

การพัฒนาารูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และสายพันธุ์ ดินอ้อย no ๖
เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา

Development of powder formulation of *Bacillus subtilis* ๔๔๑๕ strain and sugarcane soil no.๖
strain for controlling Curcuma bacterial wilt disease

ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล^{๑/}
รุ่งนภา ทองเครือ^{๑/}

บุรณี พัวพงษ์แพทย์^{๑/}
วิภาดา ทองทักษิณ^๒

ทิพวรรณ กันหาญาติ^{๑/}
สุธามาศ ณ น่าน^{๓/}

บทคัดย่อ

การเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ อ้อย no.๖ โดยการเพาะเลี้ยง
แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ อ้อย no.๖ เพื่อเพิ่มปริมาณ ดำเนินการเลี้ยงในอาหารเหลว NGB
และอาหารแข็งNGA นำแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณได้ไปทำเป็นผงเชื้อโดยใช้ผงทาคัมเป็นวัสดุรองรับ ผลิตผงเชื้อ
แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ อ้อย no.๖ จำนวน ๒ กิโลกรัม ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ
นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ อ้อย no.๖ ในผงเชื้อทุกเดือนเพื่อเช็คความอยู่
รอดและปริมาณ พบว่า ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ เป็นเวลา ๑๕ เดือน พบว่า ผงเชื้อ มีอายุการเก็บ
รักษาที่ยังคงมีปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ อ้อย no.๖ ในผงเชื้อพบว่ามีปริมาณ
 1×10^{10} cfu/g ที่ ๑๒ เดือน หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรีย *B. Subtilis* จะลดลงโดยที่เก็บรักษาไว้ ๑๕ เดือน มี
ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ อ้อย no.๖ ที่ 6.4×10^6 cfu/g และนำผงเชื้อไปทดสอบ
ประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าราดด้วยผงเชื้อ ในอัตรา ๑.๕ กรัม/น้ำ
๕ ลิตรรดทุก ๗ วันให้ผลดีที่สุดด้วยสามารถควบคุมโรค ได้ ๖๐% จากนั้นนำผงเชื้อไปทดสอบในสภาพแปลง
ทดลองที่ อำเภอนองตากยา จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า ผงเชื้อในอัตรา ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตรรดทุก ๗ และ ๑๕
วัน ให้ผลดีที่สุด ด้วยสามารถควบคุมโรค ได้ตั้งแต่ ๖๓-๖๕ %

^{๑/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{๒/} สถาบันวิจัยพืชสวน

^{๓/} ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

๖. คำนำ

ปทุมมาเป็นไม้พื้นเมืองของประเทศไทยที่นิยมนำไปเป็นไม้ประดับและไม้ตัดดอก มีการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไปขายยังต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ปัญหาสำคัญที่พบในการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมามีโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) ระบาดทำความเสียหายให้กับเกษตรกรและผู้ส่งออก แบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (wilt) ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า ๒๐๐ ชนิด โดยเฉพาะในประเทศไทยมีการปลูกพืชหลายชนิดที่พืชเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียชนิดนี้ ได้แก่ มันฝรั่ง ชิง ปทุมมา เป็นต้น *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียทางดินสามารถอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ได้ ทำให้การแพร่ระบาดของโรคนี้จึงสามารถแพร่ได้อย่างรวดเร็วและทั่วประเทศเมื่อมีการขนย้ายส่วนขยายพันธุ์ของพืชที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไปปลูกในที่ต่าง ๆ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลายสภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีเรีย *R. solanacearum* ยังเป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืช ถ้าพบแบคทีเรียชนิดนี้ติดไปกับหัวพันธุ์ที่ส่งออก หัวพันธุ์เหล่านั้นจะถูกเผาทำลายทันที ทำให้ไม่สามารถส่งออกได้

การป้องกันกำจัดโรคนี้นั้นทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคสามารถที่จะคงอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคนี้ วิธีการป้องกันกำจัดยังคงจำกัด ได้มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเกษตรกรรมและการใช้ชีววิธี ในการป้องกันกำจัดโรคนี้นี้ ซึ่งการใช้วิธีควบคุมโรคเหี่ยวโดยชีววิธีนี้ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับและส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาใช้ โดยตระหนักถึงอันตรายจากการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมและช่วยแก้ปัญหาการดื้อสารเคมีของศัตรูพืชสำคัญหลายชนิด ตลอดจนเพิ่มทางเลือกในการพิจารณาใช้วิธีใดวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการควบคุมศัตรูพืชแก่เกษตรกร

