

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยและพัฒนาการใช้ชีวอินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช
กิจกรรม : **การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช**
กิจกรรมย่อย : การบริหารจัดการโรคเหี่ยวของปทุมมาและกระเจียวโดยวิธีผสมผสาน
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิง
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of tablets product of *Bacillus subtilis* Tobacco root No.4 strain for controlling Ginger bacterial wilt disease
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : ณีฐฐิมา โฆษิตเจริญกุล กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน : บุรณี พัววงษ์แพทย์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ทิพวรรณ กันหาญาติ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
รุ่งนภา ทองเคิ่ง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

นำแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 ไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรเม็ดโดยใช้ ดินขาว เป็นสารพามีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และ กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร มีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 อยู่ที่ 10^9 cfu/g ชีวภัณฑ์นี้เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือนที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลองได้ร้อยละ 60 และเมื่อนำมาใช้มาทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลองพบว่า อัตรา 2.0 กรัม/ต้นมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลองได้ร้อยละ 79 และได้ผลผลิต 4,549 กิโลกรัม/ไร่ เมื่อนำชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าการใช้ชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด อัตรา 2.0 กรัม/ต้นมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงเกษตรกรร้อยละ 73.28 และได้ผลผลิต 3,926 กิโลกรัมต่อไร่

The antagonistic bacteria *Bacillus subtilis* Tobacco root No.4 strain was carried out to develop bioproduct as tablet formulation using kaolin 400 g., $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 ml, sodium

carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 ml and molasses 40 ml gave the high population of *B. subtilis* Tobacco root No.4 strain of 10^9 CFU/g. The bioproduct storage for 12 months at room temperature and 15 months at 4 °C is still effective in controlling bacterial wilt of Ginger in the greenhouse at 60% and in the wilt infested field at 79% and harvest up to 4,549 kg/Rai. The bioproduct of *B. subtilis* Tobacco root No.4 strain was tested effective in controlling bacterial wilt of Ginger in a farmer's field at Kanchanaburi province. The results showed that the bioproduct can control the wilt at 73.28 % and harvest up to 3,926 kg/Rai.

6. คำนำ

โรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* Syn. (*Pseudomonas solanacearum*) เป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างสูงต่อการผลิตและการส่งออกขิง การป้องกันกำจัดโรคนี้นี้ทำได้ยากเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวกับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น ปทุมมา มันฝรั่ง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น antagonist ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย จนกระทั่งแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เช่น เชื้อรา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

จิระเดช (2534) ได้รายงานว่าการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแอนทาโกนิสต์ ไม่ว่าจะอยู่ในรูปสปอร์ผสมน้ำหรือในรูปผงฝุ่นก็ตาม นับเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดที่สุดเนื่องจากใช้เชื้อปริมาณน้อยและวิธีการไม่ยุ่งยาก

Wassana et al. (2005) ได้ศึกษาการยืดอายุผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* TISTR 001 เพื่อใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์พบว่า ถ้าเติมสารตัวพา (carrier) ได้แก่ zeolite, talcum, และ calcium carbonate ลงไปในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชนิดผง แม้เพิ่มอุณหภูมิถึง 150 องศาเซลเซียสในระหว่างขบวนการผลิตก็ตาม สปอร์ของแบคทีเรียก็สามารถทนอยู่ได้และจำนวนของเอนโดสปอร์ก็ไม่ลดลง และพบว่าความเข้มข้นของเอนโดสปอร์จะคงที่กว่าผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของเหลว

ณัฐริมา และคณะ (2547) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงถึง 60% แต่การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการทดลองนี้เตรียมในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแล้วนำไปจุ่มหัว

พันธุ์และราดลงบนดินซึ่งเป็นการไม่สะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในสภาพแปลงและทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลล์แบคทีเรียตายลง

ณัฐริมา และคณะ (2551) ศึกษาการเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar และ บนอาหารเหลว Tryptic Soy Broth ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, methylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และผง talcum 1:4 (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียในผงเชื้อ คือ 1.1×10^{10} และ 0.7×10^{10} CFU/กรัม ตามลำดับ นำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 °C มีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน และ 15 เดือน ตามลำดับ เมื่อนำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของชิงพบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60 % ในเรือนทดลองและ 30-37 % ในแปลงทดลองปีที่ 1 และ 67.5-72.5% ในปีที่สอง

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระจาดต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ชิง
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

1. การเตรียมสูตรสำเร็จแบบเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบNo.4

การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบNo.4

โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบNo. 4 บนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวอายุ 18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ทำการเก็บสปอร์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำไปหมนเหรียญที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสปอร์ที่ได้ไปปั่นล้าง 2-3 ครั้ง เก็บเชื้อไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปเตรียมสูตรสำเร็จต่อไป

