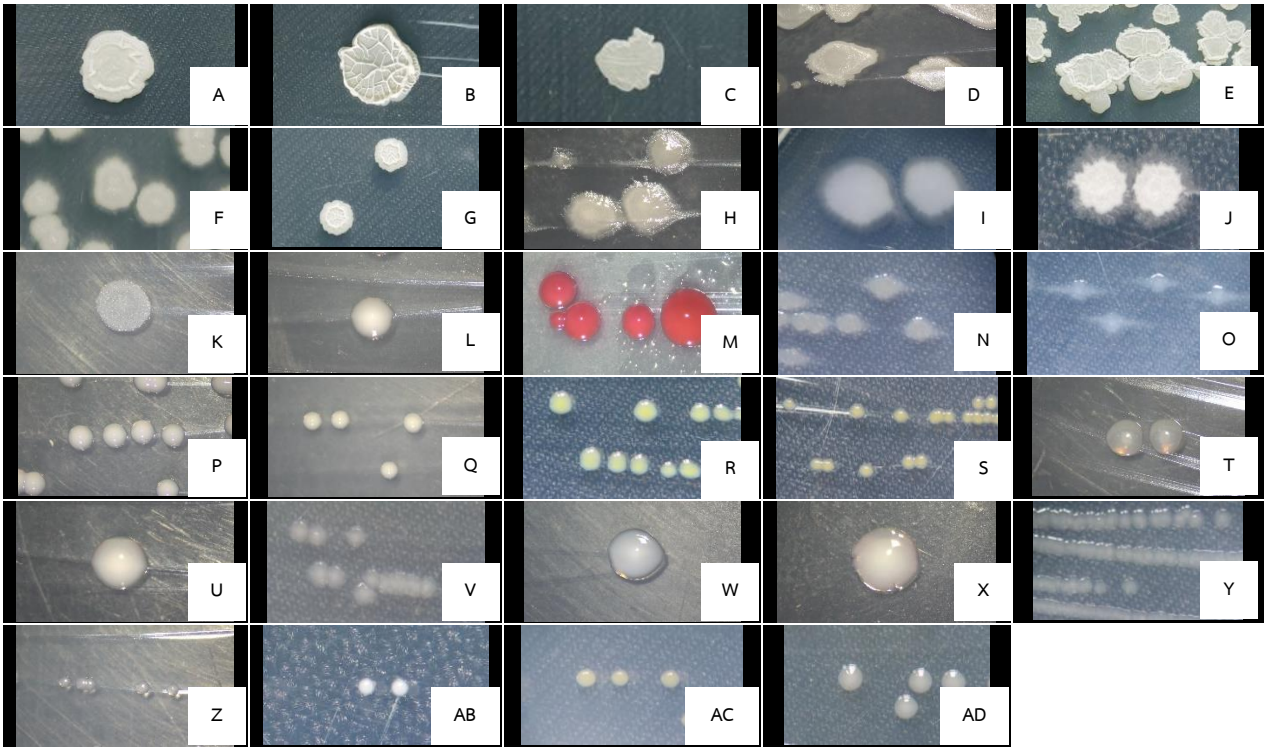


Figure 2 Colony type of 29 isolated bacteria from Tiger strain.
(A) Tg2, (B) Tg3, (C) Tg4, (D) Tg5, (E) Tg6, (F) Tg7, (G) Tg8, (H) Tg9, (I) Tg11, (J) Tg12, (K) Tg13, (L) Tg14, (M) Tg15, (N) Tg16, (O) Tg17, (P) Tg18, (Q) Tg19, (R) Tg22, (S) Tg23, (T) Tg24, (U) Tg26, (V) Tg28, (W) Tg29, (X) Tg30, (Y) Tg31, (Z) Tg32, (AB) Tg33, (AC) Tg34 and (AD) Tg35

1.2 การพิสูจน์การเกิดโรคกับพืช

เมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนทั้งหมดมาพิสูจน์การเกิดโรคกับพืชโดยการปลูกเชื้อบนใบข้าวด้วยวิธีตัดใบ (Clipping method) เมื่อข้าวมีอายุ 21 วันหลังงอก พบว่า เชื้อจากปุ๋ยมูลไส้เดือนทุกไอโซเลตไม่ก่อโรคบนใบข้าว หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี disease control (เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*) และกรรมวิธีควบคุม (น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ) และเมื่อพิสูจน์การเกิดโรคกับพืชโดยการปลูกเชื้อบนใบมะเขือเทศซึ่งใช้เป็นตัวแทนของพืชใบเลี้ยงคู่ด้วยวิธีอัดใบ (Infiltration method) เมื่อต้นมะเขือเทศมีใบจริง 3-4 คู่ พบว่า เชื้อทุกไอโซเลตไม่ก่อโรคบนใบมะเขือเทศหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี disease control (เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*) และกรรมวิธีควบคุม (น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ) **(Figure 3, Table1)**