การป้องกันกำจัดโรคนี้นั้นทำได้ยากเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวกับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น ปทุมมา มันฝรั่ง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเกษตรกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้วิธีการจัดการดิน วิธีเกษตรกรรม ร่วมกับการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง

ณัฐริมา *et al.* (๒๕๕๑) ศึกษาการเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ดินรกายาสูบ no. ๔ โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. ๔ บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar และ บนอาหารเหลว Tryptic Soy Broth ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น ๐.๑ M, methylcellulose ความเข้มข้น ๒.๕ % และผง talcum ๑:๔ (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียในผงเชื้อ คือ ๑.๑x๑๐^{๑๐} และ ๐.๗x ๑๐^{๑๐} CFU/กรัม ตามลำดับ นำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. ๔ ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ ๔ °C มีชีวิตอยู่รอดได้ ๑๒ เดือน และ ๑๕ เดือน ตามลำดับ เมื่อนำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. ๔ ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของชิงพบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ ๖๐ % ในเรือนทดลองและ ๓๐-๓๗ % ในแปลงทดลองปีที่ ๑ และ ๖๗.๕-๗๒.๕% ในปีที่สอง

ณัฐริมา *et al.* (๒๕๕๑) ได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ ๔๔๑๕ และ รากอ้อย no.๖ ที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในแปลงทดลองได้ ๔๓ และ ๔๐ % ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เตรียมในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์ และ/หรือราดลงบนดินซึ่งเป็นการไม่สะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในสภาพแปลง และวิธีการปฏิบัติเช่นนี้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มักไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลล์แบคทีเรียตายลง

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนารูปแบบการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว ให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการบรรจุหีบห่อ ขนส่ง และเกษตรกรนำไปใช้ได้สะดวก และสามารถนำไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆได้ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นงานวิจัยเพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิชีวนะปฏิชีวนะ ๔๔๑๕ และ รากอ้อย no.๖ ให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการบรรจุหีบห่อ ขนส่ง และเกษตรกรนำไปใช้ได้สะดวก

๗. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

- อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้แช่เชื้อชนิดปลอดเชื้อ
- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องเขย่า ชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
- เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน ทรายกลางต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ปทุมมา

วิธีการ

๑. การเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖

เลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ในอาหารเหลว nutrient broth (NB) นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ ๑๕๐ rpm. นาน ๔๘ ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตกตะกอนเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง นำเซลล์แบคทีเรียไปผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น ๐.๑ M, methylcellulose ความเข้มข้น ๒.๕ % และผงทัลคัม (Talcum) ๑:๔ (V:W) ผสมให้เข้ากันดีในสภาพปลอดเชื้อ บรรจุในถุงพลาสติก (Vidhyasekaran and Muthamilan, ๑๙๙๕)

๒. การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่ผลิตได้

นำส่วนผสมผงเชื้อ ๑ กรัม มาตรวจนับปริมาณเชื้อ *B.subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ๓ วัน แล้วตรวจนับเชื้อ *B.subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

๓. การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *B. subtilis* และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆของหัวเชื้อที่ผลิตได้ โดยทดสอบ ๒ ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส และทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษา ๑๕ เดือน ทำการตรวจนับปริมาณตรวจนับเชื้อ *B.subtilis* ทุกเดือน

๔. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนทดลอง

๔.๑ การเตรียมดินผสมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคริดสีดวง

เลี้ยงเชื้อ *R.solanacearum* บนอาหารแข็ง Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง เติมน้ำนิ่ง ๑๐ มล.ต่อจานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียผสมในน้ำเพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ปรับให้มีความเข้มข้น 1×10^6 cfu/ml. นำไปผสมคลุกเคล้ากับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตรา ๑:๑๐ (ปริมาตร:น้ำหนัก) นำดินที่ผสมเชื้อสาเหตุโรคไปตรวจหาปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ก่อนนำดินไปบรรจุในกระถางเพื่อเตรียมไว้ปลูกพืชทดสอบต่อไป

๔.๒ ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนทดลอง

วางแผนการทดลอง RCB ๔ ซ้ำๆละ ๑๐ ต้น จำนวน ๕ กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ ๑ สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๐.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน

กรรมวิธีที่ ๒ สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๐ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน

กรรมวิธีที่ ๓ สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน

กรรมวิธีที่ ๔ สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๒.๐ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน

