

การแยกและคัดเลือแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าว

Isolation and Screening of Antagonistic Bacteria for Inhibition of Pathogenic Fungi in Rice

วาสนา เนียมแสง *

Wasana Naiumsawang *

Received: 8 November 2021, Revised: 10 October 2022, Accepted: 25 October 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินในนาข้าวที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุดและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง โดยเก็บตัวอย่างดิน 10 แหล่ง ในพื้นที่อำเภอบางเลน ได้แก่ ตำบลลำพญา บางไทรป่า นิลเพชร ไทรงาม และบัวปากท่า มาทำการ cross streak บนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 112 ไอโซเลท นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าวเบื้องต้นโดยวิธี dual culture บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน พบว่ามี 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท N5-5 G4-1 และ G5-5 ที่ยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้ และมี 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท N1-1 N5-5 G4-1 และ G5-5 ที่ยับยั้ง *Bipolaris oryzae* ได้ ส่วน *Pyricularia grisea* ไม่มีไอโซเลทใดที่ยับยั้งได้ การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุดโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (NB) นาน 18 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นที่ OD 600 nm เท่ากับ 0.5 (10^8 cell/ml) เติมห้วเชื้อ 1% ในอาหาร NB บ่มอุณหภูมิห้อง (25-30°C) อัตราเขย่า 200 rpm นาน 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสผสมในอาหาร PDA ที่อัตราส่วน 2:18 เมื่ออาหารแข็งตัวจึงนำไปทดสอบ พบว่า ไอโซเลท G4-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *R. solani* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 54.29% อยู่ในระดับปานกลาง และไอโซเลท N5-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. oryzae* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 55.55% อยู่ในระดับปานกลาง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งโดยเลี้ยงในอาหาร NB ที่มี pH 3 5 7 และ 9 อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40°C อัตราเขย่า 200 rpm นาน 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วนำส่วนใสไปทดสอบ พบว่า ไอโซเลท G5-5 เลี้ยงในอาหาร NB ค่า pH 5 อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *R. solani* และ *B. oryzae* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 85.33 และ 66.94% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในระดับสูงมาก และเมื่อนำไอโซเลท G5-5 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการจัดเรียงตัวของเซลล์เดี่ยวและต่อกันเป็นสาย มีการสร้างเอนโดสปอร์ จึงคาดว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

Microbiology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University, Mueang, Nakhon Pathom 73000, Thailand.

* ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): wasana@webmail.npru.ac.th Tel: 08 1701 8292

คำสำคัญ: แบคทีเรียปฏิปักษ์, เชื้อรา *Rhizoctonia solani*, เชื้อรา *Bipolaris oryzae*, เชื้อรา *Pyricularia grisea*

ABSTRACT

This study aims to isolate soil bacteria from rice fields and to determine antifungal activity of the isolates. Ten soil samples were collected in Bang Len district areas: Lam Pa Ya, Bang Sai Pa, Nil Phet, Sai Ngam and Bua Pak Tha subdistricts, and were cross streaked on Tryptic soy agar (TSA) medium. A total of 112 bacteria was isolated. Dual-culture antagonistic tests were conducted for all bacterial isolates against rice pathogenic fungi on PDA medium at 28°C for 5 days. The findings showed that only 3 isolates, namely N5-5, G4-1 and G5-5, had antifungal activities against *Rhizoctonia solani*, and only 4 isolates, namely N1-1, N5-5, G4-1 and G5-5, had antifungal activities against *Bipolaris oryzae*. However, all isolates had no antifungal activity against *Pyricularia grisea*. Selected bacteria were cultured in nutrient broth medium for 18 hours, and cell turbidity was adjusted OD 600 nm to 0.5 (10^8 cell/ml), added 1% inoculum in NB medium and incubated at room temperature (25-30°C) at 200 rpm shaking rate for 48 hours. The cells were centrifuged at 12000 rpm at 4°C for 2 min. The supernatant was added to the PDA medium at a ratio of 2:18. The antifungal activities were measured as the mean colony diameter for growth inhibition. One of the isolates (G4-1) had a moderate level of antifungal activity against *R. solani* at 54.29%, whereas the isolated N5-5 had the moderate level of antifungal activity against *B. oryzae* at 55.55%. Next, the optimization of antifungal production was studied in an NB medium at pH 3, 5, 7 and 9, respectively, and shaken at 200 rpm at 25, 30, 35 and 40°C for 48 hours. Results demonstrated that the isolated G5-5 cultured at pH 5 and 25°C had a very high level of antifungal activity against *R. solani* at 85.33% and *B. oryzae* at 66.94%. The morphological study of antagonistic bacteria G5-5 showed that it was a gram-positive rod with single and linear cell arrangement and endospore development. Therefore, we suggest that the antagonistic bacterium belongs to the genus *Bacillus*.

