

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 20W1
ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*
Efficiency of Bioproduct from *Bacillus subtilis* Isolate 20W1 to Control
Alternaria brassicicola a Causal Agent of Chinese Kale Leaf Spot

บุษราคัม อุดมศักดิ์^{1/} ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล^{1/} สุรีย์พร บัวอาจ^{1/}
บุรณี พัวพงษ์แพทย์^{1/} รสสุคนธ์ รุ่งแจ้ง^{1/}
Boossaracum Udomsak^{1/} Nuttima Kositcharoenkul^{1/} Sureeporn Bua-art^{1/}
Buranee Puawongphat^{1/} Rossukon Rungjang^{1/}

ABSTRACT

Alternaria brassicicola can cause leaf spot symptoms at every growth stages of Chinese kale. Biological control is an alternative technique to reduce chemical usage. However, a limiting factor for biological control is the un-survival of antagonists on plant leaf surface. *Bacillus* bacteria can be a promising antagonist to *A. brassicicola*, which has a special ability in producing endospores that could tolerance and grew well in field condition. During October 2011 – September 2013, 135 isolates of *Bacillus* spp. isolated from soil, manure, and planting materials, were evaluated for the ability to inhibit growth of *A. brassicicola* using dual culture technique. Five isolates effectively inhibited mycelia growth of *A. brassicicola*, namely 20W1 20W5 20W4 20W12 and 17G18. These isolates were then tested for the disease control in the screen house by spraying of its cell suspension prior to the inoculation of the pathogen. We found that all isolates could effectively reduce Chinese kale leaf spot disease to 46.77%, 52.81%, 59.99%, 60.45% and 71.31% respectively compared to 73.79% of the disease in non-antagonist spraying treatment. Field trial at Ta Maka District, Kanchanaburi province also showed results as similar as in screening house experiment. Those 5 isolates of *Bacillus* spp. were formulated into powder formulation and tested again at the same

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

^{1/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture

field. The results showed that all isolates could significantly control the disease better than a non-antagonist spraying treatment. Isolate of *B. subtilis* 20W1 was the most effective antagonist which reduced the disease to 32.88%. Efficacy trial of the 20W1 isolate at 20-30 g/20 L of water showed the disease control at the same level as using mancozeb 80% WP at 40 g/20 L of water and significantly controlled the disease when applied at 40-50 g/20 L of water. In conclusion, *B. subtilis* 20W1 is a new potential isolate which can be developed to the bio-fungicide for a commercial scale.

Key words: Bioproduct, *Bacillus subtilis*, *Alternaria brassicicola*, Chinese Kale Leaf Spot,

บทคัดย่อ

โรคใบจุดคะน้า เกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* เป็นโรคที่มีความสำคัญ ทำความเสียหายกับคะน้าทุกระยะการเจริญเติบโต การควบคุมโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งที่ลดการใช้สารเคมี ดำเนินการคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ระหว่างเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2554 - กันยายน ปี พ.ศ. 2556 โดยคัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี dual culture

technique จาก *Bacillus* spp. จำนวน 135 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่าง ๆ พบว่า ไอโซเลท 20W1 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 มีศักยภาพสูงสุด ในการควบคุมเชื้อ *A. brassicicola* นำทั้ง 5 ไอโซเลท ไปทดสอบการควบคุมโรคเบื้องต้นในโรงเรือนโดยพ่น cell suspension ของ *Bacillus* spp. ก่อนปลูกเชื้อ *A. brassicicola* พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถลดการเกิดโรคได้ โดยมีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.77% 52.81% 59.99% 60.45% และ 71.31% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีความรุนแรงของโรค 73.79% จากนั้นนำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบในแปลงปลูกที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยวิธีการพ่นด้วย cell suspension เช่นกัน พบว่า ทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง และนำไปทดสอบในแปลงปลูกเดิม พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด สามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 อัตรา 20-30 ก./น้ำ 20 ล. ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP (40 ก./น้ำ 20 ล.) และอัตรา 40-50 ก./น้ำ 20 ล. ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 จึงเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่มี