กรรมวิธีที่ ๕ กรรมวิธีควบคุม รดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ปทุมมา ล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งมาคลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* ที่อัตรา ๑% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ในข้อ ๔.๑ จากนั้นเตรียมผงเชื้อตามกรรมวิธีที่กำหนด นำไปรดพืชทดสอบที่ปลูกไว้ในกระถางทุก ๑ สัปดาห์ สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ปทุมมาที่ไม่ได้คลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* และใช้น้ำนี้รดพืชทดสอบแทนการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

๔.๓ การบันทึกข้อมูล

๔.๓.๑ บันทึกปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* ในดินที่เตรียมไว้ก่อนนำไปใช้ปลูกพืชทดสอบ

๔.๓.๒ บันทึกจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคเหี่ยวทุกสัปดาห์

๕. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในแปลงทดลอง

๕.๑ การเตรียมแปลงทดลอง

เตรียมแปลงทดลองที่ อำเภอนองตากยา จังหวัดกาญจนบุรี โดยทำการเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่าเสมอ ปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวลงในแปลงทดสอบ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ ๒๑ วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum* ความเข้มข้น ๑๐^๘ CFU/ml ลงบนต้นมะเขือเทศ โดยวิธี clipping method ที่งั่วประมาณ ๑ เดือน ต้นมะเขือเทศแสดงอาการของโรคเหี่ยว จากนั้นสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียดและปล่อยให้ย่อยสลายในแปลงทดลอง จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด ๘.๐ x ๑.๕ เมตร จำนวน ๒๐ แปลง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อของแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA ๒๔ ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพืชในสภาพแปลงทดลองต่อไป

๕.๒ ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในแปลงทดลอง

วางแผนการทดลอง RCB ๕ ซ้ำๆละ ๒๐ หัว จำนวน ๔ กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ ๑ สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน

กรรมวิธีที่ ๒ สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๑๕ วัน

กรรมวิธีที่ ๓ สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๓๐ วัน

กรรมวิธีที่ ๔ กรรมวิธีควบคุม รดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ปทุมมา ล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งมาคลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* ที่อัตรา ๑% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในแปลงที่เตรียมไว้ในข้อ ๕.๑ จากนั้นเตรียมผงเชื้อตามกรรมวิธีที่กำหนด สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ปทุมมาที่ไม่ได้คลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* และใช้น้ำนี้รดพืชทดสอบแทนการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

๕.๓ การบันทึกข้อมูล

๕.๓.๑ บันทึกปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงทดลองก่อนนำพืชไปปลูก

๕.๓.๒ บันทึกจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน

เวลาและสถานที่

ต.ค.๕๓ - ก.ย.๕๖ ที่กลุ่มงานбакเทรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร และ แปลงเกษตรกร จังหวัดเชียงราย

๘. ผลการทดลองและวิจารณ์

๑. การเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no ๖

การเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no ๖ ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) บนเครื่องเขย่าที่ ๑๕๐ rpm. นาน ๔๘ ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน ๔๐๐ ml มาตกตะกอนเซลล์ แบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ ไปผสมกับ ๐.๑ M magnesium sulfate จำนวน ๑๐๐ ml ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ ๒๐ นาที จากนั้นเติมด้วย ๒.๕% methylcellulose จำนวน ๑๐๐ ml ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน เติมผงทัลคัม (Talcum) จำนวน ๔๐๐ กรัม ผสมให้เข้ากันดี ผึ่งให้แห้งสนิทในตู้ปลอดเชื้อ บรรจุในถุงพลาสติก (Vidhyasekaran and Muthamilan, ๑๙๙๕) เพื่อนำไปนำไปตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่ผลิตต่อไป

๒. การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่ผลิตได้

โดย นำส่วนผสมผงเชื้อ ๑ กรัม มาตรวจนับปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ๓ วัน แล้วตรวจนับเชื้อ *B. subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารได้ พบว่า ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no ๖ ที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เตรียมจากอาหารเหลว TSB คือ 1.1×10^{10} และ 0.7×10^{10} CFU/กรัม ตามลำดับ

