ผลของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ท้องถิ่นในการควบคุมโรคราดำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

หริพันธุ์ สมนิล[1], ทัศนุพันธุ์ กุศลสถิตย์[2] และปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์[2]

Effects of Indigenous *Bacillus* spp. in Controlling Black Mold Disease of Indian Oyster Mushroom

Haripan Somnil[1], Thassanupan Gusolsatit[2] and Punnawich Yenjit[2]

[1]นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาการจัดการการเกษตร เทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ 6000

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ 6000

[1]Master's degree student in Agricultural Management, Faculty of Agricultural Technology and Industrial Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University, Nakhon Sawan, 60000

[2]Department of Agricultural Technology, Faculty of Agricultural Technology and Industrial Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University, Nakhon Sawan, 60000

*Corresponding author. E-mail: mr.haripan.2526@hotmail.com

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แยกได้จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยวิธี Dilution spread plate เมื่อทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Dual culture พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีการยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เป็นสาเหตุโรคราดำในช่วง 44.5-75.7 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 และ สายพันธุ์ 3 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* จึงนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์รูปแบบผง ซึ่งให้ผลในการควบคุมโรคราดำและเพิ่มผลผลิตดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานได้มากกว่ากรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้ชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ร่วมกันกับ สายพันธุ์ 3 พบการเกิดโรคราดำต่ำที่ 24.98 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (24.84 เปอร์เซ็นต์) และทำให้ได้ผลผลิต (595.35 กรัมต่อถุง) สูงกว่าการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (488.96 กรัมต่อถุง) จากนั้นชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ถูกนำมาเพิ่มจำนวนเซลล์ในน้ำนมวัว UHT และน้ำมะพร้าวอ่อน แล้วใช้ในการควบคุมโรคราดำพบว่าสามารถควบคุมโรคราดำได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม โดยเฉพาะชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2 ที่เพิ่มจำนวนในน้ำนมวัว UHT พบการเกิดโรคราดำเพียง 17.23เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตเห็ดสูงสุดที่ 732.51 กรัมต่อถุง ในขณะที่กรรมวิธีการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมพบการเกิดโรคที่ 19.75 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตเห็ดต่ำกว่าที่ 612.95 กรัมต่อถุง

คำสำคัญเห็ด :นางฟ้าภูฐาน บาซิลลัส โรคราดำ การควบคุมโดยชีววิธี

Abstract

Bacillus spp. were isolated from Indian oyster mushroom using dilution spread plate technique. In dual culture test, all strains provided 44.5 - 75.7 % inhibition against the mycelial growth of *Aspergillus niger*, a causal agent of Black mold disease. *Bacillus* spp. strains 2 and 3 presented high efficacy in *A. niger* inhibition and they were formulated as powder bio-products and used to control Black mold disease. These bio-products showed significant effects to control Black mold disease and to increase the yield of Indian oyster mushroom when compared

with the control (Sterile distilled water). Moreover, the bio-product of strain 2 combined with strain 3 showed 24.98% of black mold disease, which did not significantly differ when compared with Carbendarzim fungicide (50%wp). The bio-product combination of strain 2 and strain 3 in controlling Black mold disease provided the higher mushroom yield (595.35 g/bag) than Carbendarzim fungicide (488.96 g/bag) in a 30-day period. Bio-products of *Bacillus* strain 2 was increased the cell numbers in cow milk UHT and young coconut water and these *Bacillus* cultures were used to control Black mold disease at 1.5 mL per 1 L water. The results found that all of *Bacillus* cultures provided the Black mold disease control did not significantly differ when compared with Carbendarzim fungicide. Especially, the treatment of increasing *Bacillus* cell numbers stain 2 in cow milk UHT was found disease severity of only 17.23% and gave the highest mushroom yield at 732.51 g/bag, while the Carbendazim treatment showed the disease severity at 19.75% and gave the lower mushroom yield at 612.95 g/bag.