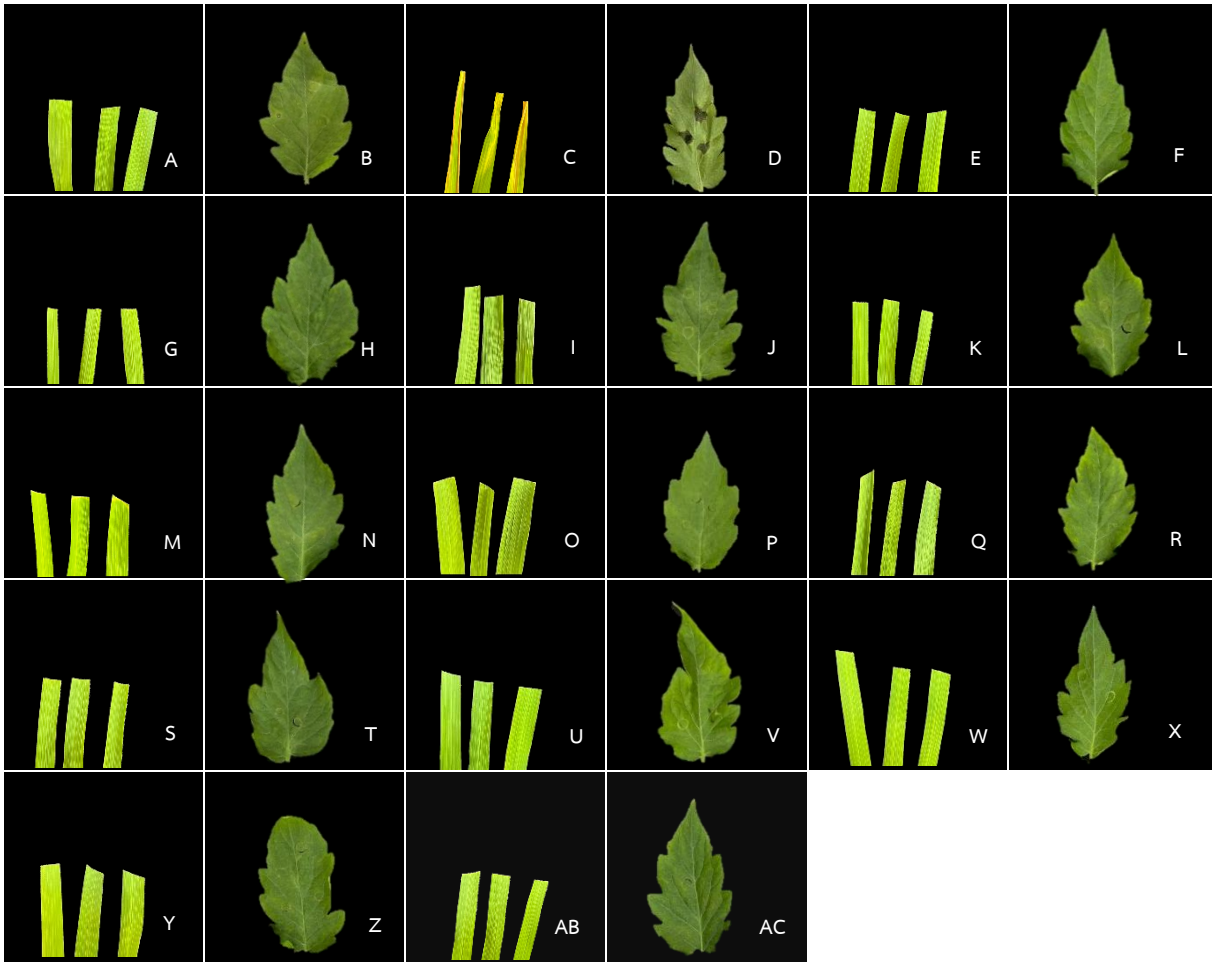


Figure 3 Pathogenicity test of some bacteria isolated from vermicompost on rice and tomato leaves after artificial inoculation by leaf cutting for rice and leaf infiltration for tomato compared with sterile distilled water.

(A) - (B) Control treatment, (C) - (D) *X. oryzae*, (E) - (F) Af1, (G) - (H) Af11, (I) - (J) Af13, (K) - (L) Af18, (M) - (N) Af20, (O) - (P) Af21, (Q) - (R) Af25, (S) - (T) Tg14, (U) - (V) Tg15, (W) - (X) Tg18, (Y) - (Z) Tg24 and (AB) - (AC) Tg31

2. การประเมินคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2.1 การตรวจสอบการสังเคราะห์ IAA

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนทั้ง 54 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ IAA พบว่า เชื้อทุกไอโซเลตสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ โดยปริมาณ IAA ที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณตั้งแต่ 0.77-38.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไอโซเลตที่สามารถสังเคราะห์ IAA ได้มากที่สุด คือ Af13 เท่ากับ 38.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Tg24 และ Af4 เท่ากับ 34.42 และ 22.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่สังเคราะห์ IAA ได้น้อยที่สุด คือ Tg19 สังเคราะห์ IAA ได้ 0.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร **(Table 1)**

2.2 การตรวจสอบกิจกรรมการละลายฟอสเฟต

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนทั้ง 54 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต พบว่ามีเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลต ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ได้แก่ Af1, Af11, Af18, Tg14 และ Tg15 โดยไอโซเลต Tg15 มีค่า

solubilization index (S.I.) สูงที่สุด เท่ากับ 2.73 รองลงมา คือ ไอโซเลต Af1 และ Tg14 มีค่า solubilization index (S.I.) เท่ากับ 2.13 และ 2.11 ตามลำดับ **(Table 1)**

จากผลการประเมินคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งในส่วนของความสามารถในการสังเคราะห์ IAA และความสามารถในการละลายฟอสเฟต จึงได้คัดเลือกเชื้อทั้งหมด 12 ไอโซเลต ได้แก่ Af1, Af11, Af13, Af18, Af20, Af21, Af25, Tg14, Tg15, Tg18, Tg24 และ Tg31 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีคุณสมบัติทั้งสองส่วน หรือ มีส่วนใดส่วนหนึ่งที่อยู่ในเกณฑ์ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความแตกต่างในทางสถิติ **(Table 1)** มาทำการศึกษาต่อไปในส่วนของความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช

Table 1 Type of gram, pathogenicity test on rice and tomato leaves and capability for IAA synthesis and phosphate solubilization of selected antagonistic bacteria and bacteria isolated from vermicompost

Isolates	Gram type	IAA production (µg/ml)[1/]	Phosphate solubilization index (PSI)[1/]
Streptomyces-PR87(positive control)	+	15.02±1.88^{defg}	2.04±0.02^{c}
Bacillus-MS4	+	4.99±0.48hi	1.00±0.00^{f}
Bacillus-PSK	+	8.87±0.56efghi	1.00±0.00^{f}
Bacillus-Ba029	+	3.74±0.49hi	1.00±0.00^{f}
Bacillus-BS	+	2.45±0.38hi	1.00±0.00^{f}
Bacillus-NTS3	+	3.15±0.62hi	1.00±0.00^{f}
Bacillus-Ba1	+	2.15±0.10hi	1.00±0.00^{f}
Bacillus-K01	+	5.23±0.63hi	1.00±0.00^{f}
Bacillus-K02	+	4.76±0.36hi	1.00±0.00^{f}
Bacillus-K03	+	2.94±0.16hi	1.00±0.00^{f}
Af1	-	2.53±0.36hi	2.13±0.11^{b}
Af2	-	4.34±0.38hi	1.00±0.00^{f}
Af3	-	3.94±0.71hi	1.00±0.00^{f}
Af4	-	22.06±1.21^{cd}	1.00±0.00^{f}
Af5	-	4.84±0.45^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af6	-	3.43±0.29^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af7	-	15.48±1.26^{def}	1.00±0.00^{f}
Af8	+	4.59±0.37^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af9	-	10.03±0.64^{efgh}	1.00±0.00^{f}
Af10	+	2.79±0.46^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af11	-	17.56±6.90^{de}	1.53±0.01^{d}
Af13	-	38.41±0.93^{a}	1.00±0.00^{f}
Af14	-	6.30±0.33^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af16	-	3.19±0.56^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af17	+	2.39±0.45^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af18	+	2.39±0.34^{hi}	1.26±0.01^{e}
Af20	+	2.86±0.32^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af21	+	2.69±1.02^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af22	+	3.10±0.51^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af23	+	1.52±0.32^{hi}	1.00±0.00^{f}
Af25	-	34.44±1.88^{ab}	1.00±0.00^{f}

Table 1 Type of gram, pathogenicity test on rice and tomato leaves and capability for IAA synthesis and phosphate solubilization of selected antagonistic bacteria and bacteria isolated from vermicompost. (Continue)

Isolates	Gram type	IAA production (µg/ml)[1/]	Phosphate solubilization index (PSI)[1/]
Af26	-	7.79±0.75^{fghi}	ND
Af29	-	17.29±2.62^{de}	ND
Af30	+	1.86±0.54^{hi}	ND
Af31	-	4.57±0.91^{hi}	ND
Tg2	+	1.85±0.36^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg3	+	2.80+0.18^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg4	+	2.17+0.39^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg5	+	3.06+0.25^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg6	+	2.16+0.47^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg7	+	1.80±0.59^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg8	+	2.14±0.37^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg9	+	4.01±0.40^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg11	+	3.00±0.11^{hi}	ND
Tg12	+	3.74±0.77^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg13	+	2.57±0.70^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg14	-	2.81±0.29^{hi}	2.11±0.03^{b}
Tg15	-	2.81±0.32^{hi}	2.73±0.04^{a}
Tg16	-	1.64±0.25^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg17	-	5.10±0.61^{hi}	ND
Tg18	-	6.15±0.46^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg19	-	0.77±0.05^{i}	1.00±0.00^{f}
Tg22	+	2.44±0.21^{hi}	ND
Tg23	-	5.45±0.55^{hi}	ND
Tg24	-	34.42±7.78^{ab}	ND
Tg26	-	4.46±0.44^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg28	-	3.37±0.31^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg29	-	6.48±0.14^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg30	-	3.46±0.31^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg31	-	29.54±1.61^{bc}	1.00±0.00^{f}
Tg32	-	3.17±0.48^{hi}	1.00±0.00^{f}
Tg33	+	3.17±0.19^{hi}	ND
Tg34	-	4.77±0.45^{hi}	ND
Tg35	-	3.87±0.67^{hi}	1.00±0.00^{f}
C.V. (%)		22.26	1.62
F-test		**	**

[1/]Means in a same column followed by the different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P<0.01,**)

ND; not determined

3. การทดสอบศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Dual culture bioassay

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนจำนวน 12 ไอโซเลตนำมาทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อปฏิปักษ์ที่ได้รับการอนุเคราะห์ 10 ไอโซเลต พบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลตจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาเปรียบเทียบเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้กว้างขวางทั้ง 9 ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่นำมาทดสอบ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุด คือ *Bacillus*-Ba029 มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ไอโซเลต NB7-7, CN2-1, PR5-1, *X. axonopodis* pv. *citri, X. euvesicatoria* -toxan, *R. solanacearum*, *Pseudomonas* sp. และ *A. citrulli* -WM001 เท่ากับ 20.42, 23.93, 25.42, 28.38, 29.96, 17.67, 6.25 และ 24.29 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือ *Bacillus*-MS4 มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ไอโซเลต NB7-7, CN2-1, PR5-1, *X. axonopodis* pv.*citri*, *X. euvesicatoria* -toxan, *R. solanacearum*, *Pseudomonas* sp. และ *A. citrulli* -WM001 เท่ากับ 21.58, 21.37, 19.51, 25.88, 24.50, 13.84, 3.17 และ 15.13 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช *P. carotovorum* นั้น เชื้อ *Bacillus*-BS สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด เท่ากับ 15.45 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Bacillus*-MS4 ยับยั้งการเจริญได้ เท่ากับ 14.29 มิลลิเมตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนมี 11 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้แตกต่างกัน ได้แก่ Af1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* เท่ากับ 18.63 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับ *Bacillus*-Ba029 แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นได้, Af13, Af18 และ Af21 สามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. euvesicatoria* -toxan และ *R. solanacearum* ได้, Af20 สามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. euvesicatoria*-toxan ได้ Af25, Tg15, Tg18 และ Tg31 สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้ Tg14 สามารถยับยั้งเชื้อ *X. euvesicatoria* -toxan และ *R. solanacearum* ได้ และ Tg24 สามารถยับยั้งเชื้อ *X. citri*, *R. solanacearum* และ *A. citrulli* -WM001 ได้ **(Table 2)**

4. การทดสอบศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Dual culture bioassay

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมด จำนวน 22 ไอโซเลต พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 6 สกุล อย่างชัดเจนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยมูลไส้เดือน 12 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้เพียงบางสกุลเท่านั้น ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้กว้างมากทั้ง 6 สกุลได้ดีที่สุด คือ *Bacillus*-MS4 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani*, *C. lunata*, *Fusarium* sp., *C. gloeosporioides*, *B. oryzae* และ *A. padwickii* เท่ากับ 55.54, 70.03, 57.40, 55.28, 67.08 และ 61.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อประเมินที่เวลา 14 วัน หลังการทดสอบ **(Table 3)** ส่วนเชื้อจากปุ๋ยมูลไส้เดือนไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้บางสกุล และอยู่ระดับที่ต่ำกว่าความสามารถในการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบ ได้แก่ ไอโซเลต Af13, Af18 และ Tg24 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ หรือ ไอโซเลต Af1 และ Af13 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ เป็นต้น **(Table 3)**

Table 2 Efficacy of antagonistic bacteria to inhibit the growth of *X. oryzae pv.* oryzae (NB7-7, CN2-1, PR5-1), *X. citri, X. euvesicatoria* -toxan, *R. Solanacearum*, *Pseudomonas* sp., *A. citrulli* -WM001 and *P. carotovorum* as assayed by dual culture bioassay method, measured after incubation at 28 ºC for 48 hr.

Antagonists	Clear zone (mm)[1/]								
	X. oryzae pv. *oryzae*			*X. citri*	*X. euvesicatoria* (toxan)	*R. solanacearum*	*Pseudomonas* sp.	*A. citrulli* (WM001)	*P. carotovorum*
	NB7-7	CN2-1	PR5-1						
Streptomyces-PR87	12.69±0.81^{f}	10.64±0.46^{e}	16.05±0.53^{d}	16.09±0.59^{c}	15.92±0.14^{d}	12.50±0.90^{bc}	0.92±0.07^{d}	12.79±0.91^{c}	12.30±1.17^{d}
Bacillus-MS4	21.58±1.77^{a}	21.37±4.67^{ab}	19.5±0.03^{ac}	25.88±1.69^{ab}	24.50±0.63^{c}	13.84±3.34^{bc}	3.17±0.29^{c}	15.13±1.89^{c}	14.29±1.12^{b}
Bacillus-PSK	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	3.13±0.55^{i}	4.54±0.61^{ij}	2.34±1.63^{hi}	0.00±0.00^{e}	3.71±0.14^{e}	0.00±0.00^{e}
Bacillus-Ba029	20.42±1.09^{ab}	23.93±1.61^{a}	25.42±0.26^{a}	28.38±3.03^{a}	29.96±0.92^{a}	17.67±0.83^{a}	6.25±0.90^{a}	24.29±6.66^{a}	12.76±0.63^{cd}
Bacillus-BS	18.73±0.18^{cd}	17.10±0.49^{cd}	24.37±2.14^{b}	24.13±1.65^{b}	25.71±1.20^{bc}	13.38±1.97^{bc}	4.46±0.94^{b}	14.00±0.98^{c}	15.45±1.13^{a}
Bacillus-NTS3	16.42±1.09^{e}	23.60±4.32^{a}	21.29±1.13^{b}	27.04±3.94^{a}	26.79±0.69^{b}	15.63±2.22^{ab}	4.38±1.11^{b}	19.80±2.32^{b}	13.28±0.38^{c}
Bacillus-Bi1	19.63±3.00^{bc}	19.08±3.49^{bc}	25.39±3.86^{a}	27.00±2.14^{a}	24.75±0.54^{c}	12.75±2.08^{bc}	4.13±0.70^{b}	15.38±1.19^{c}	12.96±0.34^{cd}
Bacillus-K01	5.79±0.39^{h}	0.00±0.00^{g}	4.70±0.15^{f}	10.92±1.91^{ef}	8.92±1.13^{fg}	2.54±1.81^{ghi}	0.00±0.00^{e}	3.88±1.11^{e}	0.00±0.00^{e}
Bacillus-K02	5.92±1.71^{h}	0.00±0.00^{g}	4.02±0.54^{f}	12.54±1.49^{de}	11.29±1.16^{e}	5.75±1.96^{efg}	0.00±0.00^{e}	4.42±0.84^{e}	0.00±0.00^{e}
Bacillus-K03	8.20±1.61^{g}	12.06±2.14^{e}	7.06±0.01^{e}	14.71±0.40^{cd}	9.08±1.77^{f}	4.79±3.11^{fgh}	0.00±0.00^{e}	7.38±0.33^{d}	0.00±0.00^{e}
Af1	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{k}	18.63±0.21^{a}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Af11	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{k}	0.00±0.00^{i}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Af13	0.00±0.00^{j}	2.66±0.26^{fg}	0.00±0.00^{g}	6.08±0.14^{h}	3.33±0.63^{j}	7.33±0.76ef	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Af18	16.34±1.63^{e}	0.00±0.00^{g}	16.22±0.48^{d}	7.46±3.24^{gh}	6.21±3.72^{hi}	9.00±1.95^{de}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Af20	17.76±0.51^{cd}	15.05±0.09^{d}	15.68±0.17^{d}	5.92±0.19^{h}	6.46±0.19^{h}	0.00±0.00^{i}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Af21	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	8.63±1.64^{fg}	7.25±0.90^{gh}	2.17±0.76^{hi}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Af25	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{k}	4.17±1.88^{fgh}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Tg14	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{j}	3.25±0.25^{j}	12.83±3.11^{bc}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Tg15	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{k}	11.08±5.13^{cd}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Tg18	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{k}	12.00±2.63^{cd}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Tg24	4.12±0.13^{i}	4.11±1.42^{f}	0.00±0.00^{g}	7.42±0.14^{gh}	0.00±0.00^{k}	5.33±0.38^{fgh}	0.00±0.00^{e}	5.50±0.25^{de}	0.00±0.00^{e}
Tg31	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{k}	5.88±0.66^{efg}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
Control	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{k}	0.00±0.00^{i}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}
c.v. (%)	12.25	18.66	10.28	15.41	11.22	25.11	37.74	29.74	12.36
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**