การเตรียมสูตรสำเร็จแบบเม็ด

นำสารประกอบต่างๆ ได้แก่ ดินขาวหรือ kaolin เกาลิน, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) และ กากน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ ผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ no. 4 จำนวน 1.0×10^{12} หน่วยโคโลนี ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสม จนได้เป็นก้อนหมาด นำส่วนผสมที่ได้ใส่ในเครื่องปั่นเมล็ด จากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

- ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 โดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 โดยสุ่มจากเมล็ดที่ผลิตได้ จำนวน 3 ครั้ง มาวัดความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 โดยนำสูตรสำเร็จแบบเมล็ดที่ผสมเข้ากันดีจนเป็นก้อนหมาดๆ เล็กๆ มา drop plate บนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดในสูตรสำเร็จ (cfu/g)

2. ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

นำชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 ที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในสูตรเม็ด ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน

3. ทดสอบการประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จชนิดเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

การเตรียมดินผสมแบคทีเรีย *R. solanacearum* เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.28 บนอาหารแข็ง PSA บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง เติมด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมเซลล์แบคทีเรียในน้ำกลั่นให้เป็นสารละลายแบคทีเรีย แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียมีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร นำไปผสมคลุกเคล้ากับดินที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตรา 1:10 (ปริมาตร: น้ำหนัก) นำดินที่ผสมแบคทีเรียไปตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ก่อนนำดินไปบรรจุในกระถางเพื่อเตรียมไว้ปลูกพืชทดสอบต่อไป

การทดสอบการประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

นำหัวพันธุ์ขิงล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ รดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 จำนวน 1 กรัม/น้ำ 5 ลิตร (มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย 1×10^9 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร) ทุก 7 วัน สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงที่ใช้ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อรดทุก 7 วัน

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นขิงที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 7 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* และ *B. subtilis* ในดินที่ใช้ปลูกขิงทุก 7 วัน

4. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในแปลงทดลอง

การเตรียมแปลงทดลอง เตรียมแปลงทดลองที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจังหวัดลำปาง โดยทำการเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่่าเสมอ ปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวลงในแปลงทดสอบ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum* No. 28 ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นมะเขือเทศ โดยวิธี clipping method ที่ไว้ประมาณ 1 เดือน ต้นมะเขือเทศแสดงอาการของโรคเหี่ยว จากนั้นสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียดและปล่อยให้ย่อยสลายในแปลงทดลอง จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด 8.0×1.5 เมตร จำนวน 12 แปลง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyatยาสูบ no.4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyatยาสูบ no.4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆ ละ 20 หัว ดังรายละเอียดกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น รองก้นหลุมก่อนปลูกและเติมทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 2 สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น รองก้นหลุมก่อนปลูกและเติมทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์ขิงด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyatยาสูบ no.4 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก และรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม ปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงและรดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ขิง ที่มีตาเริ่มงอก มาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปปลูกในแปลงทดลองตามแผนการทดลอง

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกจำนวนต้นขิงที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน

2. เก็บน้ำหนักและปริมาณของผลผลิตที่ได้

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร

โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆ ละ 20 หัว ดังรายละเอียดกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น รองก้นหลุมก่อนปลูกและใส่สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 2 สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น รองก้นหลุมก่อนปลูกและใส่สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์ขิงด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyatยาสูบ no.4 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก และรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม ปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงและรดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ขิง ที่มีตาเริ่มงอก มาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปปลูกในแปลงทดลองตามแผนการทดลอง
การบันทึกข้อมูล

1. ตรวจสอบบันทึกที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 30 วัน
2. เก็บน้ำหนักและปริมาณของผลผลิตที่ได้

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ แปลงปลูกขิงของเกษตรกร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมสูตรสำเร็จชนิดเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรakyat No.4

โดยนำสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรakyat No. 4 ที่เลี้ยงได้มาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ 10^9 CFU/กรัม นำมาผสมกับเกาลินหรือดินขาวเป็นสารพา มีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และ กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร เมื่อนำมาทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวพบว่ามีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyat no.4 อยู่ที่ 10^9 cfu/g

2. ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรakyat no.4 และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในสูตรเม็ด ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน ผลการทดลอง ผงเชื้อที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีชีวิตรอดอยู่รอดได้ 12 เดือน แต่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนที่ 4 โดยลดลงจาก 4.3×10^9 CFU/g เหลือ 6.1×10^8 CFU/g และลดลงอย่างรวดเร็วในตั้งแต่เดือนที่ 8 จนถึงเดือนที่ 12 จาก 5.1×10^7 CFU/กรัม เหลือเพียง 1.0×10^2 CFU/g (ตารางที่ 1) ในขณะที่ผงเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็น(อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส) ยังคงมีชีวิตรอดอยู่รอดได้ถึง 15 เดือนโดยที่ความเข้มข้นลดลงจากเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย จากปริมาณเริ่มต้น 4.3×10^9 CFU/g ลดลงเหลือ 1.4×10^7 CFU/g ในเดือนที่ 15 (ตารางที่ 1)

3. ทดสอบการประสิทธิภาพของสูตรชนิดเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

นำสูตรเม็ดที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนปลูกพืชทดลอง โดยปริมาณประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* ในดินผสม ซึ่งเป็นประชากรเริ่มต้นคือ 4.3×10^6 CFU/ดิน 1 กรัม พบว่า ประสิทธิภาพของผงเชื้อในการควบคุมโรคเหี่ยวในสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกขิง มีเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรค 60 % โดยมีปริมาณของเชื้อ *B. subtilis* 4.4×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม และมีปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* เหลืออยู่เพียง 2.6×10^2 CFU/ดิน 1 กรัม ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค 100% ปริมาณของเชื้อ *R. solanacearum* มีอยู่ 1.6×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม(ตารางที่ 2) จากผลการทดลอง

พบว่าสูตรเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้ถึง 60% ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับสูตรผงที่ณัฐริมา และคณะ (2551) ได้รายงานไว้ว่าชีวภัณฑ์สูตรผงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากลยาสูบ no.4 ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพโรงทดลองได้ 60 % เช่นกัน และตรงกับที่ ณัฐริมา และคณะ (2547) ได้รายงานผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* โดยได้รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* ดินรากลยาสูบ no.4 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในโรงเรือนทดลองได้ 60% เช่นกัน

4. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในแปลงทดลอง

ผลการทดลองประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงแปลงทดลองพบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สูตรชนิดเม็ดและสูตรชนิดผงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากลยาสูบ no 4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีใช้น้ำเปล่า) ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว 45.0 เปอร์เซ็นต์ โดยกรรมวิธีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด คือ 21.0 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น และกรรมวิธีสูตรชนิดผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว 34.0 และ 32.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่3) และกรรมวิธีที่มีการใช้สูตรชนิดเม็ดและสูตรชนิดผงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากลยาสูบ no 4 ทุกกรรมวิธีมีผลผลิตขิงมากกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีใช้น้ำเปล่า) ที่ได้น้ำหนักผลผลิตขิง 1,750 กิโลกรัม/ไร่ โดยกรรมวิธีการใช้สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น ได้น้ำหนักผลผลิตขิงสูงที่สุด 4,549 กิโลกรัม/ไร่ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น และกรรมวิธีสูตรผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร ที่ได้น้ำหนักผลผลิตขิง 2,755 กิโลกรัม/ไร่ และ 2,791 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ (ตารางที่3)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร

ผลการทดลองประสิทธิภาพของสูตรชนิดเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงแปลงเกษตรกร ที่ อำเภอม่วง จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สูตรชนิดเม็ดและสูตรผงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากลยาสูบ no 4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีใช้น้ำเปล่า) ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว 42.94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) โดยกรรมวิธีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด คือ 26.72 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น และกรรมวิธีสูตรชนิดผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว 31.36 และ 36.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

พบว่ากรรมวิธีที่มีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น ได้น้ำหนักผลผลิตขิงมากที่สุด คือ 3,926 กิโลกรัม/ไร่ (ตารางที่ 4) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีใช้น้ำเปล่า) ที่ได้น้ำหนักผลผลิตขิง 1,926 กิโลกรัม/ไร่ (ตารางที่ 4) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 1

กรัม/ตัน และกรรมวิธีสูตรชนิดผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร ที่ได้น้ำหนักผลผลิตขิง 2,992 กิโลกรัม/ไร่ และ 2,888 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเตรียมผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 แบบเม็ด โดยใช้ เกาลินหรือดินขาวเป็นสารพา มีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และ กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร มีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 อยู่ที่ 10^9 cfu/g ชีวภัณฑ์นี้เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือนที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลองได้ร้อยละ 60 และเมื่อนำมาใช้มาทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลองพบว่า อัตรา 2.0 กรัม/ตันมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลองได้ร้อยละ 79 และได้ผลผลิต 4,549 กิโลกรัม/ไร่ เมื่อนำชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าการใช้ชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด อัตรา 2.0 กรัม/ตันมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงเกษตรกรร้อยละ 73.28 และได้ผลผลิต 3,926 กิโลกรัมต่อไร่