Keywords: Indian oyster mushroom, *Bacillus* spp., Black mold disease, Biological control

คำนำ

เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus pulmonarius*) เป็นเห็ดเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สามารถเพาะได้ทุกภาคของประเทศไทย ให้ผลผลิตสูง และรสชาติน่ารับประทาน ทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการโดยมีโปรตีนและวิตามินสูง ซึ่งมีสรรพคุณทางยาสามารถป้องกันโรคในมนุษย์ได้อีกด้วย (รักษ์, 2551) แต่การเพาะเห็ดในประเทศไทยมักประสบปัญหาการเกิดโรคที่เข้าทำลายโดยราเขียว (Green mold) และราดำ (Black mold) โดยเฉพาะเชื้อราดำ *Aspergillus niger* ที่ก่อปัญหามากต่อผลผลิตเห็ดและสามารถสร้างสารก่อมะเร็งในมนุษย์ด้วย ได้แก่ โอคราทอกซิน (Ochratoxin) และฟูโมนิซิน (Fumonisins)(Soares *et al*., 2013) Fadahunsi *et al*. (2013) รายงานการตรวจพบเชื้อรา *A. niger* บนดอกเห็ดถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *A. niger* เป็นเชื้อราทนร้อน (Thermotolerant fungi) สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส มักพบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในอากาศ ดิน และวัสดุเพาะปลูกจึงยากต่อการป้องกันกำจัด (Metzger, 2008) สำหรับการป้องกันกำจัดเชื้อราดังกล่าวที่ปฏิบัติกันทั่วไปคือการเลือกหัวเชื้อเห็ดจากแหล่งที่เชื่อถือได้ มีความแข็งแรงและมีการปนเปื้อนน้อยที่สุด การใช้วัสดุเพาะและเครื่องมือที่ปราศจากการปนเปื้อน การนึ่งก้อนเชื้อเห็ดด้วยความร้อนสูง 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3-4 ชั่วโมง การกำจัดก้อนเห็ดติดเชื้อทิ้งและการทำความสะอาดโรงเรือน (Fan *et al*., 2005) ส่วนสารเคมีสังเคราะห์ที่สามารถกำจัดเชื้อราดำ *A. niger* ที่ได้ผลดีคือสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (Benzimidazole) ได้แก่ เบนโนมิล (Benomyl) และคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) แต่สารเคมีเหล่านี้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเป็นสารก่อมะเร็งที่สลายตัวยาก สามารถตกค้างในดอกเห็ดได้ง่าย (Santa Cruz Biotechnology Inc., 2010) และยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ (Hatvani et al., 2012) ดังนั้นการควบคุมโรคราดำของเห็ดโดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรนำมาใช้ โดย Payapanon et al. (2011) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B2 สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้จากโรงเพาะเห็ด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* และสามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดในโรงเรือนได้ ซึ่งการใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ท้องถิ่นมีข้อได้เปรียบกว่าสายพันธุ์ทางการค้าคือสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ นอกจากนี้การประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคของเห็ดในประเทศไทยยังไม่เป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเกษตรกรยังไม่เชื่อมั่นในประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราดำ *A. niger* และประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคราดำในสภาพโรงเรือนให้สามารถเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีสังเคราะห์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. เตรียมเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน เชื้อสาเหตุโรค และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 เชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน: แยกเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีขนาดใหญ่โดยการตัดเนื้อเยื่อดอกเห็ดและนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อเห็ดให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยตัดบริเวณปลายเส้นใยที่ไม่มีเชื้อราอื่นปนเปื้อนและย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.2 เชื้อสาเหตุโรคราดำ: แยกเชื้อรา *Aspergillus niger* จากก้อนเชื้อเห็ดที่เกิดโรคราดำ โดยทำการเจือจางวัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดติดโรคด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 10^{-1}–10^{-3} เท่า ดูดสารแขวนลอยเชื้อเห็ดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดและเกลี่ย (Spread plate) ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยเขี่ยเชื้อราที่เจริญจากหนึ่งสปอร์ (Single spore isolation) มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Diba *et al*., 2007) ก่อนเก็บเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.3 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: แยกเชื้อแบคทีเรียจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในพื้นที่อำเภอลาดยาว อำเภอเมือง และอำเภอโกรกพระ จังหวัดนครสวรรค์ โดยนำดอกเห็ด จำนวน 5 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-3} เท่า ดูดสารแขวนลอยดอกเห็ดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยว (Single colony isolation) โดยนำมา Cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นโดยทำการย้อมแกรม (Gram staining) ย้อมสปอร์ด้วย Malachite green ตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และศึกษาการสร้างเอนไซม์ catalase ด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (3% H_2O_2) (สุรางค์, 2555; Payapanon et al., 2011)

2. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อราดำ

เลี้ยงเชื้อราดำ *A. niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร แล้วนำไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายโคโลนีเดี่ยว (Single colony) เชื้อแบคทีเรียมาแตะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *A. niger* โดยให้ห่างจากปลายเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด เป็นระยะ 3 เซนติเมตร จำนวน 4 จุด ในแนวกากบาท บ่มจานเลี้ยงเชื้อทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงทำการวัดรัศมีเส้นใยของเชื้อราดำ *A. niger* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) ตามวิธีการของ Shah et al. (2013)

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \frac{(\text{รัศมีเส้นใยเชื้อกรรมวิธีควบคุม} - \text{รัศมีเส้นใยเชื้อกรรมวิธีทดสอบ}) \times 100}{\text{รัศมีเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคในกรรมวิธีควบคุม}}$$

3. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคราดำ

3.1 การผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp.: ผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ตามวิธีการของ Muis (2006) โดยนำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (เลี้ยงบนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนขูดเซลล์มาผสมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) ความเข้มข้น 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($O.D._{600}$ = 0.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำไปเติมลงในผงผสมทัลคัมปลอดเชื้อ (ทัลคัม 100 กรัม Yeast extract 0.25 กรัม และสารเหนียว Carboxy methyl cellulose 1 กรัม) คลุกเคล้าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น (Blender) ก่อนอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.2 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคราดำ: ทำการเปิดดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานโดยการเปิดจุกสำลี ถอดคอขวดออกแล้วพับปากถุงโดยม้วนปากถุงให้อยู่ระดับเดียวกับก้อนเชื้อ จากนั้นพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. niger* ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตรวจนับด้วย Haemocytometer) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนก้อนเชื้อเห็ดบริเวณปากถุง บ่มก้อนเห็ดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการควบคุมโรคราดำโดยการพ่นบริเวณปากถุงก้อนเห็ดด้วยผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (1.5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) และสารเคมีคาร์เบนดาซิม (50%wp) ในอัตราที่เท่ากัน (1.5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อถุง ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 10 ก้อนเชื้อเห็ด) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จดบันทึกน้ำหนักสดของผลผลิตเห็ดต่อถุงในช่วงเวลา 30 วัน และหาการเกิดโรคบนก้อนเห็ดโดยให้คะแนน 0 - 5, 0 คือ ไม่เกิดโรคราดำ, 1 คือพื้นที่เกิดโรคราดำ 1 - 20 เปอร์เซ็นต์, 2 คือพื้นที่เกิดโรคราดำ 21 - 40 เปอร์เซ็นต์, 3 คือพื้นที่เกิดโรคราดำ 41 - 60 เปอร์เซ็นต์, 4 คือพื้นที่เกิดโรคราดำ 61 - 80 เปอร์เซ็นต์ และ 5 คือพื้นที่เกิดโรคราดำ 81 - 100 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในแต่ละกรรมวิธีโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{Sum (N x S)}}{\text{(T x M)}} \text{ x } 100$$

เมื่อ N คือจำนวนก้อนเห็ดที่ติดโรคในแต่ละระดับคะแนน เมื่อ S คือระดับคะแนนต่าง ๆ (0, 1, 2, 3, 4, 5) เมื่อ T คือจำนวนก้อนเชื้อทั้งหมดเท่ากับ 5 และเมื่อ M คือระดับคะแนนสูงสุดเท่ากับ 5 (Shah et al., 2013)

4. ประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในชีวภัณฑ์ต่อการควบคุมโรคราดำ