[1/]Means in a same column followed by the different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P<0.01,**)

Table 3 Efficacy of antagonistic bacteria to inhibit the mycelial growth of *R. solanai*, *C. lunata*, *Fusarium* sp., *C. gloeosporioides*, *B. oryzae* and *A. padwickii* by dual culture bioassay on PDA, measured after incubation at 28 °C for 14 days

Antagonists	Inhibition of mycelium growth (%)[1/] of pathogenic fungi					
	R. solani	*C. lunata*	*Fusarium sp.*	*C. gloeosporioides*	*B. oryzae*	*A. padwickii*
Streptomyces-PR87	0.00±0.00^{g}	34.82±4.55^{g}	25.79±1.42^{fg}	14.50±2.21^{g}	49.49±4.34^{d}	34.34±8.51^{c}
Bacillus-MS4	55.36±1.95^{a}	70.03±0.08^{a}	57.40±3.95^{a}	55.28±1.22^{a}	67.08±1.57^{abc}	61.94±1.31^{a}
Bacillus-PSK	0.00±0.00^{g}	25.93±0.32^{i}	26.10±2.25^{f}	8.90±2.61^{h}	1.99±4.45^{ij}	0.00±0.00^{k}
Bacillus-Ba029	42.05±2.73^{bc}	65.32±1.98^{c}	53.76±0.65^{ab}	44.65±2.26^{bc}	68.47±2.63^{ab}	53.45±2.11^{b}
Bacillus-BS	44.47±0.52^{b}	66.62±1.75^{bc}	49.37±1.77^{c}	43.40±2.70^{c}	72.38±2.95^{a}	64.77±2.05^{a}
Bacillus-NTS3	43.33±0.37^{b}	65.34±0.76^{c}	52.41±1.98^{bc}	46.79±2.78^{b}	69.70±2.98^{ab}	62.75±1.98^{a}
Bacillus-Bi1	39.90±0.27^{c}	69.02±0.88^{ab}	52.98±2.90^{bc}	45.84±2.07^{bc}	69.09±5.37^{ab}	62.72±2.53^{a}
Bacillus-K01	0.00±0.00^{g}	13.58±2.31^{k}	39.98±6.11^{d}	17.58±1.21^{fg}	47.69±4.82^{d}	23.08±2.02^{e}
Bacillus-K02	0.00±0.00^{g}	15.98±3.84^{k}	39.44±3.07^{d}	24.85±8.11^{d}	45.59±7.10^{de}	26.31±1.68^{de}
Bacillus-K03	0.00±0.00^{g}	40.22±3.27^{f}	40.16±3.88^{d}	20.83±4.09^{ef}	30.47±1.82^{g}	26.72±2.60^{d}
Af1	0.00±0.00^{g}	51.19±3.55^{d}	13.81±1.17^{hi}	22.15±1.75^{de}	5.43±4.44^{ij}	2.02±1.80^{ijk}
Af11	0.00±0.00^{g}	50.95±2.50^{d}	8.57±7.93^{jk}	1.43±1.81ij	6.20±5.76^{i}	0.00±0.00^{k}
Af13	43.81±3.21^{b}	45.48±3.55^{e}	0.95±1.48^{mn}	25.00±4.40^{d}	36.73±9.16^{f}	11.73±2.79^{g}
Af18	39.76±8.15^{c}	52.14±4.67^{d}	7.62±2.66^{jkl}	1.19±1.90^{ij}	48.73±3.15^{d}	17.01±4.88^{f}
Af20	0.00±0.00^{g}	37.38±5.53^{fg}	6.90±0.58^{kl}	0.00±0.00^{j}	49.78±3.30^{d}	25.08±2.75^{de}
Af21	8.09+1.48^{f}	29.76±2.62^{h}	8.10±2.33^{jk}	0.00±0.00^{j}	61.72±2.90^{c}	5.25±3.25^{hi}
Af25	0.00±0.00^{g}	1.67±1.90^{l}	4.29±0.90^{lm}	1.19±1.41^{ij}	4.92±3.78^{ij}	4.04±2.95^{hij}
Tg14	0.00±0.00^{g}	22.15±1.20^{j}	11.19±2.46^{ij}	4.29±6.70^{i}	64.43±3.55^{bc}	1.61±1.95^{jk}
Tg15	18.57±5.99^{e}	35.95±2.29^{g}	34.52±3.77^{e}	1.67±1.90^{ij}	38.64±3.43^{f}	2.84±2.83^{hijk}
Tg18	0.00±0.00^{g}	46.90±3.77^{e}	7.62±1.17^{jkl}	0.00±0.00^{j}	24.58±4.60^{h}	12.54±1.70^{g}
Tg24	35.34±0.73^{d}	0.00±0.00^{l}	15.72±3.38^{h}	0.00±0.00^{j}	46.72±3.58^{de}	6.06+4.56^{h}
Tg31	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{l}	22.38±5.16^{g}	0.00±0.00^{j}	41.32±13.52^{ef}	11.72+2.75^{g}
control	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{l}	0.00±0.00^{n}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{j}	0.00±0.00^{k}
c.v. (%)	14.59	7.55	12.84	17.93	12.28	13.52
F-test	**	**	**	**	**	**

