บทความวิจัย

การคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสในการควบคุมโรคและเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ในฟาร์มข้าวอินทรีย์

อาณัติ ขัตติสะ[1], ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ[1], วีระชัย ตีรอรุณศิริ[2], ตะวัน ห่างสูงเนิน[3] และ สุภัค มหัทธนพรรค[2*]

[1]คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000
[2]ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000
[3]บริษัท ข้าวอินทรีย์ไทย จำกัด อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ 50180

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อที่แยกได้จากดินบริเวณแปลงข้าวอินทรีย์เพื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติในการเป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยคัดเลือกเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท คือ BS3, BA3 และ BL3 ซึ่งเบื้องต้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางเคมีพบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. เชื้อดังกล่าวถูกนำไปตรวจสอบคุณสมบัติในการผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิต Indole acetic acid และการตรึงไนโตรเจน โดยพบว่าไอโซเลท BA3 สามารถผลิต Indole acetic acid และ ไอโซเลท BS3 สามารถในการตรึงไนโตรเจนและผลิตสารปฏิชีวนะได้ในระดับสูง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผลการทดสอบพบว่าไอโซเลท BS3 มีผลต่อการเจริญของข้าวโดยทำให้ข้าวมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และให้ผลผลิตต่อกระถางสูงกว่าชุดควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า และปุ๋ยเคมี

คำสำคัญ: ขาวดอกมะลิ 105 ปุ๋ยชีวภาพ และ บาซิลลัส

*ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: anutkatisa@hotmail.com/ โทร: 088-4005589

Screening of *Bacillus* in Biocontrol and Production of Bio-Fertilizer for use in Organic Rice Farms

Anut Khattisa[1], Khanchai Danmek[1], Werachai Tera arusiri[2], Tawan Hangsoongnern[3] and Supuk Mahadtanapuk[2*]

[1]*School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao, 56000, Thailand*
[2]*Central laboratory University of Phayao, Phayao, 56000, Thailand*
[3]*Thai Organic Rice Company limited, Mae Rim, Chiang Mai, 50180, Thailand*

Abstract

This study was conducted to isolate bacteria from soil in organic rice farm, and evaluate their potential as biofertilizers. Three bacterial isolates (BS3, BA3 and BL3) were isolated. These isolates were studied and found to be *Bacillus* spp. with their colony characteristics and biochemical testing. These isolates were checked for their ability to produce antibiotic, Indole acetic acid, and nitrogen fixation. Isolate BA3 was found to produce maximum amount of Indole acetic acid and BS3 showed higher nitrogen fixation and antibiotic potential. Then, these isolates used for rice (KDML 105) growth testing. The results were indicated that, isolate BS3 had the effect on the growth of rice with high percentage of rice grain filling and higher yield per pot compared with water and chemical fertilizer.