Key words: antagonistic bacteria, *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris oryzae*, *Pyricularia grisea*

บทนำ

ข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย พบว่า การส่งออกข้าวในเดือนกันยายน 2564 มีการส่งออกข้าวขาวปริมาณ 313,446 ตัน เพิ่มขึ้น 14.2% เมื่อเทียบกับเดือนก่อน โดยส่วนใหญ่ส่งไปยังตลาดจีน อีรัก มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยคองโก โมซัมบิก แองโกล่า เป็นต้น ข้อมูลของกรมศุลกากรรายงานการส่งออก

ข้าวในช่วงเดือนมกราคมถึงกันยายน 2564 มีปริมาณ 3,817,284 ตัน มูลค่า 69,552 ล้านบาท (2,235.9 ล้านบาทเหรียญสหรัฐ) โดยปริมาณส่งออกลดลง 6.6% และมูลค่าลดลง 18.3% เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปี 2563 ที่มีการส่งออกปริมาณ 4,087,004 ตัน มูลค่า 85,153 ล้านบาท (2,724.2 ล้านบาทเหรียญสหรัฐ) (Thai rice exporters association, 2021) พื้นที่จังหวัดนครปฐมที่มีการทำนาปลูกข้าวมากที่สุด คือ อำเภอบางแพ

บางเลนมีพื้นที่ทำนาปลูกข้าวทั้งหมด 357,589 ไร่ ความเป็นพื้นที่ที่มีปัจจัยด้านการผลิตขั้นพื้นฐานที่สมบูรณ์สามารถทำนาได้ตลอดปี จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้เกษตรกรมีการทำนาปลูกข้าวโดยเน้นด้านปริมาณผลผลิตเป็นสำคัญ จึงมีการใช้สารเคมีทางการเกษตรเพื่อเพิ่มผลผลิต เช่น ปุ๋ยเคมี สารเคมีกำจัดศัตรูพืช และสารเคมีชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Bunpiak *et al.*, 2019) การป้องกันกำจัดโรคข้าวยังคงใช้สารเคมีอยู่เนื่องมาเป็นพื้นที่ปลูกขนาดใหญ่จึงเป็นวิธีที่สะดวกต่อการควบคุมโรคแต่การใช้สารเคมีที่ไม่ถูกวิธี ได้แก่ การใช้สารที่ไม่เหมาะสมต่อสกุล (genus) ของเชื้อโรค และการใช้สารแบบดูดซึมที่มีสารออกฤทธิ์ (active ingredient) เพียงชนิดเดียวต่อเนื่องเป็นเวลานานจะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา สาเหตุเหล่านี้ทำให้ไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ (Wongcharoen, 2013) และเพื่อมุ่งเน้นด้านปริมาณผลผลิตเป็นสำคัญอีกประการหนึ่งคือ เกษตรกรมักปลูกข้าวเป็นแบบนาหว่าน ทำให้ต้นข้าวอยู่ชิดติดกัน เบียดกันแน่น ส่งผลให้เชื้อราฉวยโอกาสเจริญได้ดี และทำให้เกิดโรคในข้าวขึ้นได้ เช่น โรคใบไหม้ (Rice Blast Disease) มีสาเหตุจาก *Pyricularia grisea* โรคกาบใบแห้ง (Sheath blight Disease) มีสาเหตุจาก *Rhizoctonia solani* และโรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown Spot Disease) มีสาเหตุจาก *Bipolaris oryzae* ที่ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของข้าวที่ได้ลดต่ำลง

ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการโรคพืชแบบผสมผสาน เนื่องจากเป็นวิธีที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การใช้จุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืชไม่ให้เพิ่มปริมาณมากจนถึงระดับที่พืชเสียหาย และให้มีอยู่ในแปลงในปริมาณจะสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของศัตรูพืชในการควบคุมปริมาณศัตรูพืชไม่ให้ระบาด ซึ่งการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมีหลากหลายชนิด ได้แก่ การใช้แบคทีเรีย

ปฏิบัณในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* ที่ก่อโรคกาบใบไหม้ในข้าวโพด (Pattanawipas *et al.*, 2011) การใช้แบคทีเรียปฏิบัณ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No.16 ควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวพันธุ์ กข 6 สาเหตุจากเชื้อรา *R. solani* (Thapanaphongworakul and Saimongkol, 2015) ดังนั้น การควบคุมโรคพืชโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิบัณ จึงเป็นวิธีการที่น่าผลจากการปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งตามปกติจะมีการควบคุมปริมาณของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ด้วยกันเองอยู่แล้ว (Nochai and Srichuwong, 2007) ซึ่งวิธีการนี้ถือว่าเป็นที่ยอมรับและเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงเพื่อนำไปเป็นกลยุทธ์ในการป้องกันกำจัดโรคจุลินทรีย์ปฏิบัณที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพนี้มีกลไกการควบคุมหรือยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใน 4 ลักษณะ คือ การแข่งขัน การทำลายชีวิตหรือปฏิชีวนะ การเป็นปรสิต และการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค โดยเฉพาะกลไกการทำลายชีวิตหรือปฏิชีวนะเป็นกลไกที่เชื้อปฏิบัณสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในนาข้าว และแบคทีเรียคัดแยกได้นี้จัดเป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นบนพื้นที่การปลูกข้าวของเกษตรกรในพื้นที่ของจังหวัดนครปฐม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินในนาข้าวจากแปลงเกษตรกรที่ไม่ใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช จำนวน 10 แหล่ง (ตารางที่ 1) โดยการเก็บตัวอย่างดินบริเวณผิวดินที่มีความลึกประมาณ 1-2 เซนติเมตร ตักตัวอย่างดินลงในถุงพลาสติก นำดิน 10 กรัม มาทำการเจือจางในสารละลาย 0.85% NaCl เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาเกลี่ยลงบนอาหาร Tryptic

soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมา cross streak ให้บริสุทธิ์ (Petsuriyawong *et al.*, 2012) จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกได้ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในนาข้าวเบื้องต้น โดยวิธี Dual culture