๓. การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

นำผงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ แบ่งแต่ละสายพันธุ์ออกเป็น ๒ ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (๒๗-๓๐ °C) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (๔-๖ °C) ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในผงเชื้อสูตรต่าง ๆ ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิและในตู้เย็นทุก ๑ เดือน เป็นระยะเวลา ๑๕ เดือน ผลการทดลอง ผงเชื้อที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีชีวิตอยู่รอดได้ ๑๒ เดือน แต่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียของทั้งสองสายพันธุ์ลดลง โดยเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ ๓ และลดลงอย่างรวดเร็วในตั้งแต่เดือนที่ ๘ จนถึงเดือนที่ ๑๒ โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ ลดจาก 1.1×10^{10} CFU/กรัม เหลือเพียง 1.0×10^2 CFU/กรัม และ *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินอ้อย no ๖ จาก 0.7×10^{10} CFU/กรัม เหลือเพียง 0.5×10^2 CFU/กรัม (ตารางที่ ๑) ในขณะที่ผงเชื้อที่เก็บรักษาในตู้เย็น ยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง ๑๕ เดือนโดยที่ความเข้มข้นลดลงจากเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ จากปริมาณเริ่มต้น 1.1×10^{10} CFU/กรัม ลดลงเหลือ 2.3×10^7 CFU/กรัม และ *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินอ้อย no ๖ จากปริมาณเริ่มต้น 0.7×10^{10} CFU/กรัม ลดลงเหลือ 6.4×10^6 CFU/กรัม ในเดือนที่ ๑๕ (ตารางที่ ๑)

๔. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนทดลอง

นำผงเชื้อที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลอง วางแผนการทดลอง RCB ๔ ซ้ำๆ ละ ๑๐ ต้น จำนวน ๕ กรรมวิธี โดยปริมาณประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* ในดินผสม ซึ่งเป็นประชากรเริ่มต้นคือ 2.4×10^6 CFU/ดิน ๑ กรัม พบว่า กรรมวิธีที่ ๓ การใช้สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม และกรรมวิธีที่ ๔ การใช้สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๒.๐ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ให้ผลการควบคุมโรคเหี่ยวในเรือนปลูกพืช

ทดลองได้ดีที่สุด โดยพบโรคเหี่ยว ๔๐% สามารถควบคุมโรคได้ ๖๐%ในกรณีที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ พบถึงโรคเหี่ยว ๑๐๐% (ตารางที่ ๒)

๕. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในแปลงทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ ในสภาพแปลงทดลอง ที่ อำเภอนองตากยา จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า การควบคุมโรคเหี่ยวของผงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ โดยการคลุกหัวพันธุ์ด้วย ๑% ผงเชื้อและรดด้วย ผงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อัตราอย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๒๐ ลิตร ทุก ๗ วันและ ๑๕ วัน ให้ผลการควบคุมโรคดีที่สุด โดยมีการเกิดโรคเหี่ยวเพียง ๓๕ และ ๓๗ % ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยว ๖๕ และ ๖๓ % (ตารางที่ ๓) ในกรณีที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อพบเกิดโรคเหี่ยวร้อยละ ๘๐ (ตารางที่ ๓)

จากผลการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ พบว่า การใช้ผงเชื้อโดยการคลุกหัวพันธุ์ด้วย ๑% ผงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์และรดด้วยผงเชื้อทั้งสองในอัตราอย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๒๐ ลิตรทุก ๗ และ ๑๕ วัน ให้ผลการควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีกว่า การใช้ผงเชื้อ ทุก ๓๐ วัน และการใช้ผงเชื้อ ทุก ๗ วัน และ ๑๕ วัน ให้ผลการควบคุมไม่แตกต่างกัน แต่การใช้ผงเชื้อ ทุก ๗ วัน ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน ดังนั้น การใช้ผงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ โดยการคลุกหัวพันธุ์ด้วย ๑% ผงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์และรดด้วยผงเชื้อทั้งสองในอัตราอย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๒๐ ลิตร ๑๕ วัน ให้ผลการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาที่ดีที่สุด ประหยัดและสิ้นเปลืองน้อยที่สุด

๙. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ อ้อย no.๖ โดยนำแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณได้จากอาหารเหลว TSB ไปทำเป็นผงเชื้อโดยใช้ผงทาคัมเป็นวัสดุรองรับ ได้ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อยno ๖ ที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เตรียม คือ ๑.๑x๑๐^{๑๐} และ ๐.๗x ๑๐^{๑๐} CFU/กรัม ตามลำดับ ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ พบว่าผงเชื้อสามารถเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิห้องได้นาน ๓ เดือน ในขณะที่เก็บไว้ที่ตู้เย็น สามารถเก็บได้นาน ๑๕ เดือน เมื่อนำผงเชื้อไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่ารดด้วยผงเชื้อ ในอัตรา ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตรรดทุก ๗ วัน ให้ผลดีที่สุดด้วยสามารถควบคุมโรค ได้ ๖๐% จากนั้นนำผงเชื้อไปทดสอบในสภาพแปลงทดลองที่ อำเภอนองตากยา จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า ผงเชื้อในอัตรา ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตรรดทุก ๗ และ ๑๕ วัน ให้ผลดีที่สุด ด้วยสามารถควบคุมโรค ได้ตั้งแต่ ๖๓-๖๕ %

