การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง *Curvularia lunata* เชื้อราสาเหตุโรคกล้าเน่าของข้าว

ปฏิกรณ์ อินโองการ[1*] และศิริลักษณ์ สันพา[2]

Isolation of antagonistic bacteria against *Curvularia lunata*, a pathogenic fungus of rice seedling rot disease

Patikorn Inongkarn[1*] and Sirilak Sanpa[2]

[1]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

[2]สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

[1]Department of Environmental Science, School of Energy and Environment, University of Phayao, Phayao, 56000

[2]Department of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao, 56000

*Corresponding author. Tel.: 097-9217261 E-mail : luffink@msn.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากดินในนาข้าว ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia lunata* TISTR 3068 เชื้อราสาเหตุโรคกล้าเน่า โดยใช้วิธี dual culture plate บนอาหาร Potato dextrose agar สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 10 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี agar well diffusion method พบแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* TISTR 3068 มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ คือ *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคกล้าเน่า โดยทดสอบบนวัสดุเพาะ ใช้เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่สปอร์แขวนลอย *C. lunata* TISTR 3068 ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 conidia/ml พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ให้ผลลดการปกคลุมของเชื้อราได้ เมื่อทดสอบการใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า *Bacillus* sp. SB9 ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ให้ผลความยาวราก ความสูงต้น และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าสูงสุดคือ 4.77, 6.88 เซนติเมตร และ 1130.05 ตามลำดับ

คำสำคัญ: โรคกล้าเน่า, แบคทีเรียปฏิปักษ์, *Curvularia lunata*, ข้าว

Abstract

The present study was aimed to isolate bacteria from paddy soil and evaluate their ability against *Curvularia lunata* TISTR 3068, a pathogenic fungus of rice seedling rot disease. Ten bacterial isolates could inhibit the fungal mycelial growth on dual culture plate method using Potato dextrose agar. Of these, only isolate SB6 and SB9 showed the hibitory effect higher then 60 percent, using agar well diffusion technique. The antagonistic bacteria were also evaluated the inhibitory effect on planting material, using the rice kernel (KDML 105) soak with 10^8 spores/ml *C. lunata* TISTR 3068. The results showed that *Bacillus* sp. SB6 and *Bacillus* sp. SB9 at 10^7 cfu/ml able to decrease the coverage of pathogenic fungus. The ability of antagonistic bacteria was applied with various concentrations, *Bacillus* sp. SB9 at 10^9 cfu/ml showed the highest root length, shoot length and Vigor index as 4.77, 6.88 centimeter and 1130.05, respectively.

Keywords: rice seedling rot disease, antagonistic bacteria, *Curvularia lunata*, rice

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศกสิกรรม ประชาชนส่วนใหญ่ประกอบอาชีพกสิกร มีพื้นที่ปลูกข้าวคิดเป็นพื้นที่ 11.3 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ทั่วประเทศ ข้าวขาวมะลิ 105 เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่ทำรายได้ให้กับประเทศคิดเป็นร้อยละ 25-30 ของมูลค่าการส่งออกข้าวทั้งหมดและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในการผลิตข้าว เกษตรกรต้องเผชิญกับปัญหาหลายประการที่มีผลกระทบต่อคุณภาพและผลผลิต ไม่ว่าจะเป็นความไม่แน่นอนของสภาพแวดล้อม ความอุดมสมบูรณ์ และที่สำคัญคือปัญหาที่เกิดจากการทำลายของศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาจากการทำลายของโรค ไม่เพียงก่อให้คุณภาพของผลผลิตเสียหายแต่ยังทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมสภาพด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Curvularia lunata* ที่เป็นสาเหตุของโรคกล้าเน่า ซึ่งจะเกิดขึ้นในระยะการตกกล้าข้าวในกระบะเพาะ โดยจะเริ่มพบเมล็ดข้าวบางส่วนที่เพาะไม่งอก เมล็ดที่งอกต้นกล้าจะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นกล้าข้าวปกติ รากและโคนของต้นกล้ามีแผลสีน้ำตาลและแผลที่เกิดบนโคนต้นจะลุกลามขึ้นไปยังส่วนบนของต้นกล้า (สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552) ในปัจจุบันในการแก้ปัญหาโดยการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicides) เป็นวิธีการที่รวดเร็วและได้ผลดี แต่โดยธรรมชาติของสารเคมีเหล่านี้ พบว่าเป็นอันตราย และไม่ปลอดภัย (พรรณลดา ติตตะบุตร, 2554) การใช้สารที่ไม่เหมาะสมต่อสกุล (Genus) ของเชื้อโรค และการใช้สารแบบดูดซึมที่มีสารออกฤทธิ์ (active ingredient) เพียงชนิดเดียวต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา ไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรค และเชื้อรายังเกิดความต้านทานข้าม (cross-resistance) ระหว่างกลุ่มของสารเคมีได้ (Taga M. et al., 1979)