2.1 การเตรียมเชื้อราที่ก่อโรคในนาข้าว ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โดยเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea*, *R. solani* และ *B. oryzae* บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30°C) ให้มีอายุ 5 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยใช้ Loop และแบคทีเรียที่มีอายุ 18 - 24 ชั่วโมง จัดเป็นเส้นตรง ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ขนานกันกับเชื้อราที่ก่อโรคในนาข้าวที่เตรียมไว้โดยใช้ cork borer เบอร์ 2 ตัดเส้นใยเชื้อรารอบโคโลนี วางบนอาหาร PDA โดยมีระยะห่างประมาณ 2.5 เซนติเมตร บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน สำหรับวิธีเปรียบเทียบ (control) ใช้ Loop และน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนแบคทีเรียที่ทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยวัด inhibition zone แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (Percent Inhibition of Radial Growth : PIRG) (Thaisuchart and Boonkon, 2014) ดังนี้

$$\text{PIRG} = \frac{(R1-R2) \times 100}{R1}$$

R1

R1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

โดยประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งจากค่า PIRG ดังนี้

> 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูงมาก

> 61-75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูง

> 51-60 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับปานกลาง

< 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับต่ำ

จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบของสารเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว

ศึกษากิจกรรมของสารยับยั้งเชื้อราที่แบคทีเรียผลิตขึ้น โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2 มาเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรึความขุ่นเซลล์ OD 600 nm เท่ากับ 0.5 (10^8 cell/ml) เดิมหัวเชื้อ 1% ในอาหาร NB บ่มที่

อุณหภูมิห้อง (25 - 30°C) อัตราเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกจากเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใส (supernatant) โดยผสมส่วนใสในอาหาร PDA ในอัตราส่วน 2:18 มิลลิลิตร รอให้อาหารแข็งตัว (Tayuan *et al.*, 2016) และนำไปทดสอบการเจริญของเชื้อรา ซึ่งเตรียมได้โดยเลี้ยงเชื้อ

รบนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน ใช้ cork borer เบอร์ 2 ตัดเส้นใยเชื้อรารอบโคโลนี นำไปวางลงกึ่งกลางจานเพาะเชื้อ และใช้อาหาร PDA ที่ไม่มีส่วนผสมของสารยับยั้งเป็นตัวควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้สูงสุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30°C) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเซลล์ OD 600 nm เท่ากับ 0.5 (10^8 cell/ml) เติมห้วเชื้อ 1% ในอาหาร NB ที่ปรับค่า pH 3 5 7 และ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40°C อัตราเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสมากรองด้วย Syringe Filters 0.22 μ m และทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้ง โดยผสมส่วนใสในอาหาร PDA ในอัตราส่วน 2:18 มิลลิลิตร รอให้อาหารแข็งตัว และนำไปทดสอบการเจริญของเชื้อรา ด้วยเทคนิค point inoculation เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นเลือกอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งมากที่สุดจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราได้สูงสุด

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียปฏิบัณ

นำแบคทีเรียปฏิบัณที่ยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้สูงที่สุดมาทำการย้อมสีแบบแกรม และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) พร้อมทั้งคำนวณค่าความถี่ ร้อยละ และค่าเฉลี่ย โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 23

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การเก็บตัวอย่างดิน และการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในดิน

เก็บตัวอย่างดินในนาข้าว จำนวน 10 แหล่ง มาเจือจางในสารละลาย 0.85% NaCl เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาเกลี่ยลงบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมา cross streak ให้บริสุทธิ์ พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 112 ไอโซเลท ดังตารางที่ 1 ซึ่งจุลินทรีย์สามารถพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำและบริเวณรอบรากพืช โดยเฉพาะดินที่ทำการเกษตรในระบบเกษตรอินทรีย์ที่ไม่มีการปนเปื้อนจากปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช น่าจะมีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ และทำให้ระบบนิเวศมีความสมดุลสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช โดยเฉพาะปัจจัยทางด้าน pH เนื้อดิน และปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งตัวอย่างดินที่นำมาคัดแยกเชื้อมีค่า pH ในช่วง 7.00-8.00 ลักษณะเนื้อดินเป็นดินเหนียวปนทราย สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Pimsirikul *et al.* (2016) ที่ได้ศึกษาการตรวจหาจุลินทรีย์ในดินปลูกผัก ระบบเกษตรอินทรีย์ในพื้นที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา พบว่า ดินจากแปลงผักอินทรีย์ มีเนื้อดินเป็นดินเหนียว มีค่า pH เป็นด่างเล็กน้อยถึงปานกลาง

และตรวจพบปริมาณแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 7.381-7.695

2. ผลการทดสอบการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้น

เลี้ยงเชื้อรา *R. solani* บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 5 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค โดยวิธี dual culture พบว่า จากแบคทีเรียทั้งหมด 112 ไอโซเลท แต่มี 3 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ คือ ไอโซเลท N5-5 G4-1 และ G5-5 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราเท่ากับ 12.50, 40.00 และ 36.67% ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ในระดับต่ำ ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Thapanaphongworakul and Saimongkol (2015) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No.16 ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6. นำราหลายไอโซเลทและแบคทีเรียปฏิปักษ์มาทดสอบบนอาหาร PDA โดยวิธี dual culture เป็นเวลา 4 วัน พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของ

เชื้อรา *R. solani* แต่ละไอโซเลทได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา ไอโซเลท RSLPN-1, RSLPN-2, RSLPN-3 และ RLSPN-4 เท่ากับ 41.65, 26.78, 26.08 และ 42.35% ตามลำดับ และสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Montealegre *et al.* (2003) ที่ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* 618 (AG 4) ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียในดินได้จำนวน 20 ไอโซเลท แต่มีเพียง 3 ไอโซเลท ที่แสดงคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ได้แก่ ไอโซเลท 639 629 และ 640 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 31.50 34.50 และ 34.67% ตามลำดับ และรายงานเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ซึ่งการที่แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถยับยั้งราก่อโรคเหล่านี้ได้เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase, glucanase และ cellulase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบในเส้นใยราจึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของราได้นั่นเอง (Tipsing *et al.*, 2019)

ตารางที่ 1 รหัสและจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินต่าง ๆ ในพื้นที่อำเภอบางเลน

แหล่งที่มาของดิน	รหัสไอโซเลท	จำนวน (ไอโซเลท)
ลำพญา 1 (13°56'34.1"N 100°12'08.1"E)	L1-1, L1-2, L2-1, L2-2, L2-3, L2-4, L2-5, L2-6, L2-7, L2-8, L2-9, L2-10, L3-1	13
ลำพญา 2 (13°57'29.9"N 100°12'04.9"E)	L4-1, L4-2, L5-1, L5-2, L5-3, L5-4, L5-5, L5-6, L5-7, L6-1	10
บางไทรป่า 1 (14°02'56.9"N 100°11'37.9"E)	B1-1, B1-2, B1-3, B2-1, B2-2, B2-3, B2-4, B2-5, B2-6, B2-7, B2-8, B2-9, B2-10, B3-1, B3-2	15
บางไทรป่า 2 (14°03'12.7"N 100°11'45.2"E)	B4-1, B4-2, B5-1, B5-2, B5-3, B5-4, B5-5, B5-6, B5-7, B6-1	10
นิลเพชร 1 (14°07'23.1"N 100°13'59.6"E)	N1-1, N1-2, N1-3, N1-4, N2-1, N2-2, N2-3, N2-4, N2-5, N2-6, N2-7, N2-8, N2-9, N2-10, N3-1, N3-2	16

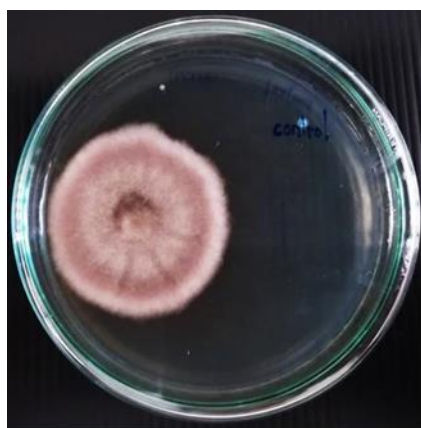
ตารางที่ 1 (ต่อ)

แหล่งที่มาของดิน	รหัสไอโซเลต	จำนวน (ไอโซเลต)
นิลเพชร 2 (14°07'43.2"N 100°14'31.3"E)	N4-1, N4-2, N4-3, N4-4, N4-5, N4-6, N5-1, N5-2, N5-3, N5-4, N5-5, N5-6, N5-7, N5-8, N5-9, N5-10, N5-11, N5-12, N5-13, N5-14, N6-1, N6-2, N6-3	23
ไทรงาม 1 (14°04'23.2"N 100°10'25.7"E)	G1-1, G1-2, G2-1, G2-2, G3-1	5
ไทรงาม 2 (14°05'00.9"N 100°12'05.3"E)	G4-1, G4-2, G5-1, G5-2, G5-3, G5-4, G5-5, G6-1	8
บัวปากท่า 1 (14°09'13.0"N 100°12'53.7"E)	P1-1, P1-2, P2-1, P2-2, P2-3, P2-4, P3-1	7
บัวปากท่า 2 (14°09'02.0"N 100°12'40.9"E)	P4-1, P4-2, P5-1, P5-2, P6-1	5
รวม		112

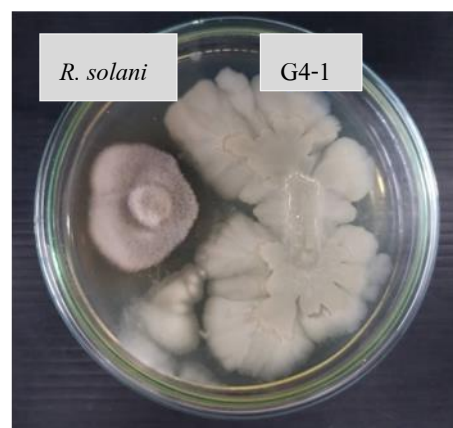
ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *R. solani* บนอาหาร PDA บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน

รหัสไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งโคโลนีของเชื้อ (%)	ประสิทธิภาพในการยับยั้ง
N5-5	12.50±0.02 ^a	ระดับต่ำ
G4-1	40.00±0.01 ^c	ระดับต่ำ
G5-5	36.67±0.02 ^b	ระดับต่ำ