Keywords: Khao Dawk Mali 105, Bio fertilizers and Bacillus

*Corresponding author: E-mail: anutkatisa@hotmail.com/Tel: 088-4005589

บทนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก และประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศที่ส่งออกข้าวที่สำคัญประเทศหนึ่งของโลก เนื่องจากข้าวไทยมีคุณภาพดีจึงเป็นที่ต้องการของตลาดผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศซึ่งในการเพาะปลูกข้าวมีการใช้ปุ๋ยเคมีในการเพาะปลูกมากกว่าพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ ทำให้การใช้ปุ๋ยเคมีเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มผลผลิตของข้าวให้สูงขึ้นของชาวนา (Division of Rice Research and Development, 2004) แต่จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยมีปริมาณการนำเข้าปุ๋ย และสารเคมีกำจัดศัตรูพืชประมาณ 164 ล้านกิโลกรัม แต่ในทางกลับกันปริมาณผลผลิตกลับเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Office of Agricultural Economics, 2016) การใช้ปุ๋ยเคมีเป็นระยะเวลานานมีผลที่ทำให้ดินเสื่อมคุณภาพ และก่อให้เกิดผลเสียในระยะยาว (Sirikul, 2010) การใช้สารเคมีทางการเกษตรนอกจากเป็นต้นทุนทางการเกษตรแล้วยังมีต้นทุนด้านสาธารณสุขที่ตามมาภายหลังที่รัฐบาลต้องใช้งบประมาณในการดูแลจัดการผลกระทบที่เกิดขึ้นทั้งด้านสุขภาพอนามัยและ สิ่งแวดล้อม แล้วยังสูญเสียภาษีที่ควรจะได้รับจากการเติบโตของอุตสาหกรรมสารเคมีเกษตรนี้อีกด้วย แม้ว่าประเทศไทยที่เป็นผู้ส่งออกสินค้าทางการเกษตร และอาหารเป็นอับดับต้นของโลกทำให้ไม่ประสบปัญหาความมั่นคงทางอาหาร แต่มีความเสี่ยงกับความปลอดภัยของอาหาร และความมั่นคงของภาคการเกษตร อันเป็นผลมาจากการใช้ปุ๋ยและสารเคมีทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้น ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกร รวมกับปัญหาอื่นๆ ที่เกิดขึ้นล้วนแต่เป็นภาพเชิงลบของภาคการเกษตรที่เป็นปัจจัยทำให้เกษตรกรรุ่นใหม่ และแรงงานภาคการเกษตรมีแนวโน้มลดลง (Office of Agricultural Economics, 2012)

ปัจจุบันมีเกษตรกรที่ปลูกข้าวส่วนหนึ่งหันมาทำเกษตรแบบไม่ใช้สารเคมี หรือเกษตรอินทรีย์อันเนื่องมาจากปัญหาต้นทุนการผลิตที่ต้องใช้ปุ๋ย และสารเคมีเป็นพิษ และเพื่อแก้ไขปัญหาราคาข้าวที่ตกต่ำ เนื่องจากข้าวอินทรีย์หรือการผลิตแบบปลอดสารพิษได้รับความนิยมจากผู้บริโภคตลาดบนที่มีกำลังซื้อข้าวในราคาที่สูงกว่า ทำให้เกษตรกรสามารถขายข้าวได้ราคาสูงกว่าการขายข้าวที่ผลิตแบบเคมี แต่แนวคิดพื้นฐานของเกษตรอินทรีย์คือ การบริหารจัดการโดยการผลิตทางการเกษตรแบบองค์รวมโดยพึ่งพาธรรมชาติ การพัฒนาเทคนิคต่างๆ เกี่ยวกับการให้ธาตุอาหารพืช และป้องกันกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่นที่อาจมีผลในการทำให้พืชที่ปลูกมีผลผลิตลดลงจึงเป็นหัวใจสำคัญในการผลิตข้าวอินทรีย์ ซึ่งปัจจุบันปุ๋ยชีวภาพ กำลังเป็นที่นิยมมากขึ้นในหลายประเทศ ซึ่ง ปุ๋ยชีวภาพ คือปุ๋ยที่ได้จากการนำจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่จะไปเพิ่มปริมาณธาตุอาหาร หรือเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารในดิน (Vessey, 2003) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเหล่านั้นมักจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ได้แก่ *Azospirillum Streptomyces Trichoderma Pseudomonas* และ *Bacillus* เป็นต้น ทั้งนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมเชื้อรา *Pyricularia grisea* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคไหม้ในข้าวได้ดี (Tayuan *et al*., 2016) ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการศึกษาและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ในอนาคตได้

การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบเชื้อ *Basillus* spp. ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าว ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เป็นจุลินทรีย์ในการทำปุ๋ยชีวภาพเพื่อนำไปใช้ทดแทนปุ๋ยเคมี ในการผลิตข้าวอินทรีย์สำหรับเกษตรกรต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

นำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 40 ไอโซเลทที่แยกจากดินในแปลงปลูกข้าวอินทรีย์ (บริษัทข้าวอินทรีย์ไทย อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่) โดยเก็บดินบริเวณรอบรากข้าว 3 จุด ต่อหนึ่งแปลง โดยขุดต้นข้าวขึ้น แล้วเก็บตัวอย่างดินใส่ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อแล้วนำมาคัดแยกแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการเพื่อค้นหาเชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งเบื้องต้นได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อ *Bacillus* spp. (BS3 BA3 และ BL3) ซึ่งเก็บภายใต้อุณหภูมิต่ำ –20 องศาเซลเซียส ในกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นำมา cross streak บนอาหาร Luria – Bertani (LB) agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติและการนำไปประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ

ตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะโดยการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR โดยอาศัยวิธีของ Kraus and Loper (1995) โดยนำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงบนอาหาร Nutrient broth (NB) มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วเติมโซเดียมซัลเฟต แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง และละลายตะกอนด้วยอะซิโตน 200 ml แล้วนำไมโครปิเปตดูดมา 70 µl จุดลงบน Thin Layer Chromatographic Plates (TLC plate) (Silica gel 60 F254, 10x20 cm, 0.2 mm thickness, Marck) โดยมีตัว chloroform:acetone (9:1) เป็นตัวทำละลาย นำไปตรวจสอบตำแหน่งของสารภายใต้แสง UV ที่ 254 nm นำแผ่นซิลิกาเจลมาทาบกับอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่มีสปอร์เชื้อรา *Pyricularia* sp. ผสมอยู่ในความเข้มข้น 10^6 spores/ml (เลือกใช้เชื้อรานี้ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ทดสอบเนื่องจากเชื้อรา *Pyricularia* sp. เป็นสาเหตุโรคในข้าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกไปใช้ในอนาคตต่อไป) บันทึกผล clear zone เปรียบเทียบกับ iturin A

ตรวจสอบความสามารถในการสร้าง Indole Acetic Acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Tris-TMRT (glucose 10 กรัม yeast extract 0.2 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.2 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.25 กรัม Tris-base 1.21 กรัม L-tryptophan 0.061 กรัม pH 6.8 ในน้ำ 1 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายใสไปตรวจสอบการสร้าง IAA โดยดูดสารละลายใสมา 1 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 ml เติมสารละลาย 0.01 M $FeCl_3$ ใน 35 เปอร์เซ็นต์ $HClO_4$ (Salkowsky reagent) ในปริมาณ 2 ml เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm ทำการเทียบกับ IAA มาตรฐาน (Costacurta *et al*., 2006)

เตรียมกราฟมาตรฐาน IAA ตามวิธีของ (Ahmad *et al*., 2008) โดยชั่ง IAA จำนวน 10 mg แล้วละลาย IAA ด้วย Ethanol 500 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 ml จะได้ stock สารละลาย IAA ที่มีความเข้มข้น 1000 µg/ml จากนั้นทำการ dilution stock IAA ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/ml ในอาหาร Tris-TMRT โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 5 ml ดูดสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 500 µl เติม Salkowski reagent 500 µl ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ IAA ในหน่วยไมโครกรัม/ml กับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 530 nm

ตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน จากกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase โดยใช้เทคนิค Acetyl Reduction Assay (ARA) ด้วยเครื่อง Gas Chromatography โดยใช้ Capillary column โดยวิธีประยุกต์จาก (Piromyou *et al*., 2010) เริ่มจากการนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว Nitrogen Free Medium (NFM) ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 7 ml ในหลอดทดลองขนาด 21 ml บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมก๊าซ Acetylene ในปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอากาศ บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ดึงก๊าซจากหลอดที่ผ่านการบ่มแล้วปริมาตร 1 ml มาตรวจวัดประมาณก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gas Chromatography ที่มี Flame Ionization detector โดยใช้ PE-alumina column

2. การทดสอบเชื้อบาซิลลัสที่มีผลต่อการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในกระถาง

เตรียมต้นกล้าข้าวทดสอบโดยเพาะในถังน้ำพลาสติกหูหิ้วสีดำ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 34 เซนติเมตร สูง 28 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นกระถางข้าวโดย บรรจุดินผสม 10 กิโลกรัมต่อกระถาง (Chongkid *et al*., 2013) (อัตราส่วนดินร่วน: ดินเหนียว: ปุ๋ยคอก; 3:1:1 โดยปริมาตร)เตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) ที่ไม่ได้อบสารเคมี และเป็นข้าวที่ปลูกโดยฟาร์มข้าวอินทรีย์