4.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย *Bacillus* spp.: นำชีวภัแบคทีณฑ์เรีย *Bacillus* spp. (จากข้อ 3.1) ปริมาณ 1.5 กรัม ไปเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารปลอดเชื้อ 2 ชนิดที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร คือ 1) น้ำนมวัว UHT และ 2) น้ำมะพร้าวอ่อน ก่อนบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราดำ: ทำการเปิดดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานโดยการเปิดจุกสำลี ถอดคอขวดออกแล้วพับปากถุงโดยม้วนปากถุงให้อยู่ระดับเดียวกับก้อนเชื้อ จากนั้นพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. niger* ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตรวจนับด้วย Haemocytometer) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนก้อนเชื้อเห็ดบริเวณปากถุง บ่มก้อนเห็ดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการควบคุมโรคราดำโดยการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณเชื้อในนมวัวและน้ำมะพร้าวอ่อนดังข้อ 4.1 เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (50%wp) ในอัตรา 1.5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร โดยการฉีดพ่นในปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง (วันที่ 1 และ วันที่ 15 ของการทดลอง) ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 10 ก้อนเชื้อเห็ด) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) หลังการฉีดพ่น เป็นเวลา 30 วัน ทำการบันทึกน้ำหนักสดของผลผลิตเห็ดและการเกิดโรคบนก้อนเห็ด นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคตามวิธีการของ Shah et al. (2013)

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS เวอร์ชั่น 16

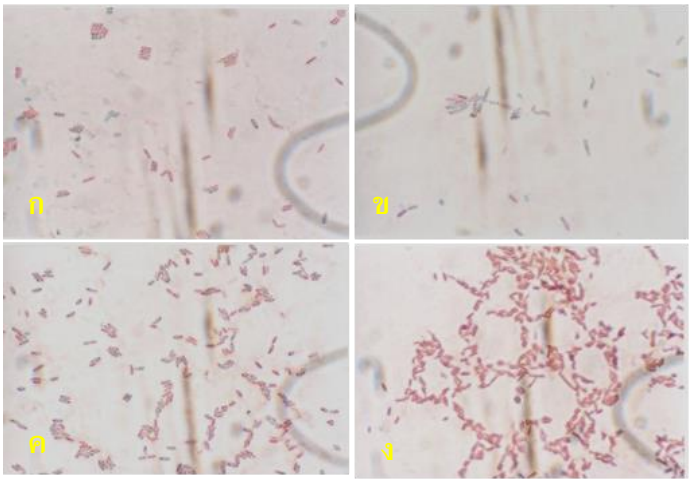
ผลการศึกษา

1. เตรียมเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน เชื้อสาเหตุโรค และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานที่แยกได้จากดอกเห็ดตัวอย่าง มีความแข็งแรงและเจริญเติบโตรวดเร็ว (ภายใน 4 วัน) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนเชื้อราดำ *Aspergillus niger* ที่แยกได้จากก้อนเห็ดเกิดโรคมีลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ตรงตามรายงานของ Diba et al. (2007)

แยกเชื้อแบคทีเรีย ได้จำนวน 9 ไอโซเลท จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในเขตพื้นที่อำเภอเมือง อำเภอลาดยาว และอำเภอโกรกพระ จังหวัดนครสวรรค์ ได้แก่ ไอโซเลท 1-3 (อำเภอเมือง) ไอโซเลท 4-6 (อำเภอลาดยาว) และไอโซเลท 7-9 (อำเภอโกรกพระ) โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแกรมบวก (ติดสีน้ำเงินของ Methylene blue) แต่มีเพียง 5 ไอโซ

เลท ที่สร้างสปอร์ (ติดสีเขียวของ Malachite green) มีรูปวงรี และสามารถสร้างเอนไซม์ catalase เนื่องจากเกิดฟองก๊าซออกซิเจนหลังหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2) จึงจำแนกเบื้องต้นเป็นเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ตามรายงานของสุรางค์ (2555)



รูปที่ 1 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ติดสีเขียวของ Malachite green, สายพันธุ์ 1 (ก), สายพันธุ์ 2 (ข), สายพันธุ์ 3 (ค), สายพันธุ์ 4 (ง)

