ศึกษาอัตราและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของมะนาว

The Rate and Duration of the Appropriate Use of Biological Product by *Bacillus subtilis* to Control of Lime Canker

นลินี ศิวากรณ์[1/] เพลินพิศ สงสังข์[1/] วสันต์ ผ่องสมบูรณ์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผลิตภัณฑ์น้ำหมักและผลิตภัณฑ์ผงเชื้อต่อโรคแคงเกอร์ของมะนาวในแปลงปลูกอำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม พบว่าสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์แสดงคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 31.47% ให้น้ำมะนาวที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.32 และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 330 กรัม ผลมะนาวร่วงก่อนการเก็บเกี่ยวขนาดผลจึงมีขนาดเล็กทำให้น้ำหนักผลที่ได้ต่ำหว่ากรรมวิธีอื่นๆ เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผงเชื้อ แสดงความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 39.94% ให้น้ำมะนาวที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.32 และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 390 กรัม และทรงต้นที่สมบูรณ์ใบมีขนาดใหญ่สีเขียวเข้ม เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปน้ำหมักแสดงความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 43.53% ให้น้ำมะนาวที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.33 และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 340 กรัม และกรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) แสดงความรุนแรงของการเกิดโรค 54.02 % ให้น้ำมะนาวที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.32 และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 370 กรัม จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแม้การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผงจะไม่แสดงคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำที่สุดแต่ผลผลิตที่ได้มีผลขนาดใหญ่ผลไม่ร่วงก่อนถึงระยะเก็บเกี่ยวทรงต้นสมบูรณ์แข็งแรงใบมีสีเขียวเข้มจึงนับได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผงเชื้อให้ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคได้ดีที่สุด

รหัสทะเบียนวิจัย 01-35-54-01-03-00-01-54

คำนำ

โรคแคงเกอร์ของมะนาวมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (synonym *X. campestris* pv. *citri*) เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถเข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่เหนือพื้นดินตั้งแต่ ใบ กิ่งก้าน ผล และเชื้อสาเหตุนี้สามารถอาศัยอยู่บนต้นมะนาวได้ทุกฤดูกาล โดยมากมักพบระบาดรุนแรงในฤดูฝน จากการศึกษาโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยจัดเป็นพวก Canker A (Uematsu และคณะ, 1993) การป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ในปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพโดยตรงต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุนี้ ซึ่งโดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารประกอบคอปเปอร์ฉีดพ่นต่อเนื่องเป็นประจำ ทำให้ระบบนิเวศวิทยาถูกทำลายและมีสารประกอบคอปเปอร์ตกค้างในผลิตผล ส่วนการใช้ยาปฏิชีวนะกับโรคแคงเกอร์ทำให้เกิดการสะสมของยาในผลผลิตซึ่งจะทำให้มนุษย์ได้รับสารปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็นอันอาจทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคในระยะที่เกิดการเจ็บป่วยได้ ซึ่งก็เป็นอันตรายที่จะแนะนำให้เกษตรกรนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในทางการเกษตร จุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้มีการศึกษากันมามีหลายชนิดได้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส เชื้อรา และสัตว์ชนิดเล็กๆที่กินจุลินชีพเป็นอาหาร เช่น โปรโตซัว ไส้เดือนฝอย และไร แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและย่อยสลายอาหารได้กว้างในสภาพแตกต่างกันทั้งยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Kenneth and Cock,1982) นลินีและคณะ(2528) พบว่าเชื้อ actinomycetes ที่แยกได้จากดินในท้องที่ต่างๆ สามารถสร้างปฏิชีวนสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโรคพืชได้หลายชนิด นลินีและคณะ (2534) พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งของข้าวจาก94%เป็น19% และจากการศึกษาการควบคุมโรคแคงเกอร์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในแปลงทดลองที่จังหวัดอยุธยาพบว่า *Bacillus subtilis* strain WD20 สามารถลดการเกิดโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยสามารถลดความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนส้มโอได้ 24% ในขณะที่คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์สามารถลดความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ได้เพียง 4.10 % การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีก็เป็นกรรมวิธีหนึ่งในการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน เพื่อการจัดการโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพป้องกันการดื้อยาของสารเคมี รวมทั้งพิษตกค้างในอาหาร เพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เข้าไปครอบครองพื้นที่ก่อนที่เชื้อสาเหตุโรคจะเข้าทำลาย เพื่อกระตุ้นหรือชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งการปฏิบัติดังกล่าวจะลดการใช้สารเคมีได้ และลดการระบาดของโรคอย่างรุนแรงได้ ซึ่งวิธีดังกล่าวควรได้ศึกษาเพื่อให้สามารถนำมาใช้ในการจัดการควบคุมโรคแคงเกอร์มะนาว โดยการดัดแปลงหรือพัฒนาให้มีความเหมาะสมต่อสภาพการผลิตมะนาว อันจะเป็นแนวทางให้เกษตรกรสามารถเลือกและเพิ่มมูลค่าของผลผลิตที่ปราศจากพิษตกค้าง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงปลูกมะนาวที่ต.มหาสวัสดิ์ อ.ศาลายา จ.นครปฐม
2. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* strain WD20
3. สารจับใบ และสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77%WP.
4. กล้องจุลทรรศน์, เครื่องแก้ว, ตาชั่ง, เครื่องเขย่า
5. ผงทัลคัม, เมทิลเซลลูโล, แมกนีเซียมซัลเฟต
6. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA, PDA, NA, PSB, PDB และ NB