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาลอยน้ำสะอาดคัดเอาเมล็ดที่จมน้ำไว้ใช้ในการทดลอง จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่จมดังกล่าวมาแช่น้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำ ไปเพาะบนถาดเพาะกล้าเป็นเวลา 20 วัน นำกล้าข้าวที่เพาะไว้ปักดำลงบนถังดินที่เตรียมไว้โดย ถังละ 1 กอ กอละ 3 ต้น ทำการดูแลต้นกล้าข้าวให้สมบูรณ์ ทิ้งให้ต้นข้าวตั้งตัว 15 วัน (Boonphirom, 2015) นำมาใช้ในการทดลองโดย วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ 6 ทรีตเมนต์ ประกอบด้วย 1) น้ำเปล่า 2) ปุ๋ยเคมี 3) ฉีดพ่นด้วย BS3 4) ฉีดพ่นด้วย BA3 5) ฉีดพ่นด้วย BL3 และ 6) สารชีวภัณฑ์

เตรียมเชื้อบาซิลลัสไอโซเลท BS3, BA3 และ BL3 ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml ฉีดพ่นลงบนใบข้าวที่อายุ 15 วัน โดยฉีดในปริมาณ 10 ml/plant หลังจากนั้นฉีดพ่นเชื้อซ้ำอีกทุกๆ 1 สัปดาห์ ฉีดพ่นทั้งหมด 15 สัปดาห์ โดยการแบ่งการทดลองออกเป็น treatment คือ ชุดที่พ่นด้วยบาซิลลัสไอโซเลท BS3 ชุดที่พ่นด้วยบาซิลลัสไอโซเลท BA3 ชุดที่พ่นด้วยบาซิลลัสไอโซเลท BL3 เปรียบกับชุดความคุมคือน้ำเปล่า สารชีวภัณฑ์เปรียบเทียบ (พด.3) และปุ๋ยเคมี แบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 หลังปักดำประมาณ 15 วัน โดยใสปุ๋ยสูตร 16-20-0 อัตรา 1.10 กรัมต่อกระถาง (25 กิโลกรัมต่อไร่) ครั้งที่ 2 ใสกอนข้าวออกดอกประมาณ 30 วัน โดยใช้ปุ๋ยยูเรียสูตร 46-0-0 ในอัตรา 0.44 กรัมต่อกระถาง (10 กิโลกรัมต่อไร่)

การเก็บข้อมูลการทดสอบในการปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในกระถาง ด้านการเจริญเติบโตของข้าวประยุกต์จากวิธีของ Ashrafuzzaman *et al*. (2009) และ Doni *et al*. (2014) โดยเก็บข้อมูล ความสูง (เซนติเมตร) จำนวนใบต่อต้น จำนวนต้นต่อกระถาง และความกว้างใบ ด้านผลผลิตประยุกต์จากวิธีของ Piadang *et al*. (2006) โดยเก็บข้อมูลจำนวนรวงต่อกระถาง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี น้ำหนักเฉลี่ย 1,000 เมล็ด (กรัม) และน้ำหนักเมล็ด (กรัมต่อกระถาง)

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลตามแผนการทดลองและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการวิจัย

1.1 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ

ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะโดยการนำจุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท มาทดสอบกับ TLC plate แล้วนำแผ่นซิลิกาเจลมาทาบกับอาหาร PDA ที่มีสปอร์เชื้อรา *Pyricularia* sp. เข้มข้น 10^6 spores/ml จากการทดลองพบว่ามีเพียงไอโซเลท BS3 ที่พบ clear zone มีค่า Rf = 0.58 และสารปฏิชีวนะเปรียบเทียบ iturin A มีค่า Rf = 0.45 ส่วน ไอโซเลทที่ BA3 และ BL3 ไม่พบ clear zone นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคสำคัญของเมลอนโดยเชื้อดังกล่าวสามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยราในการทดสอบระดับจานเลี้ยงเชื้อและบนต้นกล้าเมลอน