แนวคิดจัดทำการเกษตรยั่งยืน (sustainable agriculture) หมายถึงระบบเกษตรแบบใดก็ตามที่มีรูปแบบที่ทำให้เกิดความมั่นคงต่อเกษตรกร และมีผลดีในระยะยาว สามารถบำรุงคุณภาพสิ่งแวดล้อมและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติสอดคล้องกับระบบนิเวศ เพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร และก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจ สิ่งมีชีวิตในดินมีอยู่มากมายทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ที่มีบทบาทสำคัญในการเกษตรกรรม เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีในเกษตรกรรม งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* ที่เป็นสาเหตุของโรคกล้าเน่า และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคกล้าเน่าบนวัสดุเพาะ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรีย

สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณนาข้าว กำหนดจุดเก็บตัวอย่างดิน 4 จุด โดยขุดดินลึกประมาณ 15 เซนติเมตร และเก็บตัวอย่างดินแต่ละจุด ใช้พลั่วแซะดินด้านหนึ่งของหลุมให้ได้ดินเป็นแผ่นหนา 2-3 เซนติเมตร ตัวอย่างดินที่ได้นี้เป็นดิน 1 จุด นำดินตัวอย่างทั้ง 4 จุดมาผสมรวมกันตัวอย่างละ 500 กรัมแล้วใส่รวมกันในภาชนะที่เตรียมไว้ จากนั้นนำดินตัวอย่างมาทำการเจือจางความเข้มข้นแบบลดลงที่ละสิบเท่า (10 fold serial dilition) ให้มีความเข้มข้น ถึง 10^{-5} และปิเปต ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) [Peptone 5.0 g l^{-1}, Beef extract 3.0 g l^{-1}, Agar 15 g l^{-1}] บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียมาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวอีกครั้ง ด้วยวิธี Cross streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อนำมาทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* โดยวิธี Dual culture plate technique

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Potato dextrose agar (PDA) [Potato 200g l^{-1}, Dextrose 20g l^{-1}, Agar 17g l^{-1}] บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราดังกล่าว และนำไปวางบนอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบอีกด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยวิธี Cross streak plate ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแบคทีเรียขีดเป็นเส้นตรงด้านตรงข้ามกับชิ้นวุ้นเชื้อรา *C. lunata* ในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางห่างจากเชื้อรา 5 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเฉพาะเชื้อรา *C. lunata* หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7

วัน แล้วจึงวัดรัศมีของการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth; PIGR) (Kheekorn, S. and Wongrueng, S., 2014) ดังสมการที่ 1

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG) = ((R1-R2)/R1)×100 (1)

โดย R1 = ความยาวรัศมีของเชื้อราก่อโรคในชุดควบคุม (เซนติเมตร)

R2 = ความยาวรัศมีของเชื้อราก่อโรคในชุดทดสอบ (เซนติเมตร)

3. การแยกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* โดยวิธี agar well diffusion method

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 2 มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* ได้สูงสุด ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion method โดยเทอาหาร PDA ปริมาตร 40 มิลลิตร ลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นตัดชิ้นวุ้นออกจากจานเป็นวงกลมด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 จุด ที่มีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางเท่ากัน จากนั้นปิเปตสารทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ของ 1) น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม) 2) purified cell หรือแบคทีเรียทดสอบนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB แล้วนำมาตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบนออก นำเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่มาล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml นำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *C. lunata* ขนาด 0.5 เซนติเมตร วางตรงจุดกึ่งกลางให้ห่างจากแต่ละจุดเท่า ๆ กัน บันทึกค่ารัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อ *C. lunata* จากกลุ่มการทดลองต่าง ๆ โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยตามกรรมวิธีของ (Mostapha, 2004) ดังสมการที่ 1

4. การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

คัดเลือกไอโซเลตแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 ทำการทดสอบเพื่อระบุสายพันธุ์โดยมีการทดสอบดังนี้

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ศึกษาลักษณะเบื้องต้น รูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ การติดสีแกรม และการย้อมเอนโดสปอร์, โดยกล้องจุลทรรศน์

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) เช่น การสร้างเอนไซม์ catalase, การสร้างเอนไซม์ Oxidase, VP test, Citrate utilization, Triple Sugar Iron (TSI), Starch hydrolysis, Oxidation-Fermentation Test

4.3 ระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยเทคนิค single 16s ribosomal DNA (rDNA) sequencing ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนการวิเคราะห์และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังนี้

สกัด Genomic DNA โดยใช้ Genomic DNA mini kit (Gerneaid biotech Ltd., Taiwan) หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ได้ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้เครื่อง DNA Engine Dyad® Thermal cycler (Bio-rad Laboratories) ซึ่งปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้ DNA Template 15-20 นาโนกรัม, ไพร์เมอร์ 2 ไมโครโมล, Taq polymerase 2.5 หน่วย, แมกนีเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ และ 10xTaq ที่มี (NH4)2SO4 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 750 มิลลิโมลาร์, (NH4)2SO4 200 มิลลิโมลาร์ และ0.1% Tween20, pH 8.8 สำหรับไพร์เมอร์ที่ใช้ คือ 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3', ตำแหน่ง 9-27 บน 16S rDNA) และ 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3', ตำแหน่ง 1509-1492 บน 16S rDNA) จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที	
Denaturation step	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	25 รอบ
Annealing step	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Elongation step	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	
Final amplification step	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที	

นำ PCR product ที่ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ ABI Prism® 3730XL DNA Sequence (Applied Biosystens, Foster city, California,USA) โดยใช้ไพร์เมอร์ดังนี้ 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') และ 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

การวิเคราะห์ Phylogenetic tree นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปแกรม MEGA version 7.0

5. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการก่อโรคกล้าเน่าบนวัสดุเพาะ

คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 ได้สูงสุด 2 ไอโซเลต เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) [Peptone 5.0 g l^{-1}, Beef extract 3.0 g l^{-1}] บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรีย ให้ได้ 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/ml

เตรียมเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยนำเมล็ดแช่น้ำคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ไม่ลอยน้ำนำมากำจัดเชื้อที่ผิวด้วยการแช่ในสารละลายคลอร็อกความเข้มข้น 15 เปอร์เซนต์ และเติม tween 20 2-3 หยด นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แช่เมล็ดข้าวทิ้งไว้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นาน 1 คืน

นำเมล็ดข้าวที่เตรียมไว้ มาแช่สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 ความเข้มข้น 10^8 conidia/ml เป็นเวลา 30 นาที ผึ่งให้แห้ง ทำการปลูกลงบนวัสดุเพาะที่มีความสามารถดูดน้ำซับน้ำได้ดีและมีความชื้นเพียงพอตลอดระยะเวลาการทดสอบ โดยจะใช้ทิชชูที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้วรดน้ำให้ชุ่มเป็นวัสดุเพาะ วางเมล็ดข้าวจำนวน 100 เมล็ดลงบนวัสดุเพาะ จากนั้นฉีดพ่นแบคทีเรียความเข้มข้น 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/ml ลงบนเมล็ดข้าวแต่ละชุดทดสอบตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ เมล็ดแช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และเมล็ดแช่เชื้อราสาเหตุโรค เพาะปลูกเป็นเวลา 14 วัน วิเคราะห์การงอก (เปอร์เซนต์) ต้นกล้าหรือเมล็ดเกิดโรค (เชื้อราปกคลุม) ต้นกล้าปกติ (ต้นอ่อนที่มียอด ราก สมบูรณ์) และดัชนีความแข็งแรง (Raju et al., 1999) ดังสมการที่ 3

$$\text{ดัชนีความแข็งแรง (Vigor index)} = (RL+SL) \times GP \qquad (3)$$

โดย RL = ความยาวราก (เซนติเมตร)