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 แบบเม็ด พร้อมทั้งอัตราการใช้และวิธีการใช้ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิงในสภาพแปลงที่สามารถถ่ายทอดให้กับเกษตรกร เป็นการช่วยเหลือเกษตรกรให้สามารถมีรายได้เพิ่มมากขึ้น มีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น ยังเป็นการส่งเสริมการทำเกษตรอินทรีย์ และอาหารปลอดภัย ตามนโยบายของประเทศอีกด้วย นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ และแพร่หลายสู่เกษตรกรทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ตรงตามความต้องการของตลาด เกษตรกรสามารถปลูกขิงซ้ำที่เดิมได้ เป็นการลดปัญหาการบุกกรุกทำลายป่าเพื่อหาพื้นที่

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2534. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ หลักสูตร การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. หน้า 1-13. ระหว่างวันที่ 13-17 พฤษภาคม 2534 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม.

ณัฐริมา โมฆิตเจริญกุล, วงศ์ บุญสืบสกุล, อรพรรณ วิเศษสังข์ และ ทศนาพร ทศคร. 2547. การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus spp.* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2547 . กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 115-126.

ณัฐริมา ไชยิตเจริญกุล รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ และบุษราคัม อุดมศักดิ์ 2551. พัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวในขิง. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

Wassana Kittikanokrat, Wairuj Dechmahitkul and Phenjun Mekvijitsaeng. 2005. Formulation of *Bacillus subtilis* TISTR 001 for Increasing Probiotic Shelf-life (http://www.knowledge.biotec.or.th/doc_upload/200411495822.doc) (<http://www.splammo.net/bact102/102/bacillus.html>)

13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในสูตรเม็ดที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)	
	อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส)	ตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส)
0 ^{1/}	4.3×10^9	4.3×10^9
1	1.7×10^9	4.2×10^9
2	1.2×10^9	3.5×10^9
3	0.2×10^9	4.1×10^9
4	6.1×10^8	5.2×10^9
5	3.3×10^8	3.2×10^9
6	1.2×10^8	2.6×10^9
7	0.9×10^8	2.2×10^9
8	5.1×10^7	8.0×10^8
9	4.2×10^5	7.2×10^8
10	6.3×10^4	8.6×10^8
11	2.2×10^3	8.3×10^8
12	1.0×10^2	3.0×10^8
13	-	3.5×10^8
14	-	2.5×10^8
15	-	1.4×10^7

^{1/} ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น

ตารางที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรakyatasubno4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนปลูกพืชทดลอง

สัปดาห์ ที่	สูตรเม็ด			น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	
	เปอร์เซ็นต์การ ควบคุมโรคเหี่ยว	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU* / ดิน 1 กรัม) ^{2/}		เปอร์เซ็นต์การ ควบคุมโรค เหี่ยว	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU* / ดิน 1 กรัม) ^{2/}
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Ralstonia solanacearum</i>
1	100 ^{1/}	4.3×10^6	1.9×10^6	100	4.3×10^6
2	100	1.3×10^5	3.5×10^6	100	4.9×10^6
3	90	2.4×10^5	2.6×10^6	80	2.2×10^7
4	80	7.1×10^4	8.7×10^6	40	6.2×10^7
5	70	6.2×10^4	5.4×10^6	0	8.6×10^6
6	60	2.3×10^3	2.5×10^6	0	3.7×10^5
7	60	2.6×10^2	4.4×10^6	0	1.6×10^4

1/ การควบคุมโรค (%) = $\frac{\text{จำนวนต้นรอดตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

2/ CFU = หน่วยโคโลนี

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคของสูตรเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรากลยาสูบno4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงทดลอง ที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร จังหวัดลำปาง

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ การเกิดโรค	เปอร์เซ็นต์ การควบคุมโรค	ผลผลิต (ก.ก./ไร่)
1.สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น	34.0 b ^{1/}	66	2,755 b
2.สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น	21.0 a	79	4,549 a
3.สูตรผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร	32.5 b	67.5	2,791 b
4. น้ำเปล่า	45.0 c	-	1,750 c
CV (%)	21.26245		30.96581

1/ ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคของสูตรเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรากลยาสูบ no 4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงเกษตรกรที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ การเกิดโรค	เปอร์เซ็นต์ การควบคุมโรค	ผลผลิต (ก.ก./ไร่)
1.สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น	31.36 b ^{1/}	68.64	2,992 ab
2.สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น	26.72 a	73.28	3,926 a
3.สูตรผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร	36.68 b	63.32	2,888 ab
4. น้ำเปล่า	42.94 c	-	1,926 b
CV (%)	24.52837		29.08872

1/ ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT