# การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง

# Development Powder Formulation of *Bacillus subtilis* DOA-WB4 for Controlling *Ralstonia solanacearum* Caused Potato Bacterial Wilt Disease

**บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล**
**ทิพวรรณ กันหาญาติ รุ่งนภา ทองเครั่ง**
**กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

## รายงานความก้าวหน้า

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง โดยการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 มาพัฒนาเป็นสูตรผงสำเร็จอย่างง่าย ทำการเพิ่มปริมาณบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) และนำมาผสมกับสารละลาย magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ได้ผลิตภัณฑ์แบบผงที่มีปริมาณเชื้อ *B. subtilis* $4.3 \times 10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม สูตรผงสำเร็จนี้เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือนที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) และสามารถเก็บได้นาน 15 เดือนในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) เมื่อทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* แบบผงในระดับเรือนปลูกทดลองที่ศูนย์วิจัยเกษตรจังหวัดเชียงใหม่ อำเภอฝาง พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สามารถควบคุมโรคได้ 60%

## คำนำ

แบคทีเรีย *R. solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยวที่ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ตั้งแต่พืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิดในวงศ์ *Solanaceae* (Hayward, 1964) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่แบคทีเรียเข้าทำลาย สภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย ในประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียสาเหตุโรคนี้ โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจของประเทศ ได้แก่ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา เป็นต้น

---

**รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-01-54**

การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง และเป็นที่ยอมรับอย่างมาก การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้อง และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมสาเหตุโรคพืชทั้งราและแบคทีเรียจนกระทั่งผลิตรูปแบบผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลายเช่น รา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นต้น

แบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ มีอยู่มากมายทั้งในดินตามผิวพืชและแหล่งอาหารที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตสูงและสามารถแยกได้ง่าย และเจริญได้รวดเร็วที่บริเวณรากพืช นอกจากนี้แบคทีเรีย *B. subtilis* ยังมีความสามารถในการสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) (Baker and Cook, 1974) มีรายงานการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้แก่ Celino and Gotllieb (1952) ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* $B_3$ A ใส่ลงในดินที่มีแบคทีเรียสาเหตุโรค สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้และลดการเกิดโรคจาก 70 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ Aspiras and de la Cruz (1985) ได้รายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* FU 6 และ *Pseudomonas fluorescens* ที่มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ และมันฝรั่ง เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญที่บริเวณรากของต้นกล้าได้ดี และสามารถป้องกันการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ Karuna *et al.* (1997) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่ใช้ในการป้องกันกำจัดแบบชีววิธีได้แก่ *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าแบคทีเรีย *P. fluorescens* มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *B. subtilis* เมื่อนำไปใช้ในเรือนทดลอง พบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศที่เจริญเติบโตในดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ดี Sanaina *et al.* (1997) ศึกษาแบคทีเรียจากบริเวณรากของต้นมันฝรั่งโดยแยกแบคทีเรียจากรากของต้นปกติและรากของต้นที่เป็นโรค นำมาคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus cereus, B. subtilis* และ *Enterobacter cloaceae* ที่แยกได้จากรากมันฝรั่ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยทำการศึกษากับดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* 3 แห่งของประเทศอินเดีย คือ เมือง Bhowali Palampur และ Bhubaneswar สามารถลดการเกิดโรคได้ 66-83%, 27-70% และ 24-71% ตามลำดับ และพบว่าที่เมือง Bhowali และ Bhubaneswar มีผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 160% Guo *et al.* (2002) รายงานการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกโดยชีววิธี โดยใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* สายพันธุ์ J3, แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์ BB11 และ FH17 ที่

มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้ต้นพริก (Plant Growth Promoting Rhizosphere Bacteria) สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ 30% ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ J3 และ BH11 สามารถทำให้โรคลดลง 54 และ 65 % ตามลำดับ และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 80-100% ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ FH17 สามารถทำให้โรคลดลง 34 % ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 50% แต่เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมาผสมกันในอัตรา 1:1:1 พบว่าสามารถทำให้โรคลดลง 75 % และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 200%

งานวิจัยนี้เป็นการต่อยอดงานวิจัยของวงศ์ และคณะ (2548) ซึ่งได้ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค และพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สามารถป้องกันและควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นงานวิจัยเพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงที่ใช้ง่ายและสะดวกในการนำไปใช้ควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่งในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร และศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ โดยมุ่งเน้นการศึกษา สูตรอาหารและปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* จากนั้นนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยว ในแปลงปลูกมันฝรั่ง รวมทั้งติดตามตรวจสอบการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียและอายุของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในสภาพต่างๆ และพัฒนาสูตรสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สำหรับนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพและสะดวกในระดับแปลงปลูก

## วิธีดำเนินการ

**อุปกรณ์**

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้แช่แข็ง (Freezer) –20 องศาเซลเซียส
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter, Shaker, Spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi model 2001
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางดินเผา ปุ๋ย สารกำจัดแมลง สารป้องกันกำจัดโรคพืช และหัวพันธุ์มันฝรั่ง

**วิธีการ**

**1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สำหรับควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง**

**1.1 การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*** สายพันธุ์ DOA-WB4

**การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่าย** เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B.subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.1M magnesium sulfate ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียบนผิวอาหารให้ผสมในสารละลายจากนั้นนำไปผสมกับ carboxymethylcellulose 2.5% ในน้ำ ในปริมาตรที่เท่ากัน พักไว้ 20 นาที จึงผสมกับสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผสมให้เข้ากันดีก่อนนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดให้เป็นผงละเอียดแล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติกก่อนนำไปศึกษาต่อไป (Xu and Gross, 1986)

**การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จที่ผลิตได้** นำผงสำเร็จของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 จำนวน 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

**1.2 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*** สายพันธุ์ DOA-WB4 **ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ**

นำผงสำเร็จของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน

**2. การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis*** สายพันธุ์ DOA-WB4 **ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง**

**2.1 การเตรียมดินผสมแบคทีเรีย *R. solanacearum***

เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.1156 บนอาหารแข็ง PSA บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง เติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมเซลแบคทีเรียในน้ำกลั่นให้เป็นสารละลายแบคทีเรีย แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียมีความเข้มข้นประมาณ $1.0 \times 10^8$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายแบคทีเรียไปผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อดิน 8 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มเชื้อไว้ 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำดินที่บ่มเชื้อไว้มาตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ประมาณ $1.0 \times 10^8$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร จากนั้นนำดินที่ผสมเชื้อใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 0.8 กิโลกรัมต่อกระถาง จำนวน 120 กระถาง

**2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ในโรงเรือนทดลอง**

นำหัวพันธุ์มันฝรั่งมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง ก่อนนำมาคลุกด้วยผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก จากนั้นนำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ โดยรดด้วยผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 จำนวน 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์มันฝรั่งที่ไม่ได้คลุกด้วยผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อรดทุก 7 วัน

**การบันทึกข้อมูล** บันทึกจำนวนต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 7 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ในดินที่ใช้ปลูกมันฝรั่งทุก 7 วัน

**เวลาและสถานที่**

**ระยะเวลา**

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2558

**สถานที่ดำเนินการ**

กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงปลูกมันฝรั่งที่ศูนย์วิจัยการเกษตรจังหวัดเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

**1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สำหรับควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง**

การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 บนอาหารแข็ง TSA ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผึ่งให้แห้งสนิทในตู้ปลอดเชื้อ นำไปตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่ผลิตได้ โดยนำส่วนผสมผงสำเร็จแบคทีเรีย 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่เตรียมจากอาหารแข็ง TSA คือ $4.3 \times 10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม

**1.2 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผงสำเร็จที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ**

นำผงสำเร็จของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน ผลการทดลองพบว่า ผงสำเร็จแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน แต่ปริมาณแบคทีเรียเริ่มลดลงตั้งแต่

เดือนที่ 3 โดยลดลงจาก $2.3 \times 10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม เหลือ $3.5 \times 10^{9}$ หน่วยโคโลนี/กรัมและลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เดือนที่ 8 จนถึงเดือนที่ 12 จาก $2.6 \times 10^{8}$ หน่วยโคโลนี/กรัม เหลือเพียง $1.1 \times 10^{2}$ หน่วยโคโลนี/กรัม (ตารางที่ 1) ในขณะที่ผงสำเร็จแบคทีเรียที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง 15 เดือน โดยที่ความเข้มข้นลดลงจากเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย จากปริมาณเริ่มต้น $4.3 \times 10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ลดลงเหลือ $7.8 \times 10^{7}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ในเดือนที่ 15 (ตารางที่ 1 )

**<u>ตาราง 1</u> ปริมาณแบคทีเรีย**ปฏิปักษ์ ***B. subtilis*** **สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่มีชีวิตรอดใน**ผงสำเร็จแบคทีเรีย**ที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ**