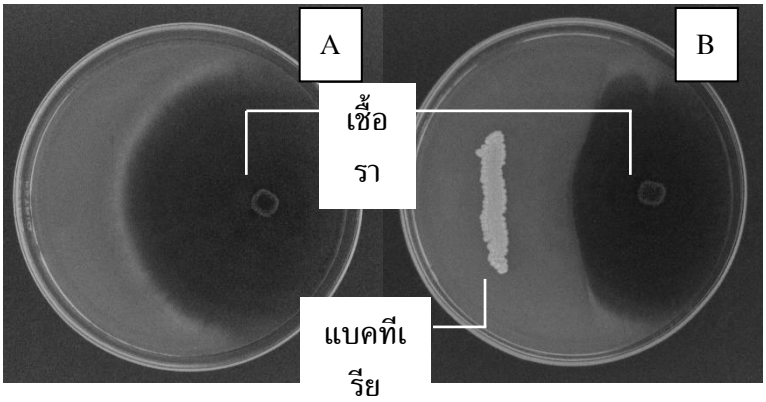
SL = ความสูงต้น (เซนติเมตร)

GP = การงอก (เปอร์เซ็นต์)

ผลการศึกษา

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* โดยวิธี Dual culture plate technique

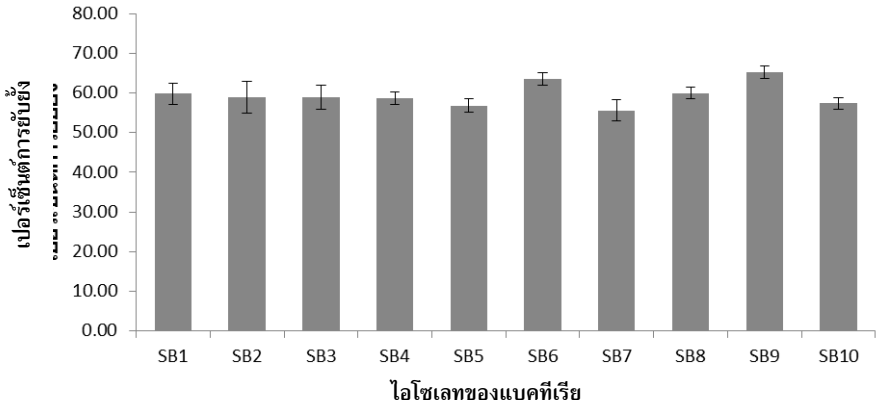
แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในนาข้าว นำมาคัดเลือกแยกแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหาร NA และทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 โดยวิธี Dual culture plate บนจานอาหาร PDA สังเกตการวัดขนาดการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลต คือ SB1, SB2, SB3, SB4, SB5, SB6, SB7, SB8, SB9 และ SB10 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเจริญของเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 และแบคทีเรียไอโซเลท SB9 บนจานอาหารควบคุม (A) และอาหารทดสอบ (B)

2. ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา C. lunata โดยวิธี agar well diffusion method

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 ทั้ง 10 ไอโซเลท ทดสอบการยับยั้งเชื้อราสูงสุดอีกครั้งด้วยวิธี agar well diffusion method บนอาหาร PDA พบว่ามีการยับยั้งอยู่ในช่วง 56.77-65.19 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตคือ SB1, SB2, SB3, SB4, SB5, SB6, SB7, SB8, SB9 และ SB10 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 59.79, 58.89, 58.89, 58.89, 56.77, 63.50, 55.61, 59.97, 65.19 และ 57.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* TISTR 3068 มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ คือไอโซเลต SB6 และ SB9 นำไปทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการก่อโรคกล้าเน่าต่อไปดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 บนจานอาหาร PDA

3. การจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียไอโซเลท

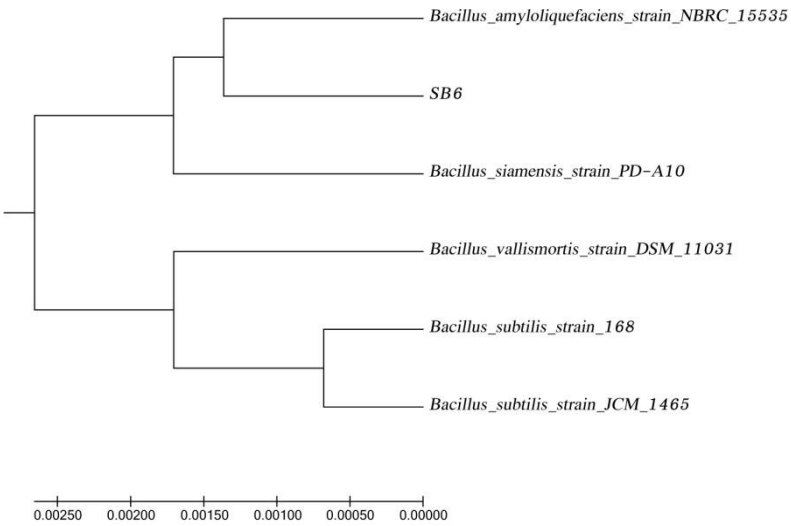
แบคทีเรียที่คัดเลือก SB 6 และ SB9 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียย้อมแกรมติดสีม่วง ท่อนสั้น เรียงตัวกระจัดกระจาย มีเอนโดสปอร์ ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 1 และการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยเทคนิค single 16S ribosomal DNA (rDNA) sequencing และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank และสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogeny) โดยใช้โปรแกรม Mega version7.0 แสดงผลออกมาในรูปแบบแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) พบว่าแบคทีเรีย SB6 และ SB9 เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Bacillaceae เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bacillus* sp. ในฐานข้อมูล Genbank แบคทีเรีย SB6 และ SB9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* โดยมีความเหมือน 99.59 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังรูปที่ 3 และ4

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ SB6 และ SB9

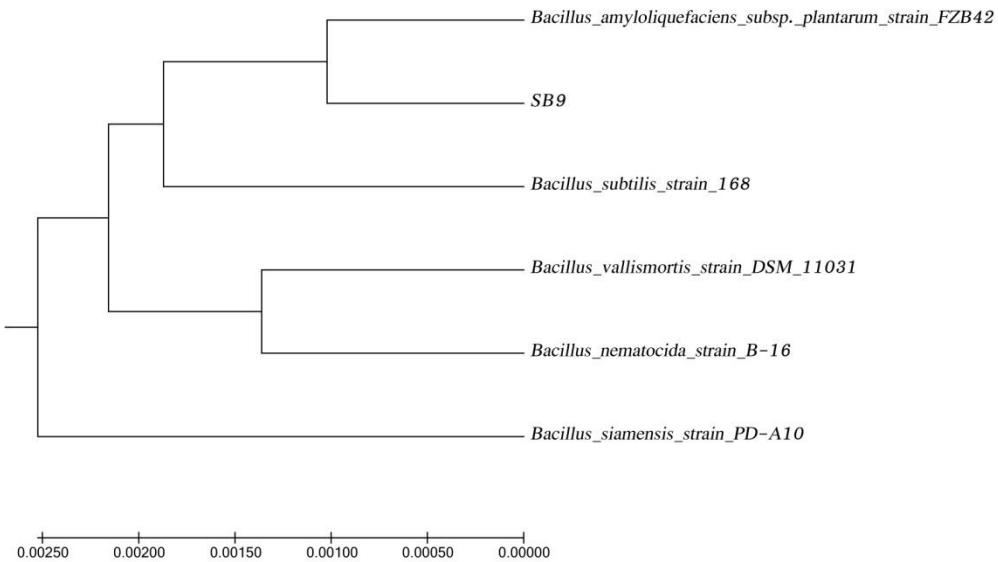
test	SB6	SB9	*Bacillus amyloliquefaciens**
Starch Hydrolysis	+	+	+
Triple Sugar Iron	–	–	–
Simmon Citrate Agar	+	+	+
Motility	+	+	+
Indole production	–	–	
Voges–Proskauer	+	+	+
Catalase	+	+	

หมายเหตุ: เครื่องหมาย – ให้ผลเป็น negative, เครื่องหมาย + ให้ผลเป็น positive

เครื่องหมาย * สายพันธุ์อ้างอิง ผลการทดลองทางชีวเคมีจาก Bergey's Manual of Systemmatic Bacteriology Volume 2



รูปที่ 3 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 16S ribosomal DNA (rDNA) ของไอโซเลท SB6 กับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp.



รูปที่ 4 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 16S ribosomal DNA (rDNA) ของไอโซเลท SB9 กับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp.

4. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการก่อโรคกล้าเน่าบนวัสดุเพาะ

จากการศึกษาพบว่า เมล็ดข้าวมีอัตราการงอกที่ไม่แตกต่างกันในทุกการทดลอง (ตารางที่ 2) อัตราการงอกหลังการปลูก 14 วัน อยู่ในช่วง 96-99 เปอร์เซ็นต์ ผลการเปรียบเทียบการเจริญของต้นกล้าข้าวมีดังนี้ เมื่อฉีดพ่นเมล็ดข้าวด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 ความเข้มข้น 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/ml ทุกความเข้มข้นให้ผลลดการปกคลุมของเชื้อราได้เมื่อเทียบกับตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ไม่ได้ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียทดสอบ และผลการเจริญของต้นกล้าข้าวบนวัสดุเพาะพบว่า การฉีดพ่นด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SB9 ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ให้ผลความยาวราก และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้ามากที่สุด อยู่ที่ 4.77 เซนติเมตรและ 1130.05 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SB6 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (control) และ เชื้อราก่อโรค (*C. lunata*) แต่ชุดควบคุมและ *Bacillus* sp. SB9 ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml นั้นให้ผลของความสูงต้นเท่ากับ 7.61 และ 6.88 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่า *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 ความเข้มข้น 10^7และ 10^8 cfu/ml อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียไอโซเลต *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 ต่อเจริญและการยับยั้งการเกิดโรคในข้าวขาวดอกมะลิ 105

treatment		parameter				
		การงอก (%)	ความยาวราก (cm)	ความสูงต้น (cm)	ต้นกล้าเกิดราปกคลุม	ดัชนีความแข็งแรง
Control		99	2.12c	7.61a	-	963.27bc
C. lunata		96	2.32c	6.01cd	27a	799.68d
SB6	10^7cfu/ml	99	3.32b	6.67bcd	6c	989.01b
	10^8 cfu/ml	98	3.55b	6.70bc	4c	1004.50b
	10^9 cfu/ml	98	3.57b	6.22bcd	5c	959.42bc
SB9	10^7 cfu/ml	97	3.28b	6.36bcd	10b	935.08bc
	10^8 cfu/ml	99	3.19b	5.97d	7bc	906.84c
	10^9 cfu/ml	97	4.77a	6.88a	3cd	1130.05a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น เปอร์เซ็นต์ 95
control = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

อภิปรายผลการศึกษา

แบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบริเวณนาข้าวจำนวน 10 ไอโซเลต ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* TISTR 3068 ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อราก่อโรคในพืช (บัวสาย เพชรสุริยวงศ์, 2555) ด้วยวิธี Dual culture plate technique จากนั้นทำการศึกษาความสามารถการยับยั้งสูงสุด ด้วยวิธี Agar well diffusion method พบแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 ที่ให้ผลการยับยั้ง *C. lunata* TISTR 3068 มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ Da et al. (2014) กล่าวว่า เชื้อ *B. amyloliquefaciens* s20 สามารถควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* และ *F. oxysporum* ที่ก่อให้เกิดโรคในข้าว มีกลไกลการควบคุมเชื้อสอดคล้องกับงานวิจัยเป็นกลุ่มเชื้อ *Bacillus* sp. เช่น Watanabe, Oyanagi, Suzuki and Tanaka (1990) มีรายงานว่า *Bacillus circulans* WL-12 สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการย่อยสลายไคติน Noronha and Ulhoa (2000) รายงานว่า *B. subtilis* สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม glucanase ได้หลายชนิด และที่มีบทบาทในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยสามารถย่อย glucan ซึ่งเป็นองค์ประกอบผนังเซล์ของเชื้อรา และยังมีสารปฏิชีวนะมีผลยับยั้งการสร้างเซลล์เมมเบรน เปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะ (สายใจ อ่อนแก้ว, 2542) เช่น bacitracin ผลิตจาก *B. licheniformis* สาร polymyxin ผลิตจาก *B. polymyxa* สาร gramicidin และ สาร tyrocidine ผลิตจาก *B. brevis* สาร