ศักยภาพ สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์
เชิงพาณิชย์ใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าในระดับ
แปลงเกษตรกรได้

คำหลัก : โรคใบจุดคะน้า (*Bacillus subtilis*)
Alternaria brassicicola จุลินทรีย์ปฏิปักษ์
ชีวภัณฑ์

คำนำ

ปัญหาสำคัญของการปลูกคะน้า คือ
โรคใบจุด เกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*
(Schw.) Wiltshire ซึ่งเป็นเชื้อราที่เกิดโรคกับ
พืชผักตระกูลผักกาด เช่น คะน้า ผักกาดขาว
และกะหล่ำปลี เป็นต้น อาการของโรคพบได้
ทุกส่วนของพืช ทั้งใบ ก้านใบ และลำต้น
สามารถพบได้ทุกแหล่งปลูก และทุกระยะการ
เจริญเติบโตของพืช อาการที่เกิดกับพืชต้นแก่
ลักษณะเป็นแผลจุดเล็ก ๆ สีเหลือง มักพบบน
ใบ และก้านใบ แผลจะขยายใหญ่ขึ้นและเปลี่ยน
เป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลมีลักษณะเป็นวง
ค่อนข้างกลม เรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ สปอร์ของ
เชื้อราสามารถแพร่ไปกับ ลม น้ำ แมลง สัตว์
มนุษย์ และติดไปกับเครื่องมือเกษตรกรได้ โรคใบ
จุดคะน้าพบระบาดมากในฤดูฝน หรือสภาพที่มี
ความชื้นสูง (พรพิมล, 2552) โรคนี้สามารถ
แพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อ
ผลผลิต ทำให้ผลผลิตลดลงหรือไม่มีคุณภาพ
เกษตรกรมักเลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด
จึงทำให้เกิดผลกระทบจากการใช้สารเคมีดังกล่าว
การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี จึงเป็นทาง

เลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี และมีการนำ
มาใช้กันอย่างแพร่หลาย ในต่างประเทศมีการ
ผลิตชีวภัณฑ์จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ เช่น
Bacillus subtilis MBI 600 ; Integral[®] หรือ
Bacillus subtilis QST 713 และได้รับการขึ้น
ทะเบียนจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อม
ประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental
Protection Agency ; EPA) (U.S. EPA,
2006)

แบคทีเรีย กลุ่ม *Bacillus* พบได้ทั่วไป
ในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ
เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อย
สลายของซากพืช เป็นแบคทีเรียประเภท
aerobic bacteria สร้างสปอร์ที่เรียกว่า
endospore ซึ่งมีความทนทานต่อสภาพ
แวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง
ขาดแคลนอาหาร หรือกระทบกับแสงอัลตราไว
โอเล็ต endospore ของแบคทีเรีย *B. subtilis*
สามารถเจริญเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ง่ายและ
เจริญเพิ่มปริมาณในธรรมชาติ เมื่อภาวะสภาพ
แวดล้อมเหมาะสม (Baker and Cook, 1974)
นอกจากนี้ *B. subtilis* สามารถสร้างสาร
ปฏิชีวนะ (antibiotic) ไปยับยั้งการเจริญเติบโต
ของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Fiddaman and Rossal,
1994) แต่ไม่พบว่าเป็นพืชต่อมนุษย์ สัตว์ และ
ไม่มีพืชตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม (Shoda, 2000)

ประเทศไทยมีการวิจัยนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์
มาใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่อง และ
สามารถพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์หลายชนิด สามารถ
นำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช พากเพียรและคณะ (2544) ได้ทดสอบเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48 52.53 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ต่ำกว่า กรรมวิธีเปรียบเทียบซึ่งมีความรุนแรงของโรค 65.46% ณีจภูมิมาและคณะ (2548) ได้แยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากดิน รากพืช และปุ๋ยคอก พบว่า 4 จาก 525 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการ เจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* และลด การเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ 70-100% วรรณวิไล และคณะ (2548) ได้ทดลองพ่น *Bacillus* spp. ไอโซเลท WS16 และ WS18 เพื่อควบคุมโรค ใบจุดคะน้าในแปลงปลูก พบว่า ทั้งสองไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้ และในปี พ.ศ. 2550 บุษราคมและณีจภูมิมา (2550) ได้ทดสอบ ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่ง แยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจาก แหล่งต่าง ๆ พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 2G4 22W10 20W12 17G18 และ 20W4 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ 100% และไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพสูงสุดในการ ควบคุมโรคเหี่ยวแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และ *F. solani* ได้ 100%