[1/]Means in a same column followed by the different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P<0.01,**)

5. ศึกษาความเข้ากันได้ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธี Dual culture bioassay

นำเชื้อที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนที่ผ่านการคัดเลือกคุณสมบัติด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและไม่ก่อโรคให้กับพืชจำนวน 12 ไอโซเลต มาทดสอบความเข้ากันได้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้ ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029 และ *Bacillus*-PSK พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนไอโซเลต Af11 สามารถเจริญได้ดี

เข้ากันได้ดีมากกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลตคือ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029 และ แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโต *Bacillus*-PSK เมื่อวิเคราะห์โดยพิจารณาจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาเปรียบเทียบเป็นหลัก พบว่า *Streptomyces*-PR87 ยับยั้งเชื้อ Af18, Af20, Af21, และ Tg31 แต่สามารถอยู่ร่วมกับเชื้อ *Bacillus*-PSK, Af1, Af11, Af13, Af25, Tg14, Tg15 และ Tg24 ได้ดีมาก และสามารถอยู่ร่วมได้ระดับหนึ่งกับ *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029, และ Tg18 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*-MS4 ยับยั้งเชื้อ Af20, Af21, Tg14, Tg24 และ Tg31 แต่สามารถอยู่ร่วมกับเชื้อ *Bacillus*-Ba029, Af11 และ Af13 ได้ดีมาก และอยู่ร่วมกันได้ระดับหนึ่งกับเชื้อ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-PSK, Af1, Af18, Af25, Tg15 และ Tg18 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*-Ba029 ยับยั้งเชื้อ Af18, Af20, Af25, Tg14 และ Tg31 แต่สามารถอยู่ร่วมกับเชื้อ *Bacillus*-MS4 และ Af11 ได้ดีมาก ส่วนการอยู่ร่วมกับเชื้อ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-PSK, Af1, Af13, Af21, Tg14, Tg15, Tg18 อยู่ได้ดีในระดับหนึ่ง เชื้อ *Bacillus*-PSK ใช้ร่วมกันไม่ได้กับเชื้อไอโซเลต Af18, Af21 แต่เจริญได้ดีมากกับเชื้อ *Streptomyces*-PR87, Af1, Af11, Af25, Tg14, Tg15, Tg24 และ Tg31 และเจริญได้ดีระดับหนึ่งเมื่ออยู่ร่วมกับ *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029, Af13, Af18, Af20 และ Tg18 **(Table 4)**

Table 4 Result for compatibility test among selected antagonistic bacteria and bacteria isolated from vermicompost according to dual culture bioassay

Isolate of antagonistic bacterial on culture lawn	Isolate of antagonistic bacteria and bacteria from vermicompost on culture disc															
	ST87	MS4	Ba029	PSK	Af1	Af11	Af13	Af18	Af20	Af21	Af25	Tg14	Tg15	Tg18	Tg24	Tg31
ST87		-/+	-/+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+	-/+	+	-
MS4	-/+		+	-/+	-/+	+	+	-/+	–	–	-/+	–	-/+	-/+	-	-
Ba029	-/+	+		-/+	-/+	+	-/+	–	–	-/+	–	-/+	-/+	-/+	-	-
PSK	+	-/+	-/+		+	+	-/+	–	-/+	–	+	+	+	-/+	+	+

Note: – mean incompatible (the bacteria on culture disc strongly inhibited the bacteria on culture lawn)

-/+ mean partial compatible (the bacteria on culture disc slightly inhibited the bacteria on culture lawn)

\+ mean fully compatible (the bacterial on culture disc did not inhibit the bacteria on culture lawn)

สรุปและวิจารณ์

เชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยมูลไส้เดือนทั้งจาก African night crawler และ Tiger มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จากที่นำมาทดสอบ 54 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคให้กับพืชทดสอบ(ข้าวและมะเขือเทศ) มีคุณสมบัติที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เมื่อประเมินความสามารถในการสร้าง IAA หรือ การละลายฟอสเฟตในระดับห้องปฏิบัติการได้มากน้อยแตกต่างกันไปตามไอโซเลตของเชื้อ พบว่า ไอโซเลต Af11 เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้บางชนิด (*C. lunata, Fusarium* sp., *C. gloeosporioides* และ *B. oryzae*) และมีความโดดเด่นในการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อประเมินจากความสามารถในการสังเคราะห์ IAA (17.56 µg/ml) และละลายฟอสเฟตได้ดีมาก (1.53 PSI.) อีกทั้งยังสามารถอยู่ร่วมกันกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029 และ *Bacillus*-PSK ได้ดี ซึ่งจากการจำแนกชนิดเบื้องต้นของ Af11 โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16 S rDNA จำแนกชนิดเป็น *Enterobacter cloaca* (ข้อมูลไม่ได้แสดง) โดย *E. cloaca* มีรายงานการนำไปใช้ควบคุมโรคพืชและส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชหลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวเขียวในมันฝรั่งเมื่อใช้ร่วมกับ *Trichoderma asperellum* (Mohammad et al., 2020) โรคโคนเน่าของมะเขือเทศ (Yuliar et al., 2019) โรคเหี่ยวฟิวซาเรียมในสปิแนช (Fusarium wilt of spinach) (Tsuda et al., 2001) เป็นต้น จึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้พัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อผสมชุมชนแบคทีเรีย ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้กว้างขวางทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญได้หลายชนิด ทำให้พืช