๑๐. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ชีวภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ อ้อย no.๖ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย ทำให้ ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ตรงตามความต้องการของตลาดต่างประเทศ สามารถส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไปยังต่างประเทศ ทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายล้านบาท สามารถนำไปขยายผลทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในพื้นที่ปลูกปทุมมา และถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่เกษตรกร เป็นการช่วยเหลือเกษตรกรให้สามารถมีรายได้เพิ่มมากขึ้น มีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น ยังเป็นการส่งเสริมการทำเกษตรอินทรีย์ และอาหารปลอดภัย ตามนโยบายของประเทศอีกด้วย นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ และแพร่หลายสู่เกษตรกรทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ตรงตามความต้องการของตลาด เกษตรกรสามารถปลูกปทุมมาซ้ำที่เดิมได้ เป็นการลดปัญหาการบุกรุกทำลายป่าเพื่อหาพื้นที่

๑๑. คำขอบคุณ

๑๒. เอกสารอ้างอิง

ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล และ วณิดา ฐิตะฐาน. ๒๕๕๑. ศึกษาเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของปทุมมา. รายงานผลงานวิจัย ปี ๒๕๕๑. กลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า ๒๔-๓๕.

ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ และบุษราคัม อุดมศักดิ์ ๒๕๕๑. พัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวในขิง. รายงานผลการวิจัยประจำปี ๒๕๕๑. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล วิภาดา ทองทักษิณ และสุธามาศ ณ น่าน ๒๕๕๑. การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของปทุมมาโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์. รายงานผลการวิจัยประจำปี ๒๕๕๑. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพนธ์ สุขวิบูลย์. ๒๕๓๗. ปทุมมา. กสิกร. ๖๗(๕):๔๑๕-๔๑๙.

สุนตรา ภาวิจิตร , ณัฐธิดา บุญวัฒน์ และนิยมรัฐ ไตรศรี. ๒๕๓๘. โรคเหี่ยวของกระเจียวและปทุมมา ข้าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา ๕(๔) : ๙๒

สุรวิช วรณไกรโรจน์. ๒๕๓๗ ปทุมมาและกระเจียว. น.๕๘-๗๒. ใน : ไม้ตัดดอกเขตร้อน. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.๑๕๙ น.

สุรวิช วรณไกรโรจน์. ๒๕๓๙. ปทุมมาและกระเจียว (*Curcuma*) ไม้ดอกไม้ประดับ. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. บริษัทอัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.๑๒๘ น.

Aspiras, R.B. and A.R. de la Cruz. ๑๙๘๕. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU๖ And *Pseudomonas fluorescens*, pp. ๘๙-๙๒. In G.J. Persley. Bacterial wilt Disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Bannos, Philippines

Baker, K.F. and R.J. Cook. ๑๙๗๔. Biological Control of Soil-Borne Pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. ๔๓๓ p.

Celino, M.S. and D. Gottlieb. ๑๙๕๒. Control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus polymyxa*. Phytopathology. ๔๒:๔(abstract).

Guo, J., H. Qi and S. Li . ๒๐๐๒. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to Pepper bacterial wilt. Bacterial wilt newsletter. ๑๗ :๓ .

Hayward, A.C. ๑๙๖๔. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. App. Bacteriol. ๒๗:๒๖๕-๒๗๗.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. ๑๙๙๔. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ๙th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Karuna , K., A.N.A. Khan and M. R. Ravikumar. ๑๙๙๗. Potential of biocontrol agent in the management of bacterial wilt of Tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. Proceedings of the ๒nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe ๒๒-๒๗ June, ๑๙๙๗.

Xu, G.W. and D.C. Gross. ๑๙๘๖. Field evaluation of the interaction among fluorescent *Pseudomonas*, *Erwinia calotovora* and potato yield. Phytopathology ๗๖ : ๔๒๓-๔๓๐.