อมรรัตน์และมณจันทร์ (2539) ศึกษา ความเป็นพิษต่อคน ของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย

ประเภท *B. subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืช โดยทำการทดลองในหนุ่ถั่วฝักยาวเพื่อยืนยันความ ปลอดภัย พบว่า หนุ่ในกลุ่มทดลองที่ได้รับ ชีวภัณฑ์แบคทีเรียผสมอาหารทั้ง 2 ชนิด มี อัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนุ่กลุ่มที่ไ้ รับอาหารปกติ

การนำจุลินทรีย์ไปปฏิบัติการใช้ควบคุมโรค พืชที่ระบบราก มักประสบความสำเร็จ แต่พบว่า มีข้อจำกัดในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดบน ใบ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ไม่ทนต่อสภาพ อุณหภูมิสูง จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน สภาพแปลงปลูก ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่ จะคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด คะน้า เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ และขยาย ผลสู่เชิงพาณิชย์ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ใน การยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากแหล่ง เก็บจุลินทรีย์โรคพืช (culture collection) ของ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 135 ไอโซเลท มาทดสอบศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา *A. brassicicola* โดยวิธี dual culture technique (Morton and Stroube, 1955) ดังนี้ เลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* บน

อาหาร PDA (Potato dextrose agar) จานโคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนอาหาร PSA (Potato sucrose agar) เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นใช้ cork borer เจาะเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* วางลงตรงกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้ออาหาร PDA แล้ว ใช้ Loop แตะที่โคโลนีของ *Bacillus* spp. นำมาขีดบนผิวหน้าอาหารให้เป็นเส้นตรงทั้ง 4 ด้าน ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อรา มีระยะห่างประมาณ 2.5 ซม. โดยใช้ *Bacillus* spp. 1 ไอโซเลท/ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลอง 10 จานเลี้ยงเชื้อ/ไอโซเลท มีน้ำเปล่าหนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) หลังจากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อไปหมักไว้ที่อุณหภูมิ (25 ± 3 °ซ) บนทีกผลโดยวัด inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณใส ๆ ในวุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อรา *A. brassicicola* ไม่เจริญเติบโต วัตรระยะห่างจากแนวเส้นที่ขีดเชื้อ *Bacillus* spp. ถึงขอบโคโลนีเชื้อรา *A. brassicicola* ทั้งสี่ด้าน คำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ของแต่ละจานเลี้ยงเชื้อทดสอบตรวจผลเมื่อเชื้อรา *A. brassicicola* ของกรรมวิธีเปรียบเทียบ เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ไปทดสอบประสิทธิภาพในระดับโรงเรือน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในสภาพโรงเรือนทดลอง

เตรียมพืชทดสอบโดยปลูกคะน้าในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว กระถางละ 5 ต้น จำนวน 20 กระถาง/กรรมวิธี รวมทั้งสิ้น 140 กระถาง เมื่อพืชมีอายุ 60 วัน จึงนำมาทดสอบ

นำ cell suspension ของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหาร PSA เป็นเวลา 48 ชม. ปรับความเข้มข้นเป็น 10^7 โคโลนี/มล. ใส่ในกระบอกฉีดยาแบบอัดลม ฟันลงบนคะน้าที่มีอายุประมาณ 60 วัน ให้ชุ่มทั้งใบและต้น เมื่อครบ 24 ชม. จึงพ่น cell suspension เชื้อรา *A. brassicicola* ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มล. โดยมีกรรมวิธีการพ่นด้วยน้ำ แทนการใช้แบคทีเรีย (negative control) และกรรมวิธีการพ่นด้วย *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว (positive control) เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี บันทึกความรุนแรงของโรคหลังการทดสอบ 21 วัน โดยประเมินพื้นที่ใบที่ถูกทำลาย เปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด ตรวจจุดใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น สุ่มนับจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ

3. ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในแปลงปลูก

3.1 การเตรียมแปลงทดสอบ

ดำเนินการทดลองที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี เตรียมแปลงขนาด 1.2 x 5 ม. ระยะห่างระหว่างแปลง 0.8 ม. หว่านเมล็ด

คะน้ำ 4 แถว ระยะห่างระหว่างแถว 25 ซม. จากนั้นถอนแยกต้นกล้าให้มีระยะห่างระหว่างต้น ประมาณ 10 ซม. และทำการทดสอบเมื่อคะน้ำ มีอายุ 35 วัน

3.2 เตรียมแบคทีเรียและเชื้อราสำหรับ ฉีดพ่น

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกไว้จำนวน 5 ไอโซเลท บนอาหาร PSA เป็นเวลา 48 ชม. นำมาทำเป็น cell suspension โดยเติมน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อปริมาณ 20 มล./จาน เลี้ยงเชื้อ ใช้ลูปชูดเอาเซลล์แบคทีเรียที่เจริญบน อาหารออกมาอยู่ในน้ำ จากนั้นนำไปกวนให้ เซลล์กระจายได้ดีด้วยเครื่องกวนสาร และปรับ ความเข้มข้นโดยเติมน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อลงไปให้มี ความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนี/มล. สำหรับ เชื้อรา *A. brassicicola* เตรียมโดยเลี้ยงบน อาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมา ทำเป็น cell suspension โดยใช้ น้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^4 สปอร์/มล.

3.3 วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W4
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W12
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 17G18
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วย cell suspension ของ

Bacillus spp. ไอโซเลท 20W5

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 ก./น้ำ 20 ล.

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า กรรมวิธีควบคุม negative control

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย *A. brassicicola* กรรมวิธีควบคุม positive control

ฉีดพ่น cell suspension ของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เตรียมไว้ลงบนต้นคะน้ำ โดยใช้เครื่องพ่นชนิดอัดลม พ่น 2 ครั้ง ๆ ที่ 1 ก่อนพ่นเชื้อ *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน และครั้งที่ 2 หลังจากพ่น *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน บันทึกความรุนแรงของโรค 3 5 และ 7 วัน หลังการฉีดพ่นแบคทีเรีย สุ่มตรวจ ต้นคะน้ำจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจประเมินใบคูที่ 2 นับจากโคนต้นไปสู่ออด จำนวน 4 ใบ/ต้น โดย ประเมินสัดส่วนพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายนำมา คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

4. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้ำใน แปลงปลูก

4.1 การเตรียมชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลท ในอาหาร PSB (Potato sucrose broth) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชม. หลังจากนั้น เติมน้ำ Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 และเติมผงทัลคัม 4 เท่า ของปริมาตรอาหาร

เลี้ยงเชื้อ คนให้เข้ากัน นำไปฝังในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) นำมาบดให้ละเอียด ใส่ในขวดแก้ว และถุงพลาสติก ปิดปากถุง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะทดสอบ

4.2 การเตรียมแปลงทดลอง และการฉีดพ่นชีวภัณฑ์

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดำเนินการทดลองที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยนำชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง มาละลายน้ำใน อัตรา 40 ก./น้ำ 20 ล. ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 โดยฉีดพ่นลงบนต้นคะน้าที่เตรียมไว้ 2 ครั้ง คือ ก่อนและหลังการพ่นเชื้อรา *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน และหลังการพ่น *A. brassicicola* 2 วัน

บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลาย เปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคโดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจสอบใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ประเมินที่ 3 5 และ 7 วันหลังการทดสอบ

5. การจำแนกชนิดแบคทีเรีย *Bacillus*

ใช้ชุดจำแนกชนิดแบคทีเรียสำเร็จรูป API[®] strip range technique เลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลท บนอาหาร NA (Nutrient Broth) ให้มีอายุไม่เกิน 24 ชม. จากนั้นใช้ลูปชุดโคโลนีแบคทีเรียมาละลายในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.8 - 0.85% กวนให้ละลาย