เจริญเติบโตได้ดีมากขึ้น และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำแร่ธาตุฟอสฟอรัสที่อยู่ในดินให้พืชเอาไปใช้ได้มากขึ้นโดยผ่านกลไกการทำงานของเชื้อ Af11 นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยมูลไส้เดือนดินไอโซเลตอื่นๆ ที่มีศักยภาพสูงในทดสอบครั้งนี้คือ Af1, Af13 , Tg15 (จำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16 S rDNA ระบุเป็น *Serratia nematophila* ,ข้อมูลไม่ได้แสดง), Af25 ซึ่งจำแนกชนิดเป็น *Empedobacter brevis* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16 S rDNA (ข้อมูลไม่ได้แสดง), และ Tg18 ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มชีวภัณฑ์พีจีพีบี (PGPB=plant growth promoting bacteria) ในลักษณะเชื้อเดี่ยวๆ หรือ ใช้ในแบบชุมชนแบคทีเรียร่วมกันกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้คัดเลือกไว้ (*Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029 หรือ *Bacillus*-PSK) ตามผลการทดสอบ combination เพื่อเอาไว้เสริมกำลังในการผลิตพืชแบบปลอดภัยหรือแบบอินทรีย์ต่อไปได้ ชีวภัณฑ์แบบชุมชนแบคทีเรียที่พัฒนาขึ้นมาจากไอโซเลตแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาอย่างดีในการวิจัยนี้ร่วมกับแบคทีเรียพีจีพีบีจากปุ๋ยมูลไส้เดือนดินและผ่านขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแต่ละไอโซเลตและของชีวภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นกับต้นพืชจริงทั้งในระดับกระถางปลูกในโรงเรือนปลูกพืชทดลองและแปลงปลูกแล้วนั้นจะมีข้อดีกว่าการใช้ปุ๋ยมูลไส้เดือนแบบโดยตรงคือ ชีวภัณฑ์แต่ละล็อตที่ผลิตขึ้นมาจะมีชนิดเชื้อแบคทีเรียที่ทราบคุณสมบัติแล้วเป็นส่วนประกอบหลักที่ชัดเจน มีปริมาณที่แน่นอนตามสูตรที่พัฒนาขึ้น ในขณะที่ปุ๋ยมูลไส้เดือนดินแต่ละล็อตที่ผลิตได้จะมีความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อพีจีพีบีที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของไส้เดือนดินและวัตถุดิบที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนดิน การใช้ชีวภัณฑ์แบบชุมชนแบคทีเรียและชีวภัณฑ์กลุ่มพีจีพีบีที่จะพัฒนาขึ้นมาใหม่จากงานวิจัยนี้ จะมีความโดดเด่นมากขึ้น แม่นยำมากยิ่งขึ้นในการควบคุมโรคพืชที่สำคัญทั้งโรคจากเชื้อราและโรคแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจ ลดการใช้สารเคมีที่ใช้ควบคุมโรคพืช และลดการใช้ปุ๋ยเคมี เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ ช่วยทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับดินโดยผ่านกิจกรรมต่างๆ ที่โดดเด่นของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ เพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม สนับสนุนการเกษตรยั่งยืนของประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

จารุพงศ์ ประสพสุข และชุลีมาศ บุญไทย อิวาย. 2556. การติดตามสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในปุ๋ยหมัก ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินและนำหมักชีวภาพจากขยะอินทรีย์. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 32: 154-160.

ปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์, ธิดา เดชฮวบ และวาริน อินทนา. 2561. การประยุกต์ใช้ร่วมกันของผงเชื้อ *Trichoderma* sp. และ *Bacillus* sp. ต่อการควบคุมโรคเมล็ดด่างที่เกิดจาก *Bipolaris oryzae* ในข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 49: 15-26.

วนิดา ชัยชนะ. 2562. ประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของผักบุ้งจีน. เกษตรพระวรุณ. 16: 81-90.

สายชล สุขญาณกิจ, โสภิดา จิวประเสริฐ, วุฒิพงษ์ แปงใจ และธนวรรณ พาณิชพัฒน์. 2564. การเปรียบเทียบคุณภาพของปุ๋ยอินทรีย์สองชนิดต่อผลผลิตข้าวหอมปทุม และสมบัติดิน. แก่นเกษตร. 49: 37-48.