หมายเหตุ ตัวอักษร a - c ที่ต่างกันในแนวดิ่งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) $n=3$



(a)



(b)

ภาพที่ 1 การยับยั้งเชื้อรา *R. solani* โดยไอโซเลต G4-1 บนอาหาร PDA บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน

(a) จานควบคุม (b) จานทดสอบ

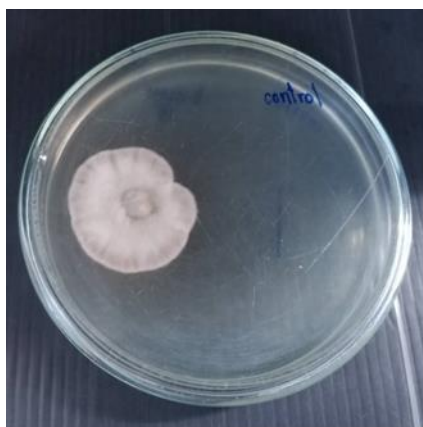
เลี้ยงเชื้อรา *B. oryzae* บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 5 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค โดยวิธี dual culture พบว่า จากแบคทีเรียทั้งหมด 112 ไอโซเลท แต่มี 4 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ คือ ไอโซเลท N1-1 N5-5 G4-1 และ G5-5 ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Rajasekar *et al.* (2019) ที่ได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็น

แบคทีเรียปฏิชีวนะบริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดินกับเชื้อราโรคข้าว *B. oryzae* พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 20 ไอโซเลท ในจำนวนนี้ถูกระบุเป็น *B. subtilis* และ *P. fluorescence* โดยไอโซเลท PI (Bs) 5 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดเท่ากับ 52.96% รองลงมาเป็น PI (Pf) 1, PI (Pf) 2 และ PI (Bs) 8 มีค่าเท่ากับ 52.59 52.22 และ 49.26% ตามลำดับ ส่วน PI (Bs) 9 และ PI (Pf) 17 มีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำสุด เท่ากับ 19.26 และ 19.63% ตามลำดับ

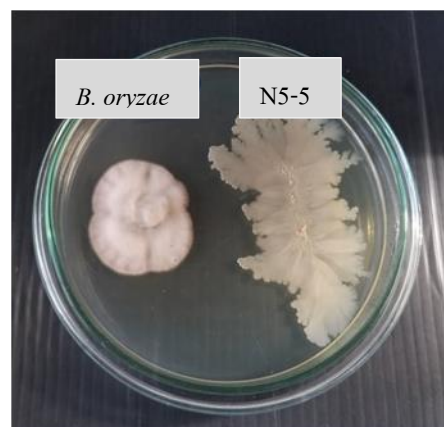
ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. oryzae* บนอาหาร PDA บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน

รหัสไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งโคโลนีของเชื้อ (%)	ระดับการยับยั้ง
N1-1	3.00±0.01 ^a	ต่ำ
N5-5	48.67±0.03 ^d	ต่ำ
G4-1	32.46±0.03 ^b	ต่ำ
G5-5	46.60±0.01 ^c	ต่ำ

หมายเหตุ ตัวอักษร a - d ที่ต่างกันในแนวดิ่งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) n=3



(a)



(b)

ภาพที่ 2 การยับยั้งเชื้อรา *B. oryzae* โดยไอโซเลท N5-5 บนอาหาร PDA บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน

(a) จานควบคุม (b) จานทดสอบ

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 112 ไอโซเลท พบว่าไม่มีไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ได้

3. ผลการทดสอบของสารเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิบัฏ์ในอาหาร NB บ่มอุณหภูมิห้อง (25-30°C) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเซลล์ OD 600 nm เท่ากับ 0.5 เติมห้วเชื้อ 1% ในอาหาร NB บ่มอุณหภูมิห้อง (25-30°C) อัตราเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกจากด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสผสมอาหาร PDA พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท G4-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 54.29% อยู่ในระดับปานกลาง รองลงมาเป็นแบคทีเรียไอโซเลท N5-5 และ G5-5 มีค่าเท่ากับ 48.57 และ 42.86% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Donmez *et al.* (2015) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณใต้ต้นชาในเขตทะเลดำของ

ประเทศตุรกีเพื่อควบคุมเชื้อรา *R. solani* พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 73 ไอโซเลท ในจำนวนนี้เป็นแบคทีเรียปฏิบัฏ์ 15 ไอโซเลท โดยมีโซนการยับยั้งเชื้อราตั้งแต่ 0.20 - 2.30 cm และมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง การเจริญของเส้นใยเชื้อราในช่วง 12-83% และเมื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. oryzae* พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท N5-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. oryzae* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 55.55% อยู่ในระดับปานกลาง รองลงมาเป็นแบคทีเรียไอโซเลท G4-1 และ G5-5 มีค่าเท่ากับ 44.44% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอยู่ในระดับต่ำ ดังตารางที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Ramachandra *et al.* (2016) ที่ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *B. oryzae* พบว่า สามารถคัดแยกได้จำนวน 39 ไอโซเลท ในจำนวนนี้จำแนกเป็น *Bacillus* spp. 23 ไอโซเลท และ *Pseudomonas* spp. 16 ไอโซเลท โดย *Bacillus* (BA2) และ *Pseudomonas* (PS1) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด เท่ากับ 52.22 และ 53.33% ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของสารเมตาบอไลต์ของแบคทีเรียปฏิบัฏ์ที่สร้างขึ้นในการยับยั้งเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน

รหัสไอโซเลท	เชื้อรา <i>R. solani</i>		เชื้อรา <i>B. oryzae</i>	
	รัศมีโคโลนี (cm)	การยับยั้ง (%)	รัศมีโคโลนี (cm)	การยับยั้ง (%)
N5-5	1.80±0.05	48.57±1.43 ^b	0.80±0.01	55.55±0.55 ^b
G4-1	1.60±0.06	54.29±1.74 ^c	1.00±0.04	44.44±2.22 ^a
G5-5	2.00±0.05	42.86±1.43 ^a	1.00±0.08	44.44±4.31 ^a
control	3.50±0.01	0	1.80±0.03	0

หมายเหตุ ตัวอักษร a - c ที่ต่างกันในแนวดิ่งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ

ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) $n=3$

4. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียปฏิบัณช์

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิบัณช์ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30°C) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเซลล์ OD 600 nm เท่ากับ 0.5 (10^8 cell/ml) เติมห้วเชื้อ 1% ในอาหาร NB ที่ปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 3 5 7 และ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 28 30 35 และ 40°C อัตราเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บั่นแยกเซลล์ออกแล้วนำส่วนใสมาทดสอบ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท G5-5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีค่า pH 3 และ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 85.33% ซึ่งอยู่ในระดับสูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Montealegre *et al.* (2003) ที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิบัณช์มาใช้ควบคุมเชื้อรา *R. solani* ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ พบว่า แบคทีเรียปฏิบัณช์มีการเจริญเติบโตที่ค่า pH และอุณหภูมิแตกต่างกัน โดย *B. subtilis* 639 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ค่า pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ *B. lentimorbus* 640 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ค่า pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 28°C ส่วน *B.*

lentimorbus 629 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ค่า pH 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 10°C และสภาวะที่เหมาะสมในการควบคุมเชื้อรา *B. oryzae* คือ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีค่า pH 3 5 และ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 66.94% ซึ่งอยู่ในระดับสูง ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 3 - 4

5. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียปฏิบัณช์

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิบัณช์ไอโซเลท G5-5 มา Cross streak บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาข้อมสีแบบแกรม เพื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า ศึกษารูปร่าง และลักษณะเบื้องต้น พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการจัดเรียงตัวของเซลล์เดี่ยวและต่อกันเป็นสาย มีการสร้างเอนโดสปอร์ จัดเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ดังภาพที่ 5 สอดคล้องกับการศึกษาของ Nicholson *et al.* (2000) *Bacillus* เป็นพวกแอโรบิกเฮเทอโรโทรฟ กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ที่สร้างสปอร์ และมีแหล่งอาศัยที่หลากหลาย

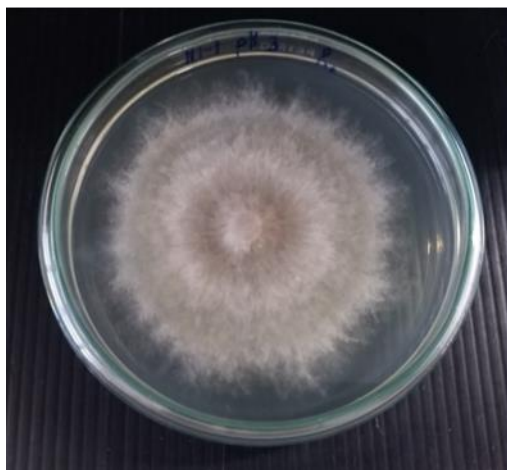
ตารางที่ 5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียไอโซเลท G5-5 ในการผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรค บนอาหาร PDA บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน

อุณหภูมิ (°C)	ค่า pH	เชื้อรา <i>R. solani</i>		เชื้อรา <i>B. oryzae</i>	
		รัศมีโคโลนี (cm)	การยับยั้ง (%)	รัศมีโคโลนี (cm)	การยับยั้ง (%)
25	3	0.66±0.03	85.33±0.67 ^c	0.80±0.02	66.94±0.44 ^b
	5	0.66±0.01	85.33±0.22 ^c	0.80±0.02	66.94±0.44 ^b
	7	0.99±0.06	78.00±1.33 ^b	0.80±0.01	66.94±0.22 ^b
	9	1.10±0.01	75.55±0.22 ^a	0.90±0.02	62.81±0.44 ^a
30	3	3.52±0.01	21.78±0.23 ^a	>2.42	0 ^a
	5	0.88±0.01	80.44±0.22 ^c	1.26±0.02	47.93±0.44 ^c
	7	1.23±0.05	72.67±1.11 ^b	2.16±0.03	26.00±0.67 ^b

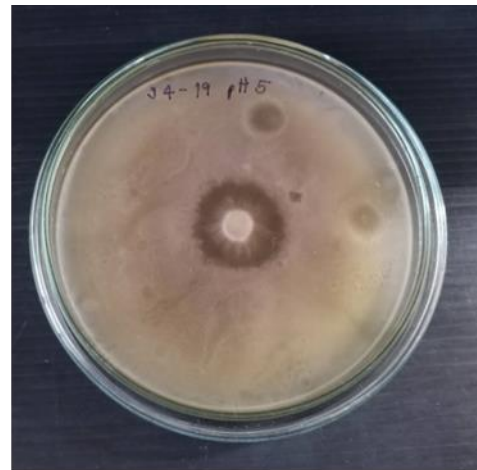
ตารางที่ 5 (ต่อ)