ไม่จับตัวเป็นก้อน แล้วนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย มาใส่ในอาหารเหลว CHB Medium และวัดค่า OD (Optical Density) ที่ช่วงคลื่น 600 nm ปรับให้ได้ค่า OD (Optical Density) = 0.45 จากนั้นดูตมมาใส่ในช่องหยดตัวอย่างของทดสอบ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/ช่อง บ่มไว้ที่ 30 - 37 °C. อ่านผลที่ 12 และ 24 ชม. แล้วเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูลของชุดตรวจทางเว็บไซต์ (<http://apiweb.biomeriewx.com/servlet/Authenticate?action=prepare>)

6. การทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

เตรียมแปลงปลูกคะน้า ที่ อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี จำนวน 32 แปลงย่อย ขนาดแปลง เท่ากับ 1.50 x 30 ม. ปลูกคะน้าโดยวิธีหยอดเมล็ด 6 แถว/แปลง เมื่อคะน้าอายุได้ 35 วัน ทำการพ่นสารละลายชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 อัตราต่าง ๆ ตามกรรมวิธี โดยใช้วิธีปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลอง ข้อ 4

วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ มี 8 กรรมวิธีคือ อัตราต่าง ๆ ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* 20W1 สูตรผง ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 อัตรา 20 ก./น้ำ 20 ล.
- กรรมวิธีที่ 2 อัตรา 30 ก./น้ำ 20 ล.
- กรรมวิธีที่ 3 อัตรา 40 ก./น้ำ 20 ล.
- กรรมวิธีที่ 4 อัตรา 50 ก./น้ำ 20 ล.
- กรรมวิธีที่ 5 อัตรา 60 ก./น้ำ 20 ล.
- กรรมวิธีที่ 6 สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb 80% WP อัตรา 40 ก./น้ำ 20 ล.

กรรมวิธีที่ 7 กรรมวิธีควบคุมฉีดพ่นสปอร์
เชื้อรา *A. brassicicola*

กรรมวิธีที่ 8 กรรมวิธีควบคุมฉีดพ่นน้ำเปล่า
บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมิน
พื้นที่ใบและก้านใบที่ถูกทำลาย คำนวณเป็น
เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและก้านใบ
ทั้งหมด โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ
ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น
ประเมินที่ 7 วัน หลังการทดสอบ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้ง เชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบ พบว่า มีแบคทีเรีย
Bacillus spp. จำนวน 90 ไอโซเลทจาก 135
ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola*
บนอาหาร PDA ได้และมีเพียง 5 ไอโซเลท ที่มี
ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของ
เส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* ได้แก่ 20W4
20W1 20W5 20W12 และ 17G18 โดยมีค่า
เฉลี่ยความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ
1.68 1.60 1.58 1.46 และ 1.36 ซม. ตาม
ลำดับ (Table 1)

2. ประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการ ควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus*
spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในโรงเรือน
ทดลอง พบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรง
ของโรคหลังฉีดพ่นด้วยไอโซเลท 20W1 20W5

Table 1 The efficacy of 5 *Bacillus* spp.
isolates to inhibit the mycelial growth of
Alternaria brassicicola, a causal pathogen
of chinese kale leaf spot

<i>Bacillus</i> spp. isolates	Average of Inhibition zone (cm) ¹
20W4	1.68
20W1	1.60
20W5	1.58
20W12	1.46
17G18	1.36

¹ Average of 10 replications

20W4 20W12 และ 17G18 เท่ากับ 46.77
52.81 59.99 60.45 และ 71.31 ตามลำดับ
ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความ
รุนแรงของโรคเท่ากับ 73.79 *Bacillus* spp.
ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้ เมื่อ
เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus*
spp. โดยไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุด
ในการลดการเกิดโรค (Table 2)

3. ประสิทธิภาพของ cell suspension แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรค ใบจุดคะน้าในแปลงปลูก