วิธีการ

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผลิตภัณฑ์น้ำหมักและผลิตภัณฑ์ผงเชื้อต่อโรคแคงเกอร์ของมะนาวในแปลงปลูกอำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม

1. การเตรียมผลิตภัณฑ์ในรูปน้ำหมัก *B. subtilis* WD 20 โดยเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในอาหารเหลวPSB จำนวน1 ลิตร เป็นเวลา 10 วันในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นใส่ในถังหมักขนาด 60 ลิตรโดยผสมด้วยน้ำมันฝรั่ง 4 ลิตรและกากน้ำตาล 400 มล.และน้ำ 15 ลิตร หมักไว้เป็นเวลา 1 เดือน

2.การเตรียมผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 โดยใช้เข็มเขี่ยหัวกลมเขี่ยเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เลี้ยงในหลอดอาหาร PSA จำนวน 1 loop มาใส่ในอาหารเหลว PSBที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มล. แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าอัตราความเร็ว 145-150 รอบ/นาทีเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นจึงเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและเมททิลเซลลูโลสลงไปในขวดเลี้ยงเชื้อ กวนให้เข้ากัน นำส่วนผสมทั้งหมดค่อย ๆเทใส่ลงในผงทัลคัมที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันและนำมาเทใส่ถาดที่วางรองด้วยอลูมินั่มฟอยล์เกลี่ยให้เรียบและผึ่งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน แล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียด

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 บนต้นมะนาว

3.1 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบRCB มี 4 กรรมวิธี ๆละ 5 ซ้ำ ๆละ 1 ต้น ดังนี้

1. ฉีดพ่นด้วยน้ำหมักจากเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 อัตรา 80 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร

2. ฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เตรียมไว้ในข้อ2 อัตรา 250 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

3. ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

4. ฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

3.2 การปฏิบัติการทดลอง นำสารละลายตามกรรมวิธีที่เตรียมไว้ในข้อ3.1 ผสมสารจับใบอัตรา 5 มล./น้ำ 20 ลิตร แล้วนำไปฉีดพ่นบนต้นมะนาวแต่ละต้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่กำหนดไว้ในแต่ละต้น และกำหนดผลมะนาวที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม.อายุผลมะนาว 2 สัปดาห์ถึง 1 เดือนและไม่เป็นโรคแคงเกอร์เพื่อเป็นตัวแทนในการตรวจการเกิดโรคในแต่ละต้นจำนวน 30 ผล/ต้น โดยฉีดพ่นทุกสัปดาห์ด้วยถังฉีดยาแบบติดเครื่องยนต์สะพายหลังจนถึงระยะแก่เต็มที่สามารถเก็บเกี่ยวได้เป็นเวลา 3 เดือน(ผลมะนาวมีระยะตั้งแต่ออกดอกจนถึงเก็บกี่ยวเป็นเวลา 5 เดือน)

3.3 การบันทึกข้อมูล ตรวจและประเมินให้คะแนนความรุนแรงระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนผลมะนาวในแต่ละผลตามคู่มือการประเมินระดับคะแนนของ James (1971) ดังนี้

0 = ไม่พบเกิดโรคแคงเกอร์

1 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 1-5 %ของพื้นที่รอบผล

2 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 11-25 %ของพื้นที่รอบผล

3 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 11-25 %ของพื้นที่รอบผล

4 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 26-50 %ของพื้นที่รอบผล

5 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 51-75 %ของพื้นที่รอบผล

6 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 76-100 %ของพื้นที่รอบผล

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคตามวิธีของ Horsfall and Heuberger (1942) ดังนี้

$$\text{ความรุนแรงของการเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวม (ระดับ x จำนวนใบของแต่ละระดับ)}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด x ระดับสูงสุด}} \times 100$$

และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ

ระยะเวลาและสถานที่

- มกราคม 2554 – กันยายน 2554
- ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- แปลงมะนาวของเกษตรกร ต.มหาสวัสดิ์ อ.ศาลายา จ.นครปฐม