ผลความสามารถในการสร้าง Indole Acetic Acid โดยใช้ L-Trytophan เป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดแล้วทำปฏิกิริยากับ Salkowsky reagent นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง เทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA (Table 1)

Table 1 Production of indole acetic acid by different *Bacillus* isolates

Isolate	Production of Indole Acetic Acid (µg/ml)
Isolate BA3	0.0170 ± 0.0010^{a}
Isolate BL3	0.0103 ± 0.0032^{b}
Isolate BS3	0.0143 ± 0.0015^{ab}

[ab]Values in the same column with different superscripts differed at P<0.05 by DMRT

จากการทดลองพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ ไอโซเลทของ BA3 มีการผลิต IAA มากที่สุด รองลงมาคือ BS3 เมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve โดยพบว่าสามารถผลิต IAA ได้เท่ากับ 0.017 และ 0.014 µg/ml ตามลำดับ

ผลความสามารถในตรึงไนโตรเจน โดยใช้เทคนิค Acetyl Reduction Assay (ARA) ตรวจสอบด้วยเครื่อง Gas Chromatography โดยใช้ PE-alumina column (Table 2)

Table 2 Nitrogen fixation of *Bacillus* spp.

Isolate	Nitrogen fixation (nmol C_2H_4/hr/tube)
Isolate BA3	5.89 ± 0.17^{b}
Isolate BL3	3.64 ± 0.11^{c}
Isolate BS3	9.70 ± 0.36^{a}

[abc]Values in the same column with different superscripts differed at P<0.05 by DMRT

จากผลการทดลองพบว่า ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงสุดคือ BS3 รองลงมาคือ BA3 โดยมีค่าเท่ากับ 9.7 และ 5.89 นาโนโมล/ชั่วโมง ตามลำดับ

1.2 การทดสอบเชื้อบาซิลลัสที่มีผลต่อการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในกระถาง

การเจริญเติบโตของข้าวจากการทดลอง พบว่า ชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมีทำให้มีจำนวนต้นต่อกระถางมากที่สุด รองลงมาคือชุดการทดลองที่ใช้เชื้อไอโซเลท BS3 โดยมีจำนวนต้นต่อกระถาง เท่ากับ 38.50 และ 36.13 ต้น ตามลำดับส่วนในลักษณะจำนวนใบต่อต้น และความกว้างใบไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลอง สำหรับลักษณะความสูงของข้าวพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมีและชุดการทดลองที่ใช้น้ำเปล่าทำให้มีความสูงของต้นข้าวสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 168.25 และ 165.62 เซนติเมตร (Table 3)

ด้านองค์ประกอบผลผลิตพบว่าชุดการทดลองที่ทำให้จำนวนรวงต่อกระถางมากที่สุดคือ ชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมี รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อไอโซเลท BS3 ชุดการทดลองที่ใช้สารชีวภัณฑ์เปรียบเทียบ และ ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ BL3 โดยมีจำนวนรวงต่อกระถางเท่ากับ 35.75, 33.38, 32.50 และ 32.38 รวง ตามลำดับ ส่วนจำนวนเมล็ดต่อรวงไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติทุกชุดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีมีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือ ชุดการทดลองที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีมากที่สุด คือ ชุดการทดลองที่ใช้ไอโซเลท BS3 และชุดการทดลองที่ใช้สารชีวภัณฑ์เปรียบเทียบ โดยมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี เท่ากับ 74.20 และ 72.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสำหรับน้ำหนักเฉลี่ย 1,000 เมล็ดข้าวเปลือก พบว่าในชุดการทดลองที่ใช้สารชีวภัณฑ์เปรียบเทียบ ให้น้ำหนัก 1,000 เมล็ด มากที่สุด รองลงมาคือชุดการทดลองที่ใช้เชื้อไอโซเลท BL3 BS3 และ BA3 ซึ่งให้น้ำหนัก 1,000 เมล็ดเท่ากับ 25.05 24.13 23.96 และ 22.56 กรัม ตามลำดับ และผลผลิตต่อกระถาง (กรัมต่อกระถาง) พบว่า ในชุดการทดลองที่ใช้สารชีวภัณฑ์เปรียบเทียบ และชุดการทดลองที่ใช้ไอโซเลท BS3 ให้น้ำหนักผลผลิตต่อกระถางมากที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 149.00 และ 136.96 ตามลำดับ (Table 4)

2. วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการนำเชื้อมาตรวจสอบคุณสมบัติการผลิตสารปฏิชีวนะโดยใช้ iturin A เป็นชุดควบคุม พบว่ามีเพียงเชื้อไอโซเลท BS3 ที่มีการผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, bacilysin, iturin, mycosubtilin, fengymycin และ mycobacillin ขึ้นอยู่กับอาหารที่เหมาะสม และเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ FR-2 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ iturin A ที่มีฤทธิ์ต่อต้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในแตงกวา โรคใบไหม้ และโรคกาบใบแห้งของข้าว Pusey (1989) ซึ่งจากการทดลองได้ใช้เพียง iturin A เป็นสารทดสอบเทียบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น และทดสอบกับเชื้อ *Pyricularia* sp. เพียงเชื้อเดียว ดังนั้นเป็นไปได้ว่าเชื้อไอโซเลท BS3 คือเชื้อ *B. subtilis* ส่วน BA3 และ BL3 อาจเป็น *Bacillus* ในสปีชีส์อื่น ทั้งนี้อาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีรายงานว่ามีผลต่อชนิด และคุณสมบัติของสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Akpa *et al*., 2001; Elkahoui *et al*., 2012) ในด้านความสามารถในการสร้าง IAA ผลที่ได้พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถสร้าง IAA ได้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่าแบคทีเรียในสกุล *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Microbacterium, Methylophaga, Pseudomonas, Agromyces* และ *Azospirillum* สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ (Bal *et al*., 2013; Lavakush *et al*., 2014) ส่วนความสามารถในตรึงไนโตรเจน พบว่าเชื้อบาซิลลัสทุกไอโซเลทสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่า แบคทีเรียหลายสกุลสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ได้แก่ *Azospilillum, Azotobacter, Pesudomonase* และ *Bacillus* เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้สามารถตรึงไนโตรเจน

ได้โดยไม่จำเป็นต้องอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยกลไกการแปรสภาพอินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ (Glick, 1995) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Bacillus subtilis* TU-Orga 1 ที่สามารถส่งเสริมให้ต้นข้าวมีประสิทธิภาพในการใช้ไนโตรเจนจากสภาพธรรมชาติได้เพิ่มมากขึ้น (Doungkaew *et al*., 2013)

ผลของการทดสอบเชื้อบาซิลลัส ต่อการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในกระถาง พบว่า ชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมี และชุดการทดลองที่ใช้เชื้อไอโซเลท BS3 ทำให้มีจำนวนต้นต่อกระถางมากที่สุด ส่วนในด้านจำนวนใบต่อต้น และความกว้างใบ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลอง สำหรับความสูงของข้าว ชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมี และชุดการทดลองที่ใช้น้ำเปล่า ทำให้มีความสูงมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่าการปลูกข้าวที่ใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราค่าวิเคราะห์ดิน จะมีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต มากกว่าการปลูกข้าวที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี (Kirdlum *et al*., 2012) และยังมีรายงานที่พบว่าชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมีทำให้ข้าวสังข์หยดมีความสูงมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยผสม

ผลของการทดสอบเชื้อบาซิลลัส ต่อผลผลิตข้าว พบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารชีวภัณฑ์เปรียบเทียบ และ ชุดการทดลองที่ใช้ไอโซเลท BS3 มีแนวโน้มในการเพิ่มผลผลิตของข้าวได้มากที่สุดเมื่อเทียบชุดทดลองไอโซเลท BA3 BL3 ปุ๋ยเคมี และน้ำเปล่า โดยมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี น้ำหนักเฉลี่ย 1,000 เมล็ด และผลผลิตต่อกระถาง มากกว่าปุ๋ยเคมี และน้ำเปล่า ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการทดลองที่เกี่ยวข้อง plant growth-promoting N2-fixing และ P solubilizing โดยกล่าวว่าสายพันธุ์ *Bacillus* สามารถทำให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้น (Sudha *et al*., 1999) และรายงานที่กล่าวว่า *Bacillus megaterium* สามารถเพิ่มผลผลิตของข้าวและข้าวบาร์เลย์ได้ (Cakmakci *et al*., 1999; Khan *et al*., 2003)

สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อบาซิลลัส 3 ไอโซเลทมีการผลิตสาร Indole Acetic Acid (IAA) โดยพบในไอโซเลท BA3 สามารถผลิต IAA ได้มากที่สุดและพบว่าเชื้อไอโซเลท BS3 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด อีกทั้งมีการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในกระถาง พบว่าเชื้อ BS3 มีแนวโน้มในการเพิ่มคุณภาพเมล็ดโดยมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ทั้งนี้ในการทดลองเป็นการทดลองในระดับกระถางทดลอง จึงควรมีการศึกษาในระดับแปลงปลูกเพื่อให้ทราบถึงผลที่จะเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เป็นจุลินทรีย์ในการทำปุ๋ยชีวภาพ ในการผลิตข้าวอินทรีย์สำหรับเกษตรกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) รหัสโครงการ MSD58I0031, มหาวิทยาลัยพะเยา งบประมาณปี 2561 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) บริษัท ข้าวอินทรีย์ไทย และศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพะเยา ตลอดจนศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยพะเยาในการสนับสนุนสถานที่และครุภัณฑ์ในการวิจัย

Table 3 Effect of *Bacillus* on growth of KDML 105 rice (120 days)

Treatment	Plant/pot	Leaf number/plant	Leaf: width (cm)	Plant height (cm)
Water	28.00±3.30[c]	6.38±0.74	1.50±0.05	165.62±9.77[a]
Chemical fertilizer	38.50±4.17[a]	6.25±0.71	1.51±0.04	168.25±8.17[a]
Isolate BS3	36.13±4.52[ab]	5.88±0.64	1.50±0.05	141.62±4.03[b]
Isolate BA3	28.63±4.17[c]	6.25±0.46	1.48±0.05	139.62±3.81[b]
Isolate BL3	31.50±4.24[c]	6.50±0.76	1.49±0.06	140.50±2.98[b]
Bio-fertilizer	32.50±5.40[bc]	5.88±0.83	1.49±0.06	138.38±5.42[b]

[abc]Values in the same column with different superscripts differed at P<0.05 by DMRT

Table 4 Effect of *Bacillus* on KDML 105 rice grain yield

Treatment	Panicles/pot	Grain/panicles	Filled Grain (%)	1000 Filled grain weight (g)	yield (g/pot)
Water	26.50±1.77[c]	175.90±32.73	63.67±2.63[b]	21.78±2.20[b]	105.16±19.18[c]
Chemical fertilizer	35.75±6.80[a]	167.20±29.26	51.87±1.40[d]	17.45±0.70[c]	108.98±17.02[c]
Isolate BS3	33.38±5.45[ab]	174.20±19.05	74.20±0.30[a]	23.96±0.59[ab]	136.96±9.84[ab]
Isolate BA3	28.00±5.07[bc]	184.60±16.75	58.33±0.67[c]	22.56±1.50[ab]	113.26±12.83[c]
Isolate BL3	32.38±3.85[ab]	187.40±22.29	66.17±1.67[b]	24.13±1.97[ab]	125.07±15.57[bc]
Bio-fertilizer	32.50±5.66[ab]	195.50±25.32	72.97±0.45[a]	25.05±1.68[a]	149.00±14.50[a]

[abc]Values in the same column with different superscripts differed at P<0.05 by DMRT

References

Ahmad, R., Arshad, M., Khalid, A., Zahir, Z.A. and Mahmood, T. 2008. Effect of compost enriched with N and L-tryptophan on soil and maize. Agron. Sustain. Dev. 28: 299-305.

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

Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Razi Ismail, M., AnamulHoque, M.d., Zahurul Islam, M., Shahidullah, S.M. and Meon, S. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. Afr. J. Biotechnol. 8(7): 1247-1252.