หลังการทดสอบ 3 วัน พบว่า *Bacillus*
spp. ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการ
ควบคุมโรค โดยมีความรุนแรงของ
โรคต่ำสุดเท่ากับ 2.70% รองลงมาได้แก่ 20W4
(2.91%) และไม่มีความแตกต่าง จากกรรมวิธีที่
พ่นด้วย mancozeb ซึ่งมีค่าเฉลี่ยความรุนแรง
ของโรคเท่ากับ 1.40% (Table 3) ขณะที่

Table 2 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* at 21 days after application with cell suspension of 5 selected *Bacillus* spp. isolates in screen house

<i>Bacillus</i> spp. isolates	Average Infected leaf area (%) ^{1/}
20W1	46.77
20W5	52.81
20W4	59.99
20W12	60.45
17G18	71.31
Control (+) ^{2/}	73.79

^{1/} = Average of 20 replications

^{2/} = apply with spore suspension of *Alternaria brassicicola*

ไอโซเลท 20W12 มีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 6.44% โดยทั้ง 3 ไอโซเลท มีความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. (13.36%) อย่างมีนัยสำคัญ

หลังการทดสอบ 5 วัน พบว่า ความรุนแรงของโรคบนคะน้าเปลี่ยนไป โดยกรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งความรุนแรงของโรคได้สูงสุด ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท 20W1 ซึ่งมีค่าความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.79 6.23 และ 1.90% ตามลำดับ และแตกต่างจากกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. (21.68%) (Table 3)

หลังการทดสอบ 7 วัน พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพสูงสุด

Table 3 Efficacy of cell suspension of 5 *Bacillus* spp isolates on inhibition of Chinese kale leaf spot disease severity at 3 5 and 7 days after application at farmer's farm in Kanchanaburi province during 2013

<i>Bacillus</i> spp. isolates	Infected leaf area (%)		
	3 DAI ^{1/}	5 DAI ^{1/}	7 DAI ^{1/}
20W4	2.91 a ^{2/}	2.79 a	1.23 a
20W12	6.44 ba	10.38 cb	12.86 c
20W1	2.70 a	6.23 ba	8.72 cb
17G18	10.82 cb	15.24 dc	14.02 c
20W5	12.70 cb	14.60 dc	13.93 c
mancozeb 80% WP	1.40 a	1.90 a	2.42 ba
Control (-)	0.00 a	0.12 a	0.14 a
Control (+)	13.36 c	21.68 d	23.50 d
CV (%)	68.33	50.73	40.60

^{1/} Days after inoculation

^{2/} Means in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT
control (-) = with water
control (+) = apply with *Alternaria brassicicola*

ในการยับยั้งการเกิดโรค โดยพบความรุนแรงของโรคเพียง 1.23% ขณะที่กรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb มีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.42% โดยทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 23.50 (Table 3)

4. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

หลังการทดสอบ 7 วัน กรรมวิธีที่มีการพ่น *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญ (Table 4) การพ่นด้วย *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1 20W5 17G18 และ 20W4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 41.26 43.55 43.88 และ 48.52 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุดคะน่าสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นชีวภัณฑ์ สูตรผง *Bacillus* spp.

5. การจำแนกชนิดของ *Bacillus* spp. ด้วยชุดสอบ สำเร็จรูป API® strip range

Bacillus spp. ไอโซเลท 20W5 20W12 20W4 และ 20W1 คือ *B. subtilis* ส่วนไอโซเลท 17G18 คือ *B. licheniformis* (Figure 1) ซึ่งเป็นสปีชีส์หนึ่ง ที่ได้รับการขึ้น

Table 4 Efficacy of wettable powder suspension of 5 *Bacillus* spp isolates on inhibition of Chinese kale leaf spot disease severity at 7 days after application at farmer's farm in Kanchanaburi province during 2013

<i>Bacillus</i> spp. isolates	Infected leaf area (%)
20W1	41.26 c
20W5	43.55 c
17G18	43.88 c
20W4	48.52 c
20W12	61.70 d
mancozeb 80% WP	23.37 b
Control (-)	0.00 a
Control (+)	79.70 e
CV (%)	11.21

control (-) = apply with water
control (+) = apply with *Alternaria brassicola*
Mean in the column, followed by a common letter are not significantly different at 5% by DMRT