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผลิตภัณฑ์น้ำหมักและผลิตภัณฑ์ผงเชื้อต่อโรคแคงเกอร์ของมะนาวในแปลงปลูกอำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม พบว่าสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์แสดงคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 31.47% ให้น้ำมะนาวที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.32 และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 330 กรัม เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผงเชื้อ แสดงความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 39.94% ให้น้ำมะนาวที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.32 และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 390 กรัม เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปน้ำหมักแสดงความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 43.53% ให้น้ำมะนาวที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.33 และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 340 กรัม และกรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) แสดงความรุนแรงของการเกิดโรค 54.02 % ให้น้ำมะนาวที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.32 และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 370 กรัม (ตารางที่1) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์แสดงคะแนนการเกิดโรคบนผลต่ำที่สุดแต่ให้น้ำหนักผลที่ต่ำที่สุดโดยผลมะนาวมีขนาดเล็ก เนื่องจากการใช้สารเคมีทำให้ต้นมะนาวมีใบเหลืองลูกร่วงก่อนกำหนดและช่อผลในแต่ละช่อจะมีผลทยอยเกิดขึ้นใหม่ทดแทนผลที่ร่วงไปทำให้ผลใหม่มีขนาดเล็กจึงทำให้น้ำหนักของผลน้อยและความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นบนผลก็จะต่ำกว่ากรรมวิธีอื่นๆ คะแนนการเกิดโรคที่เกิดขึ้นจึงมิได้เกิดจากการอายุของผลที่มีขนาดอายุที่เท่ากัน ดังนั้นการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์จึงไม่ใช่กรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆที่ทดสอบ การใช้น้ำหมักที่มีส่วนผสมของกากน้ำตาลซึ่งเป็นอาหารและเป็นประโยชน์ทั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 และเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคจึงทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคแคงเกอร์สูงแต่คะแนนการเกิดโรคที่เกิดขึ้นก็ต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ ส่วนการใช้ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ผลมะนาวจะติดอยู่บนต้นนาน ต้นมีความสมบูรณ์ใบมีสีเขียวเข้มและมีขนาดใหญ่ ผลผลิตมีขนาดใหญ่กว่าปกติทำให้น้ำหนักผลมะนาวสูงกว่ากรรมวิธีอื่น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการใช้เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผงให้ประสิทธิภาพในด้านการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของมะนาวและขนาดน้ำหนักของผลผลิตสูงทรงต้นที่สมบูรณ์ใบมีขนาดใหญ่สีเขียวเข้ม โดยมีคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคแคงเกอร์ 39.94% น้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 390 กรัม ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรค 54.02 %และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 370 กรัม ส่วนสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์แสดงคะแนนความรุนแรง

ของการเกิดโรคเฉลี่ย 31.47%และน้ำหนักผลผลิตของผลมะนาวต่อ10 ผลเท่ากับ 330 กรัม ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อแม้คะแนนการเกิดโรคแคงเกอร์ไม่แสดงค่าต่ำที่สุดแต่ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต้นสมบูรณ์แข็งแรง

เอกสารอ้างอิง

นลินี จาริกภากร ภาณี หนูนิ่ม บุญมี วารินสอาด พิรุณ จันทนกุล เอนกชัย.2534. การป้องกันกำจัดโรค ข้าวโดยเชื้อบักเตรี *Bacillus subtillis* รายงานการสัมมนาทางวิชาการความก้าวหน้าเทคโนโลยีชีวภาพการกสิกรรมและสิ่งแวดล้อม ณ โรงแรมเชียงใหม่ออร์คิด จ. เชียงใหม่หน้า 257-272

นลินี ศิวากรณ์ สุเนตรา ภาวิจิตร วินิดา ฐิตะฐาน และสำเนา ศรุตานนท์ 2528.การศึกษาปฏิชีวนภาพของเชื้อ Actinomycetes ในดินต่อเชื้อบักเตรีโรคพืช รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2528. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา หน้า 301-311.

Kenneth,F.B.,and R.J.Cock. 1982.Biological control of plant pathogens. Publish by The American Phytopathoiogical Society.St.Paul,Minnesota.433p.Res. Commun 110: 194-199.

Uematsu, T.,Chuenchitt, S.Karnjanarat, S., Vivithajinda, S.,Nabheerong, S.,Benjathikul, S.,Nilmanee, S.,Dhirabhava, W. and Buanghuwon, D.1983.Bacterial Diseases on Economic Crops in Thailand, Topoical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan and Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ต่อโรคแคงเกอร์บนผลมะนาว

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ย % การเกิดโรค	ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำมะนาว	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผล /10 ลูก (กรัม)
น้ำหมักจากเชื้อ *B. subtilis*	43.53	2.33	340
ผงเชื้อ *B. subtilis*	39.94	2.32	390
คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์	31.47	2.32	330
น้ำ (Control)	47.72	2.32	370