สุลีลัก อารักษณ์ธรรม และสุชาดา สานุสันต์. 2557. อิทธิพลของปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินจากไส้เดือนดิน ต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางฟิสิกส์ดินและการปรับปรุงโครงสร้างของดิน. ใน: รายงานผลการวิจัยโครงการศักยภาพของปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยที่ผลิตจากขยะอินทรีย์ต่อระบบการเกษตรและสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อานัฐ ตันโช, สุลีลัก อารักษณ์ธรรม และสุนิษา นนทธิ. 2560. การศึกษาเทคนิคการเพิ่มอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของสารพิษตกค้างในดินเพื่อลดระยะเวลาการปรับเปลี่ยนสู่ระบบเกษตรอินทรีย์โดยการใช้ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน. ใน: รายงานผลการวิจัยโครงการการจัดการดินและธาตุอาหารพืชเพื่อลดระยะเวลาปรับเปลี่ยนสู่ระบบการผลิตแบบเกษตรอินทรีย์อย่างยั่งยืน. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

เกศกนก วงศ์ชยานันท์. 2562. ผลของปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศเชอรี่. การค้นคว้าอิสระปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์, ปทุมธานี.

Belmeskine, H., W. A. Ouameur, N. Dilmi, and A. Aouabed. 2020. The vermicomposting for agricultural valorization of sludge from Algerian wastewater treatment plant: impact on growth of snap bean *Phaseolus vulgaris* L. Heliyon. 6: e04679.

Benjawan, C., P. Chutichudet, and K. Sela. 2020. Effects of vermicompost on growth and yield of baby pak choi. Journal of Science and Technology Mahasarakham University. 39: 103-112.

Bhusal, B., and M. T. Mmbaga. 2020. Biological control of *Phytophthora* blight and growth promotion in sweet pepper by *Bacillus* species. Biological Control. 150: 104373.

Blomström, A. L., C. Lalander, A.J. Komakech, B. Vinnerås, and S. Boqvist. 2016. A metagenomic analysis displays the diverse microbial community of a vermicomposting system in Uganda. Infection Ecology and Epidemiology. 6: 32453.

Einloft, T. C., S. Hartke, P. B. de Oliveira, P. S. Saraiva, and R. G. Dionello. 2021. Selection of rhizobacteria for biocontrol of *Fusarium verticillioides* on non-rhizospheric soil and maize seedlings roots. European Journal of Plant Pathology. 160: 503-518.

Hoshikawa, K., S. Fujita, N. Renhu, K. Ezura, T. Yamamoto, S. Nonaka, E. Hiroshi, and K. Miura. 2019. Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system. Plant Cell Reports. 38: 75-84.

Kauffman, H. E, R. P. K. Reddy, S. P. Y. Hsieh, and S. D. Merca. 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant disease reporter. 17: 537-541.

Khamna, S., A. Yokota, and S. Lumyong. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25: 649.

Mohamed, B.F.F., N.M.A. Sallam, S.A.M. Alamri, K.M.A. Abo-Elyousr, Y.S. Mostafa, and M. Hashem. 2020. Approving the biocontrol method of potato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) using *Enterobacter cloacae* PS14 and *Trichoderma asperellum* T34. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 30: 61.

Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya. 17: 362-370.

Ramnarain, Y. I., L. Y. D. I. A. Ori, and A. A. Ansari. 2018. Effect of the use of vermicompost on the plant growth parameters of Pak Choi (*Brassica rapa* var. *chinensis*) and on the soil structure in Suriname. Journal of Global Agriculture and Ecology. 8: 8-15.

Rekha, G. S., P. K. Kaleena, D. Elumalai, M. P. Srikumaran, and V. N. Maheswari. 2018. Effects of vermicompost and plant growth enhancers on the exo-morphological features of *Capsicum annum* (Linn.) Hepper. International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture. 7: 83-88.

Santhanam, R., R. C. Menezes, V. Grabe, D. Li, I. T. Baldwin, and K. Groten. 2019. A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. Molecular ecology. 28: 1154-1169.

Solanki, M. K., M. S. Yandigeri, S. Kumar, R. K. Singh, and A. K. Srivastava. 2019. Co-inoculation of different Antagonists can enhance the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. Antonie Van Leeuwenhoek. 112: 1633-1644.

Tsuda, K., Y. Kosaka, S. Tsuge, Y. Kubo, and O. Horino. 2001. Evaluation of the endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 isolated from spinach roots for biological control against Fusarium wilt of spinach. Journal of General Plant Pathology. 67: 78-84.

Wong, C. K. F., N. B. Saidi, G. Vadamalai, C. Y. Teh, and D. Zulperi. 2019. Effect of bioformulations on the biocontrol efficacy, microbial viability and storage stability of a consortium of biocontrol agents against Fusarium wilt of banana. Journal of applied microbiology. 127: 544-555.

Wong, C. K. F., D. Zulperi, N. B. Saidi, and G. Vadamalai. 2021. A Consortium of *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma harzianum* for Improving Growth and Induced Biochemical Changes in Fusarium Wilt Infected Bananas. Tropical Life Sciences Research. 32: 23.

Younas, M., H. Zou, T. Laraib, W. Abbas, M. W., Akhtar, M. N. Aslam, L. Amrao, S. Hayat, T. A. Hamid, A. Hameed, G. A. Kachelo, M.M. Elseehy, A. M. El-ShehawiID, T.K. ZuanID Ali, Y. Li, and M. Arif. 2021. The influence of vermicomposting on photosynthetic activity and productivity of maize (*Zea mays* L.) crop under semi-arid climate. Plos One. 16: e0256450.

Yuliar, S., F. Kartadi, and A. Salmah. 2019. Combined use of *Enterobacter cloacae* MB20 and the microelements of copper and manganese to control damping-off of tomato. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 308: 012025.

Zhang, L. N., D. C. Wang, Q. Hu, X. Q. Dai, Y. S. Xie, Q. Li, and J. H. Guo. 2019. Consortium of plant growth-Promoting rhizobacteria strains suppresses sweet pepper disease by altering the rhizosphere microbiota. Frontiers in Microbiology. 10: 1668.