Sanaina, V., V. Kishore and G.S. Shekhawat. ๑๙๙๗. Biocontrol of bacterial wilt of potato by avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* and other Bacteria. Proceedings of the ๒nd

๑๓. ภาคผนวก

ตารางที่ ๑ ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)			
	<i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ ๔๔๑๕		<i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ ดินฮ้อย no.๖	
	อุณหภูมิห้อง (๒๗-๓๐ °C)	ตู้เย็น (๔-๖ °C)	อุณหภูมิห้อง (๒๗-๓๐ °C)	ตู้เย็น (๔-๖ °C)
๐	๑.๑ X ๑๐ ^{๑๐}	๑.๑ X ๑๐ ^{๑๐}	๐.๗X๑๐ ^{๑๐}	๐.๗X๑๐ ^{๑๐}
๑	๐.๘ X ๑๐ ^{๑๐}	๑.๐ X ๑๐ ^{๑๐}	๘.๙ X๑๐ ^๙	๐.๗X๑๐ ^{๑๐}
๒	๐.๒ X ๑๐ ^{๑๐}	๑.๐ X ๑๐ ^{๑๐}	๗.๖ X ๑๐ ^๙	๐.๕X๑๐ ^{๑๐}
๓	๒.๓ X ๑๐ ^๙	๑.๐ X ๑๐ ^{๑๐}	๒.๕ X ๑๐ ^๙	๐.๔X๑๐ ^{๑๐}
๔	๑.๔ X ๑๐ ^๙	๑.๐ X ๑๐ ^{๑๐}	๑.๒ X ๑๐ ^๙	๐.๔X๑๐ ^{๑๐}
๕	๓.๓ X ๑๐ ^๘	๑.๐ X ๑๐ ^{๑๐}	๔.๓ X ๑๐ ^๘	๐.๓X๑๐ ^{๑๐}
๖	๐.๘ X ๑๐ ^๗	๐.๙ X ๑๐ ^{๑๐}	๒.๘ X ๑๐ ^๗	๐.๒X๑๐ ^{๑๐}
๗	๒.๙ X ๑๐ ^๖	๐.๓ X ๑๐ ^{๑๐}	๓.๘ X ๑๐ ^๖	๙.๗X๑๐ ^๙
๘	๑.๗ X ๑๐ ^๕	๙.๐ X ๑๐ ^๙	๑.๙ X ๑๐ ^๕	๘.๕X๑๐ ^๙
๙	๒.๒ X ๑๐ ^๔	๘.๐ X ๑๐ ^๙	๒.๐ X ๑๐ ^๔	๘.๐X๑๐ ^๙
๑๐	๑.๓ X ๑๐ ^๔	๘.๖ X ๑๐ ^๙	๑.๑ X ๑๐ ^๔	๖.๘X๑๐ ^๙
๑๑	๓.๒ X ๑๐ ^๓	๘.๓ X ๑๐ ^๙	๔.๓ X ๑๐ ^๓	๓.๗X๑๐ ^๙
๑๒	๑.๐ X ๑๐ ^๒	๓.๐ X ๑๐ ^๘	๐.๕X๑๐ ^๒	๖.๗X๑๐ ^๘
๑๓	-	๒.๕ X ๑๐ ^๘		๒.๗X๑๐ ^๘
๑๔	-	๑.๕ X ๑๐ ^๘		๖.๗X๑๐ ^๗
๑๕	-	๒.๓ X ๑๐ ^๗		๖.๔ X ๑๐ ^๖

๑/ ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น

ตารางที่ ๒ ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของ ปทุมมาในเรือนทดลอง

กรรมวิธี	การเกิดโรค (%)	การควบคุมโรค (%)
๑. สูตรผง <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๐.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน	๘๐ ^{๑/}	๒๐ ^{๒/}
๒. สูตรผง <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๐ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน	๖๐	๔๐
๓. สูตรผง <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน	๔๐	๖๐
๔. สูตรผง <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๒.๐ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน	๔๐	๖๐
๕. กรรมวิธีควบคุม รดด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	๑๐๐	-
$\text{-๑/ การเกิดโรค (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times ๑๐๐$ $\text{-๒/ การควบคุมโรค (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นรอดตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times ๑๐๐$		

ตารางที่ ๓ ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของ ปทุมมาในแปลงทดลอง

กรรมวิธี	การเกิดโรค (%)	การควบคุมโรค (%)
๑. สูตรผง <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๗ วัน	๓๕	๖๕
๒. สูตรผง <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย	๓๗	๖๓

no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๑๕ วัน		
๓. สูตรผง <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ ๔๔๑๕ และ ดินอ้อย	๕๕	๔๕
no. ๖ อย่างละ ๑.๕ กรัม/น้ำ ๕ ลิตร ทุก ๓๐ วัน		
๔. กรรมวิธีควบคุม รดด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	๘๐	-