Bal, H.B., Das, S., Dangar, T.K. and Adhya, T.K. 2013. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. J. Basic Microbiol. 53(12): 972-984.

Boonphirom, T. 2015. Effect of plant spaces on the growth and yield of Homkradung-nga Rice (*Oryza sativa* L.). Princess of Naradhiwas University Journal. 7(3): 115-120. (in Thai)

Cakmakci, R., Kantar, F. and Algur, Ö.F. 1999. Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* inoculation. J. Plant Nutr. Soil Sci. 162: 437-442.

Chongkid, B., Lorkhamshap, P., Sauyou, Y. and Taengthong, W. 2013. Tillering ability and seed component yielding of mutated KDML 105 lines at different numbers of seedlings per hill. Thammasat International Journal of Science and Technology. 21(6): 543-546.

Costacurta, A., Mazzafera, P., and Rosato, Y.B. 2006. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts, FEMS Microbiol. Lett. 159: 215-220.

Division of Rice Research and Development. 2004. Instructions for use of chemical fertilizers in paddy fields based on soil analysis. Department of Agriculture. Bangkok: Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)

Doni, F., Isahak, A., Che Mohd Zain, C. R., and Wan Yusoff, W. M. 2014. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. Inoculants. AMB Express. 4(1). 1-7.

Doungkaew, N., Chuaboon, W., Kladsuwan, L., Choorin, M. and Athinuwat, D. 2013. Novel gene, yutl *Bacillus subtilis* TUOrga1 is critical for suitable nitrogen utilizaion to against bacterial streak disease inorganic rice production systrm. The 51th Kasetsart University Annual Conference. 5-7 February. Kasetsart University, Bangkok. 116 - 126. (in Thai)

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

Glick, B.R. 1995. The enchancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.

Khan, M.R., Talukdar, N.C. and Thakuria, D. 2003. Detection of *Azospirillum* and PSB in rice rhizosphere soil by protein and antibiotic resistance profile and their effect on grain yield of rice. Indian. J. Biotechnol. 2: 246-250.

Kirdlum, P., Chancharean, C. and Anakad, S. 2012. Use of LDD.12 for cultivation of Phitsanulok 2 rice to variety in Uttaradit soil series. Land Development Department. Bangkok: Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)

Kraus, J. and Loper, J.E. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Appl. Environ. Microbiol. 61: 849–854.

Lavakush, Yadav, J., Verma, J.P., Jaiswal, D.K. and Kumar, A. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). Ecol. Eng. 62: 123-128.

Office of Agricultural Economics. 2012. Thailand's agricultural trade statistics for the year 2010. Bangkok: Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)

Office of Agricultural Economics. 2016. The volume and the import value of pesticides. Bangkok: Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)

Piadang, N., Chumpoonta, T., Wimolphan, W., Dhammapitak, S. and Panyaban, N. 2006. The Application of Bio-Organic Fertilizers (Factory and Swine Farm Wastewater) on Organic Rice Production. Office of Atoms for Peace, Ministry of Science and Technology. 7-19. (in Thai)

Piromyou, P., Longtonglang, A., Chunleuchanon S., Tittabutr, P., Wongkaew, S., Boonkerd, N., and Teaumroong, N. 2010. Application of *Bacillus subtilis* for baby corn seed production. KHON KAEN AGR. J. 38: 155-162.

(in Thai)

Pusey, P.L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. Pestic. Sci. 27: 133-140.

Sirikul, A. 2010. Chemical Compositions and Antioxidant Activity of Organic and Chemical Rice Bran. Master of Science (Food Technology) Mahasarakham University. 137 pp. (In Thai)

Sudha, S.N., Jayakumar, R. and Sekar, V. 1999. Introduction and expression of the cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* in a cerealassociated bacterium, *Bacillus polymyxa*. Curr. Microbiol. 38: 163-167.

Tayuan, C., Rachaisawan, K. and Sriphadet, S. 2016. Control of *Pyricularia grisea* causing of rice blast disease. KHON KAEN AGR. J. 44 SUPPL. 1: 972 – 976. (in Thai)

Vessey, J.K. 2003, Plant growth promoting rhizobacteria as bio-fertilizers. Plant Soil. 255: 571-586.