subtilin และ bacilycin ผลิตจาก *B. subtilis* (Erkendur, Ole, Henning, Agens, Michele, Ida and Anne, 2000) และจากการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียในการยับยั้ง *C. lunata* ซึ่งเป็นสาเหตุในการก่อโรคกล้าเน่าซึ่งวัสดุเพาะที่ใช้ในการทดสอบคือกระดาษทิชชู พบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียเท่ากับ 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/ml แบคทีเรีย *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* TISTR 3068 ได้ดีเมื่อเทียบกับ *C. lunata* โดยความเข้มข้นเริ่มต้น 10^9 cfu/ml ของ *Bacillus* sp. SB9 ให้ผลความยาวรากเท่ากับ 4.77 เซนติเมตร และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าเท่ากับ 1130.05 ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นนั้นแบคทีเรีย SB9 ให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Control) แต่ชุดควบคุมนั้นให้ผลของความสูงต้นมากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ *Bacillus* sp. SB9 ที่ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml และ Niranjan Raj,Chaluvaraju, Amruthesh and Shetty (2003) พบว่า *Bacillus* spp. มีคุณสมบัติเป็น plant growth promotion rhizobacteria (PGPR) และมีคุณสมบัติในการชักนำให้ pearl millet (*Pennisetum glaucum*) เกิดความต้านทานโรคราน้ำค้าง โดย *Bacillus* spp. ส่งเสริมการงอกของเมล็ดพืชให้สูงขึ้น และ ส่งเสริมการเจริญทางด้าน vegetative growth เช่น ความสูง พื้นที่ใบ จำนวนของ tillers และส่งเสริมการเจริญทางด้าน reproductive growth เช่น เพิ่มขนาด ความยาวของผล เพิ่มน้ำหนักผลผลิตให้สูงขึ้น

สรุปผลการศึกษา

คัดเลือกแบคทีเรียจากดินในนาข้าวที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* TISTR 3068 เชื้อราสาเหตุโรคกล้าเน่า พบแบคทีเรีย 10 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี dual culture method และทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้สูงสุดโดยวิธี agar well diffusion method พบแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* TISTR 3068 มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ คือ *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 รวมถึงช่วยส่งเสริมให้กล้าข้าวเจริญแข็งแรงในด้านของการเพิ่มความยาวราก ความสูงลำต้น ดังนั้นแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 จึงสามารถนำไปพัฒนาเพิ่มเติมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ควบคุมเชื้อราก่อโรค ซึ่งช่วงลดการใช้สารเคมีได้ หรือเพิ่มคุณภาพของผลผลิตข้าวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ศิริลักษณ์ สันพา ที่ให้คำแนะนำในการเขียนบทความวิจัย และ อำนวย ยอดเมือง ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวในงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

บัวสาย เพชรสุริยวงศ์ นงพงา คุณจักร และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. (2555). การแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 กรุงเทพฯ.

พรรณลดา ติตตะบุตร. (2554). การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช. การศึกษาค้นคว้าด้วยตัวเอง วท.ด. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา.

สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2552) โรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทยและการป้องกันกำจัด. จังหวัดจอนแก่น.

สายใจ อ่อนแก้ว. (2542). สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวของ *Bacillus* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Da, C., L. Xin, L. Chunyu, T. Wei, S. Qirong and S. Biao. 2014. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacteria wilt. Journal of Environmental Management 137: 120-127.

Erkendur, H., Ole, A.O., Henning, A.J., Agens, F., Michele, M., Ida, H., and Anne, B.K. (2000). *Bacillus antracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* one species on the basic of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2627-2630.

Raju, N., S. Niranjana, G. Janardhana, H. Prakash, H. S. Shetty, and S. Mathur. (1999). Improvement of seed quality and field emergence *of Fusarium moniliforme* infected sorghum seeds using biological agents. J. Sci. Food Agric. 79: 206-212.

Taga M., H. Nakagawa, M. Tsuda and A. Ueyama. 1979. Identification of three different loci controlling kasugamycin resistance in Pyricularia oryzae. Phytopathol. 69: 463-466.

Mostapha, N.K. (2004). Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistics bacteria in greenhouse and field conditions. Plant Pathology Journal. 3 : 88-96.

Niranjan, R. S., Chaluvaraju, G., Amruthesh, K.N., and Shetty, H.S. (2003). Induction of growth promotion and resistance against downy mildew on pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by Rhizobacteria. Plant Disease. 87: 380-384.

Noronha, E.F., and Ulhoa, C.J. (2000). Characterization of a 29-KDa β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Fed. Eur. Microbiol. Soc. 183: 119-123.

Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., and Tanaka, H. (1990). Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 importance of chitinase A1 in chitin degradation. J. Bacteriol. 172: 4017-4022.