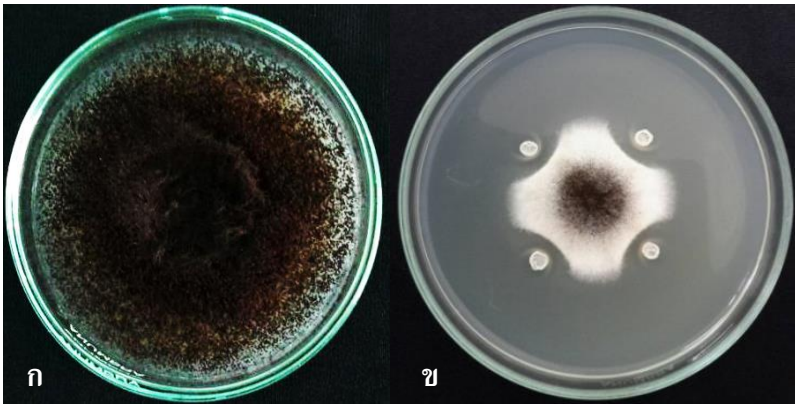
2. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อโรคราดำ

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราดำ *A. niger* โดยมีการยับยั้งในช่วง 44.45 – 75.71 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 และ 3 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราดำ *A. niger* เท่ากับ 75.7 และ 63.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อโรคราดำ *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

กรรมวิธี	การยับยั้งเชื้อรา *A .niger* (%)
Bacillus sp. ไอโซเลท 1	60.68 c[1/]
Bacillus sp. ไอโซเลท 2	75.71 b
Bacillus sp. ไอโซเลท 3	63.55 c
Bacillus sp. ไอโซเลท 4	44.45 e
Bacillus sp. ไอโซเลท 5	50.68 d
คาร์เบนดาซิม (50%wp)	82.66 a
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0.00 f

[1/] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์โดยวิธี Least Significant Difference



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราดำ *Aspergillus niger*, กรรมวิธีควบคุม (ก), กรรมวิธีทดสอบ (ข)

3. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในการควบคุมโรคราดำ

ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถลดการเกิดโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ร่วมกับสายพันธุ์ 3 มีการเกิดโรคหลังเปิดดอกเป็นเวลา 30 วัน เท่ากับ 24.98 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (Control 1) ที่พบการเกิดโรคเท่ากับ 21.84 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control 2) พบการเกิดโรคสูงสุด เท่ากับ 68.28 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในด้านผลผลิตเห็ดนางฟ้าภูฐานในช่วง 30 วันของการทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธีทดสอบให้ผลผลิตเห็ดสูงกว่าการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control 2) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ร่วมกับสายพันธุ์ 3 ให้ผลผลิตเห็ดสูงสุดเท่ากับ 595.35 กรัมต่อถุง รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 เพียงอย่างเดียว ให้ผลผลิตเห็ด เท่ากับ 488.96 และ 305.66 กรัมต่อถุง ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคราดำที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus njger* บนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน และผลผลิตเห็ดนางฟ้าภูฐานในระหว่างการเปิดดอกเป็นเวลา 30 วัน

กรรมวิธี	การเกิดโรคราดำ (%)	ผลผลิตเห็ด (กรัมต่อถุง)
Bacillus sp. สายพันธุ์ 2	31.84 b[1/]	305.66 c
Bacillus sp. สายพันธุ์ 3	35.27 b	272.74 d
Bacillus sp. สายพันธุ์ 2 + สายพันธุ์ 3	24.98 a	595.35 a
คาร์เบนดาซิม (Control 1)	21.84 a	488.96 b
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control 2)	68.28 c	196.33 e

[1/]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์โดยวิธี Least Significant Difference

4. ประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในชีวภัณฑ์ต่อการควบคุมโรคราดำ

การเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ สามารถลดความรุนแรงของโรคบนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานได้โดยมีการเกิดโรคอยู่ในช่วง 17.23-31.86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control 2) ที่มีการเกิดโรคสูงสุดเท่ากับ 70.66 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้เชื้อสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2 ที่เลี้ยงในน้ำมะพร้าวและน้ำนมวัว UHT มีการเกิดโรคราดำต่ำเท่ากับ 20.33 และ 17.23 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (Control 1) ที่มีการเกิดโรคเท่ากับ 19.75 เปอร์เซ็นต์ ในด้านผลผลิตเห็ดนางฟ้าภูฐานในช่วง 30 วันของการทดลอง