อุณหภูมิ (°C)	ค่า pH	เชื้อรา <i>R. solani</i>		เชื้อรา <i>B. oryzae</i>	
		รัศมีโคโลนี (cm)	การยับยั้ง (%)	รัศมีโคโลนี (cm)	การยับยั้ง (%)
35	9	0.79±0.02	82.44±0.44 ^d	2.16±0.02	26.00±0.44 ^b
	3	0.74±0.07	83.56±1.55 ^c	1.50±0.01	38.02±0.23 ^b
	5	0.84±0.02	81.33±0.45 ^b	1.90±0.01	21.49±0.22 ^a
	7	0.95±0.02	78.89±0.44 ^a	1.90±0.05	21.49±1.14 ^a
40	9	0.84±0.01	81.33±0.22 ^b	1.30±0.03	46.28±0.67 ^c
	3	3.50±0.03	22.22±0.67 ^a	>2.42	0 ^a
	5	2.00±0.01	55.56±0.22 ^d	1.50±0.05	38.02±1.11 ^b
	7	2.30±0.01	48.89±0.22 ^c	1.30±0.04	46.28±0.89 ^c
	9	2.50±0.01	44.44±0.22 ^b	1.20±0.02	50.41±0.44 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษร a - d ที่ต่างกันในแนวดิ่งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) $n=3$

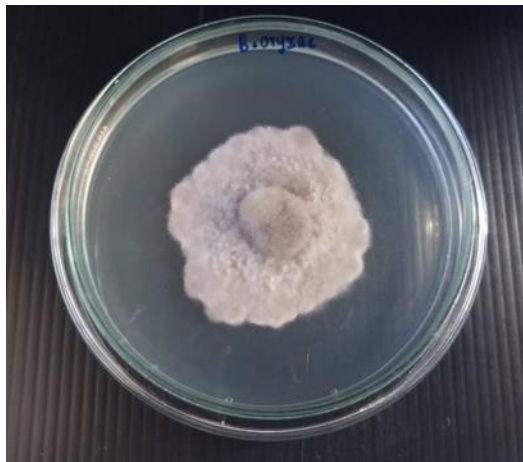


(a)

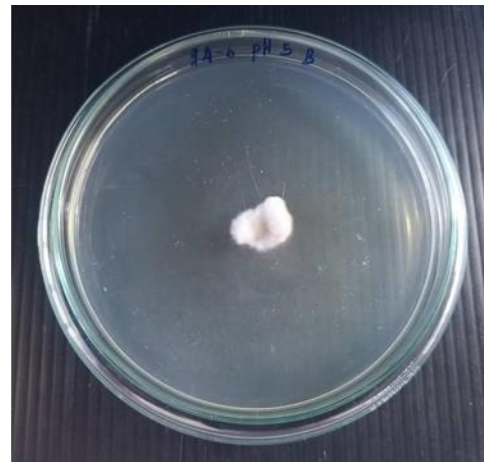


(b)

ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียไอโซเลต G5-5 ในยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีค่า pH 5 บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (a) จานควบคุม (b) จานทดสอบ

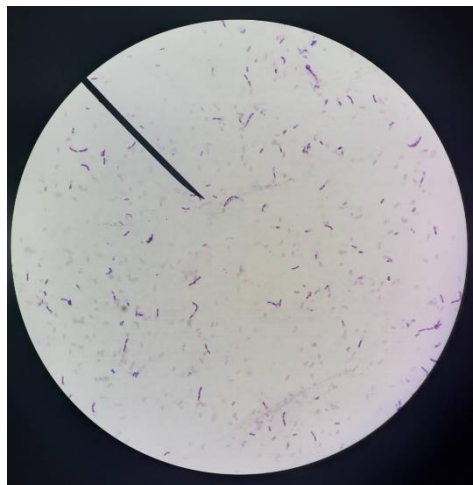


(a)

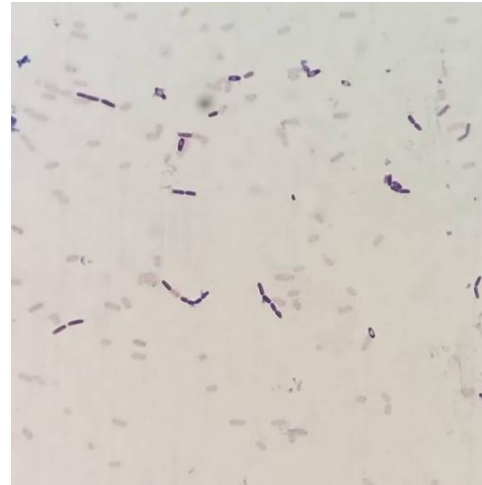


(b)

ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียไอโซเลต G5-5 ในยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. oryzae* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีค่า pH 5 บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (a) จานควบคุม (b) จานทดสอบ



(a)



(b)

ภาพที่ 5 รูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแบบแกรมของแบคทีเรียปฏิบัณไอโซเลต G5-5 (a) การติดสีแบบแกรม (b) รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์

สรุป

การเก็บตัวอย่างดินในนาข้าว จากแปลงเกษตรกรที่ไม่ใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช จำนวน 10 แหล่ง ได้แก่ ดินจากตำบลพญาบางไทรป่า นิลเพชร ไทรงาม และบัวปากท่า จำนวน 10 แหล่ง มาทำการ cross streak บนอาหาร TSA พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียในดินได้ทั้งหมดจำนวน 112 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเบื้องต้น พบว่า มี 3

ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ได้ คือ ไอโซเลต N5-5 G4-1 และ G5-5 และมี 4 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *B. oryzae* ได้ คือ ไอโซเลต N1-1 N5-5 G4-1 และ G5-5 ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* พบว่า ไม่มีไอโซเลตใดเลยที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต G4-1 มี

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 54.29% อยู่ในระดับปานกลาง และแบคทีเรียไอโซเลท N5-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. oryzae* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 55.55% อยู่ในระดับปานกลาง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียพบว่า เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท G5-5 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีค่า pH 3 หรือ pH 5 บ่มที่อุณหภูมิ 25°C มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 85.33% ซึ่งอยู่ในระดับสูงมาก และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. oryzae* ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 66.94% ซึ่งอยู่ในระดับสูง และเมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท G5-5 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการจัดเรียงตัวของเซลล์เดี่ยวและต่อกันเป็นสาย มีการสร้างเอนโดสปอร์ จัดเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งในอนาคตควรทำการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในนาข้าว ได้แก่ *R. solani* และ *B. oryzae* ในสภาพเรือนทดลองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ที่สนับสนุนทุนการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณสาขาวิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการดำเนินงานทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Bunpiak, S., Sudta, W., Issarachot, O. and Kitsanapun, A. 2019. Rice farmers' behavior in pesticides

spraying at Naraphirom subdistrict, Banglen district, Nakhon Pathom province. **Journal of Safety and Health** 12(3): 49-59. (in Thai)

Donmez, M.F., Uysal, B., Demirci, E., Ercisli, S. and Cakmakci, R. 2015. Biological control of root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* Kühn on potato and bean using antagonist bacteria. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus** 14(5): 29-40.

Montealegre, J., Reyes, R., Pérez, L.M., Herrera, R., Silva, P. and Besoain, X. 2003. Selection of bio antagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. **Electronic Journal of Biotechnology** 6(2): 115-127.

Nicholson, W.L., Munakata, N., Homeck, G., Melosh, H.J. and Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64(3): 548-72.

Nochai, S. and Srichuwong, S. 2007. Efficacies of antagonistic fungi from rice seeds cv. KDML 105 for controlling bakanae disease in rice seedling. **Journal of Agriculture** 23(1): 59-65. (in Thai)

Pattanawipas, P., Thasakorn, T., Pasabutr, T., Lapbrunjoob, S. and Chanmuang, O. 2011. Select and test of biological control for *Rhizoctonia solani*, pp. 637-643. In The annual research report 2011, **The Office of Plant Protection Research**. Department of Agriculture, Bangkok. (in Thai)

Petsuriyawong, B., Khunajakr, N. and Wongwicharn, A. 2012. Isolation and identification of

- antifungal bacteria from soil, pp. 124-131.
- In Proceedings of 50th Kasetsart University Annual Conference.** Natural Resources and Environment, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Pimsirikul, P., Jindaprasert, K., Seesanong, S. and Phopan, A. 2016. Determination of microbial population in soil of organic vegetable farming systems. **King Mongkut's Agricultural Journal** 4(2): 77-84. (in Thai)
- Ramachandra, N.M., Akila, R. and Thiruvudainambi, S. 2016. Management approaches for brown spot of rice caused by *Bipolaris oryzae*. **Journal of Farm Science** 29(3): 370-376.
- Rajasekar, G., Ebenezar, E.G., Thiruvudainambi, S., Vanniarajan C. and Shanthi M. 2009. Antifungal activity of rice associated phyllosphere (RAP) communities against brown spot of rice (*Bipolaris oryzae*). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 8(6): 171-175.
- Tayuan, C., Rachaisawan, K. and Sriphadet, S. 2016. Control of *Pyricularia grisea* causing of rice blast disease. **Khon Kaen Agriculture Journal** 44(Suppl.I): 972-976. (in Thai)
- Thapanapongworakul, P. and Saimongkol, S. 2015. Efficiency of antagonistic bacterium *Bacillus megaterium* strain No.16 for controlling sheath blight disease of RD6 rice variety. **Agricultural Journal** 31(3): 301-310. (in Thai)
- Thai rice exporters association. 2021. **Daily news summary 27 October – 2 November 2021.** Available Source: http://www.thairiceexporters.or.th/mk_rpt/2021/news_3NOV2021XmDxIpoe.pdf, November 6, 2021. (in Thai)
- Thaisuchart, H. and Boonkon, P. 2014. *In vitro* control of fungal contamination in stored garlic by herbal extracts and microbial antagonists. **KKU Science Journal** 42(4): 771-780. (in Thai)
- Tipsing, S., Panvilai, S., Prajanban, J. and Meidong, R. 2019. Efficiency of *Bacillus* spp. from ant-hill soils against *Pestalotiopsis* sp. causing fruit rot disease in guava. **Veridian E-Journal** 6(2): 1-14. (in Thai)
- Wongcharoen, A. 2013. Effect of fungicides on the growth of rice pathogenic fungi. **Khon Kaen Agriculture Journal** 41(Suppl.I): 527-531. (in Thai)