ทะเบียนในต่างประเทศ ให้จำหน่ายเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช เช่นกัน

6. อัตราการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก



Figure 1 The colonies of *Bacillus subtilis* 20W1, on Potato Sucrose Agar medium

การพ่นด้วยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลข 20W1 ทุกอัตราที่ทดสอบ สามารถลดการเกิดโรคได้ การใช้ชีวภัณฑ์สูตรผง อัตรา 20 และ 30 ก./น้ำ 20 ล. ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP การใช้ชีวภัณฑ์อัตรา 40 และ 50 ก./น้ำ 20 ล. (Table 5) ให้ผลดีที่สุดคือ มีการเกิดโรคใบจุดเพียง 1.88 และ 0.91% ขณะที่การพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 ก./น้ำ 20 ล. พบการเกิดโรค 7.29%

Table 5 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* at 7 days after application with various doses of wettable powder suspension of *Bacillus subtilis* (20W1), at farmer's farm in Kanchanaburi province during 2013

<i>Bacillus subtilis</i> 20W1 wettable powder (g./20 l of water)	Infected leaf area (%)
20	7.79 b
30	5.76 b
40	1.88 a
50	0.91 a
60	5.85 b
mancozeb 40 g.	7.29 b
Control (-)	0.40 a
Control (+)	24.00 c
CV (%)	36.92

Mean in the column, followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

จากผลการทดลอง จะเห็นว่า การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลข โดยการพ่นด้วย cell suspension นั้น ไอโซเลขที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ 20W4 แต่เมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลข มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง พบว่า ไอโซเลข 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด

สรุปผลการทดลอง

แยกเชื้อและคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture ได้คัดเลือก 5 ไอโซเลขนำไปทดสอบการควบคุมโรคใบจุดในแปลงปลูกคะน้า จำแนกชนิดของ *Bacillus* พบว่า เป็นชนิด *B. subtilis* จำนวน 4 ไอโซเลข อีกหนึ่งชนิดเป็น *B. amyloliquifaciens* *B. subtilis* ไอโซเลข 20W1 ที่ผลิตเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง เพื่อใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *B. subtilis* โดยอัตราการใช้ชีวภัณฑ์ *Bacillus* 20W1 สูตรผงที่เหมาะสมคือ 40-50 ก./น้ำ 20 ล.

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ดร. ศรีสุข พูลผลกุล เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนขอคิดเห็นต่าง ๆ ในการดำเนินการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล, รัศมี จิตติเกียรติพงษ์, อรพรรณ วิเศษสังข์ และวงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 90-105. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศและแตงกวา. หน้า 210-211. ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ. (บทคัดย่อ) ครั้งที่ 8, 20-22 พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อ. เมือง จ. พิษณุโลก.
- บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 988 -1005. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิจิตศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2544. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. วารสารวิชาการเกษตร 19(1) : 4-12.
- พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคใบจุด. หน้า 93-94. ใน: คู่มือโรคผัก. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และวารภรณ์ สุทธิสา. 2548. การควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ด้วยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์. หน้า 123-130. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 40 ม.เกษตรศาสตร์
- อมรรัตน์ ทศนกิจ และ มณจันทร์ เมฆธน. 2539. การศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชในหนุ่ถีบจักร. หน้า 99-104. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 34 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539 กรุงเทพฯ.
- Baker, K.F. and R. J. Cook. 1974. *Biological Control of Plant Pathogen*. W.H.Freeman, San Francisco. 433 p.
- U.S.Environment Protection Agency. (2006) Available at : WWW.epa.gov/biotech__rule/pubs/fra/fra009.htm., Accessed : 28 November 2015
- Fiddaman, P. J. and S. Rossall. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*, *J. Appl. Bacteriol.* 76 (4) : 395-405.
- Morton, D.J. and W.H. Stroube. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology.* 45:417-420.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. *Biosci. Bioeng.* 89: 515-521.