| เดือนที่ | ปริมาณแบคทีเรีย (หน่วยโคโลนี/กรัม) | |
|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) | ตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) |
| 0 1/ | $4.3 \times 10^{10}$ | $4.3 \times 10^{10}$ |
| 1 | $3.7 \times 10^{10}$ | $5.3 \times 10^{10}$ |
| 2 | $2.3 \times 10^{10}$ | $4.1 \times 10^{10}$ |
| 3 | $3.5 \times 10^{9}$ | $5.1 \times 10^{10}$ |
| 4 | $1.9 \times 10^{9}$ | $4.9 \times 10^{10}$ |
| 5 | $2.1 \times 10^{9}$ | $2.7 \times 10^{10}$ |
| 6 | $2.5 \times 10^{8}$ | $2.3 \times 10^{10}$ |
| 7 | $2.6 \times 10^{8}$ | $3.1 \times 10^{10}$ |
| 8 | $1.8 \times 10^{7}$ | $5.4 \times 10^{9}$ |
| 9 | $3.3 \times 10^{5}$ | $4.4 \times 10^{9}$ |
| 10 | $3.6 \times 10^{4}$ | $3.6 \times 10^{9}$ |
| 11 | $2.4 \times 10^{3}$ | $3.7 \times 10^{9}$ |
| 12 | $1.1 \times 10^{2}$ | $8.5 \times 10^{8}$ |
| 13 | - | $4.8 \times 10^{8}$ |
| 14 | - | $3.9 \times 10^{8}$ |
| 15 | - | $7.8 \times 10^{7}$ |

0 1/ ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น

**2. การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง**

นำผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง โดยปริมาณประชากรของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในดินผสม ซึ่งเป็นประชากรเริ่มต้นคือ 4.6 x $10^6$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม พบว่าประสิทธิภาพของผงสำเร็จแบคทีเรียในการควบคุมโรคเหี่ยวในสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกมันฝรั่ง มีเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรคร้อยละ 60 โดยมีปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* 3.5 x $10^5$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม และมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เหลืออยู่เพียง 5.6 x $10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแสดงอาการของโรคเหี่ยว 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแบคทีเรีย *R. solanacearum* 7.7 x $10^5$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (ตารางที่ 2 )

**ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จแบคทีเรีย**ปฏิปักษ์ ***B. subtilis*** สายพันธุ์ DOA-WB4 **ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง**

| สัปดาห์ที่ | ผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtislis* | | | น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | เปอร์เซ็นต์[1/] การควบคุมโรคเหี่ยว | ปริมาณแบคทีเรีย (CFU*/ดิน 1 กรัม)[2/] | | เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรคเหี่ยว | ปริมาณแบคทีเรีย (CFU*/ดิน 1 กรัม)[2/] |
| | | *R. solanacearum* | *B. subtislis* | | *R. solanacearum* |
| 1 | 100[1/] | 4.6 x $10^6$ | 3.9 x $10^4$ | 100 | 3.2 x $10^6$ |
| 2 | 100 | 3.2 x$10^5$ | 3.7 x$10^4$ | 100 | 4.6 x$10^6$ |
| 3 | 90 | 1.4 x $10^5$ | 2.6 x $10^4$ | 80 | 2.2 x $10^7$ |
| 4 | 80 | 5.9 x$10^4$ | 5.7 x$10^4$ | 40 | 5.2 x$10^7$ |
| 5 | 70 | 3.6 x $10^4$ | 2.5 x $10^5$ | 0 | 6.6 x $10^6$ |
| 6 | 60 | 2.3 x$10^4$ | 2.9 x$10^5$ | 0 | 8.6 x$10^5$ |
| 7 | 60 | 5.6x$10^3$ | 3.5 x$10^5$ | 0 | 7.7 x$10^5$ |

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

[2/] CFU = หน่วยโคโลนี

## สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยเพิ่มปริมาณบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ผสมกับสารละลาย magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (talcum) ในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ได้ผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีปริมาณแบคทีเรีย $4.3 \times 10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม โดยสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ได้นาน 12 เดือน และเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ได้นาน 15 เดือน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง พบว่าสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกมันฝรั่ง ผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวร้อยละ 60 โดยมีปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* $3.5 \times 10^{5}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม

## เอกสารอ้างอิง


วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภานุอำไพ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtillis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

Aspiras, R.B. and A.R. de la Cruz. 1985. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*, pp. 89-92. *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. 1974. Biological Control of Soil-Borne Pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 433 p.

Celino, M.S. and D. Gotllieb. 1952. Control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus polymyxa*. Phytopathology. 42: 4. (Abstract).

Guo, J., H. Qi and S. Li. 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to Pepper bacterail wilt. Bacterial Wilt Newsletter. 17: 3.

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. App. Bacteriol. 27: 265-277.

Karuna, K., A.N.A. Khan and M. R. Ravikumar. 1997. Potential of biocontrol agent in the management of bacterial wilt of Tomato caused by *Ralstonia solanacearum.* Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

Sanaina, V., V. Kishore and G.S. Shekhawat. 1997. Biocontrol of bacterial wilt of potato by avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* and other Bactria. Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

Xu, G.W. and D.C. Gross. 1986. Field evaluation of the interaction among *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora* and potato yield. Phytophathology 76: 423-430.