พบว่า ทุกกรรมวิธีทดสอบให้ผลผลิตเห็ดสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใช้เชื้อขยายแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2 ที่เลี้ยงในน้ำนมวัว UHT ให้ผลผลิตเห็ดสูงสุดเท่ากับ 732.51 กรัมต่อถุง รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (Control 1) ให้ผลผลิตเห็ดเท่ากับ 612.95 กรัมต่อถุง ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2 ที่เลี้ยงในน้ำมะพร้าวอ่อนและชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2 ที่ไม่ผ่านการเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยง ให้ผลผลิตเห็ดเท่า 607.42 และ 284.51 กรัมต่อถุง ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในชีวภัณฑ์ต่อการควบคุมโรคราดำที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus njger* บนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน และผลผลิตเห็ดนางฟ้าภูฐานในระหว่างการเปิดดอกเป็นเวลา 30 วัน

กรรมวิธี	การเกิดโรคราดำ (%)	ผลผลิตเห็ด (กรัมต่อถุง)
ชีวภัณฑ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2	31.86 c	284.51 c
ชีวภัณฑ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2 + น้ำมะพร้าว	20.33 b	607.42 b
ชีวภัณฑ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2 + นมวัวUHT	17.23 a	732.51 a
คาร์เบนดาซิม (Control 1)	19.75 ab	612.95 b
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control 2)	70.66 d	214.77 d

[1/]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์โดยวิธี Least Significant Difference

อภิปรายผลการศึกษา

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถสร้างเอนไซม์และสารปฏิชีวนะหลายชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์อื่น เช่น สาร Bacillomycin D, Bacillomycin, Fengycin, Iturin และ Surfactin (Nagy *et al*., 2012) ซึ่งการทดลองนี้ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานจำนวน 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เป็นสาเหตุของโรคราดำในเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Payapanon และคณะ 2011 ที่พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *A. niger* ที่เป็นสาเหตุโรคราดำของเห็ดได้ นอกจากนี้ Fadahunsi et al. (2013) ได้รายงานว่า สารเหนือตะกอน (Supernatant) ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CMI 22BN สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *A. niger* สาเหตุโรคของเห็ดได้ ในการผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยทั่วไปนิยมใช้ผงทัลคัมเป็นสารพาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแพร่กระจายและการเกาะยึดผิวพืชที่ดีขึ้น (Muis, 2006) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp สายพันธุ์ 2 และสายพันธุ์ 3 ด้วยการใช้ผงทัลคัมเป็นสารพา และเมื่อนำชีวภัณฑ์แบคทีเรียดังกล่าวไปใช้ควบคุมโรคราดำในโรงเรือนเพาะเห็ดในระยะเปิดดอกพบว่าชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp สายพันธุ์ 2 และสายพันธุ์ 3 สามารถลดการเกิดโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control 2) แต่ไม่เทียบเท่าการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (50%wp) (Control 1) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชีวภัณฑ์แบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในรูปผงเชื้อแห้งและไม่มีแหล่งอาหารพร้อมใช้จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตช้าส่งผลให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดเห็นผลช้าเช่นกัน ซึ่ง Muis (2006) ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เจริญเติบโตได้ดีในน้ำมะพร้าว และPayapanon *et al*. (2011) ประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยเพิ่มจำนวนเชื้อในน้ำนมวัว UHT และนมถั่วเหลือง แล้วใช้ฉีดพ่น ช่วยควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราของเห็ดได้ สอดคล้องกับการทดลองนี้ที่พบว่าชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ที่เพิ่มจำนวนเซลล์ในน้ำนมวัว UHT สามารถควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (Control 1) นอกจากนี้ Payapanon *et al*. (2011) พบว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เพิ่มจำนวนเชื้อในน้ำนมวัว UHT และ

นมถั่วเหลือง ส่งผลให้ได้ผลผลิตเห็ดฟางเพิ่มขึ้น สอดคล้องกันกับการทดลองนี้ในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ซึ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ในน้ำนมวัว UHT ให้ผลผลิตมากกว่าการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (Control 1) และการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control 2) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในน้ำนมวัว มีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน แคลเซี่ยม วิตามินเอ วิตามินบี2 และวิตามินบี1 (Neogen Europe Ltd., 2011) ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ในขณะเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารปฏิชีวนะและปลดปล่อยลงในอาหารเหลวได้ ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสูงกว่าการใช้ชีวภัณฑ์ที่เป็นผงเชื้อแห้งโดยตรง (Fadahunsi *et al*., 2013) สอดคล้องกับ Payapanon *et al*. (2011) พบว่าการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B2 ที่เพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหาร Nutrient broth (NB) แล้วฉีดพ่นบนวัสดุเพาะเห็ดฟางสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของเห็ดฟางได้และช่วยให้ได้ผลผลิตเห็ดฟางสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุป

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์แยกได้จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน ซึ่ง สายพันธุ์ 2 และสายพันธุ์ 3 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus niger* สาเหตุโรคราดำในเห็ดนางฟ้าภูฐาน และชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ และการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ที่เพิ่มจำนวนเซลล์ในน้ำนมวัว UHT สามารถควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และให้ผลผลิตเห็ดสูงกว่าการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ สำหรับสถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

รักษ์ พฤกษชาติ. (2551). *เห็ดเศรษฐกิจ คู่มือการเพาะเห็ดเชิงการค้าอย่างมืออาชีพ.* กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ นีออน บุ๊คมีเดีย.

สุรางค์ สุธิราวุธ. (2555). *การตรวจสอบปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตรจากผลิตภัณฑ์นำเข้า*. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน.

Diba, K., Kordbacheh, P., Mirhendi, S.H., Rezaie S., & Mahmoudi, M. (2007). Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 23 (6), 867-872.

Fadahunsi, I., Ayansina, D., & Okunrotifa, A. (2013). Biocontrol of mushroom spoilage fungi and aflatoxin evaluation during storage, *Nature & Science*. 11 (7), 7-13.

Fan, L., Pan, H., Wu, Y., & Kwon, H. (2005). Pest and disease management in Shiitake bag cultivation. Mushroom Growers Handbook 2- Shiitake cultivation. [online]. Retrieved January 5, 2016, from http://www.fungifun.org/ mushworld/Shiitake-Mushroom-Cultivation.

Hatvani, L, Sabolić, P., Kocsubé, S., Kredics, L., Czifra, D., Vágvölgyi, C., Kaliterna, J., Ivić, D., Đermić, E., & Kosalec, I. 2012. The first report on mushroom green mould disease in Croatia. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 63 (4), 481-487.

Metzger, B. (2008). *Aspergillus niger* Tiegh. In Mushroom Observer. [online]. Retrieved May 16, 2016, from http://mushroom observer.org/name/show_name/15030?_js=on&_new=true.

Muis, A. (2006). Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 7 (2), 51-56.

Nagy, A., Manczinger, L., Tombácz, D., Hatvani, L., Györfi, J., Antal, Z., Sajben, E., Vágvölgyi C., & Kredics, L. (2012). Biological control of Oyster mushroom green mold disease by antagonistic *Bacillus* species. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*, *IOBC-WPRS Bulletin*, 78, 289-293.

Neogen Europe Ltd. (2011). Media ingredients, yeast extract. [online]. Retrieved May 3, 2016, from http://www.neogen.com.

Payapanon, A., Suthirawut, S., Shompoosang, S., Tsuchiya, K., Furuya, N., Roongrawee, P., Kulpiyawat, T. & Somrith, A. (2011). Increase in yield of the Straw mushroom (*Vovariella volvacea*) by supplement with *Paenibacillus* and *Bacillus* to the Compost. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 56 (2), 249-254.

Shah, S., Nasreen S., & Kousar, S. (2013). Efficacy of fungicides against *Trichoderma* spp. causing green mold disease of Oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*). *Research Journal of Microbiology*, 8 (1), 13-24.

Santa Cruz Biotechnology, Inc. (2010). Carbendazim. Material safety data sheet. [online]. Retrieved January 4, 2016, from http://datasheets.scbt.com/sc-211014.pdf.

Soares, C., Calado, T., & Venâncio, A. (2013). Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30 (1), 9-13.