รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปทุมมาและกระเจียว

กิจกรรม : การวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว

กิจกรรมย่อย : การบริหารจัดการโรคเหี่ยวของปทุมมาและกระเจียวโดยวิธีผสมผสาน

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 4415 และสายพันธุ์ ดินอ้อยno 6 เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of powder formulation of *Bacillus subtilis* 4415 strain and sugarcane soil no.6 strain for controlling Curcuma bacterial wilt disease

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล	กลุ่มวิจัยโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	: บูรณี พั่ววงษ์แพทย์	กลุ่มวิจัยโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ทิพวรรณ กันหาญาติ	กลุ่มวิจัยโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	รุ่งนภา ทองเครง	กลุ่มวิจัยโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	วิภาดา ทองทักษิณ	สถาบันวิจัยพืชสวน	
	สุธามาศ ณ น่าน	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย	

5. บทคัดย่อ

การเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 เพื่อเพิ่มปริมาณ ดำเนินการเลี้ยงในอาหารเหลว NGB และอาหารแข็งNGA นำแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณได้ไปทำเป็นผงเชื้อโดยใช้ผงทาคัมเป็นวัสดุรองรับ ผลิตผงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 จำนวน 2 กิโลกรัม ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 ในผงเชื้อทุกเดือนเพื่อเช็คความอยู่รอดและปริมาณ พบว่า ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ เป็นเวลา 15 เดือน พบว่า ผงเชื้อ มีอายุการเก็บรักษาที่ยังคงมีปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 ในผงเชื้อพบว่ามีปริมาณ $1X10^{10}$ cfu/g ที่ 12 เดือน หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรีย *B. Subtilis* จะลดลงโดยที่เก็บรักษาไว้ 15 เดือน มีปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 ที่ 6.4×10^{6}cfu/g และนำผงเชื้อไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าราดด้วยผงเชื้อ ในอัตรา 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตรรดทุก 7 วันให้ผลดีที่สุดด้วยสามารถควบคุมโรค ได้ 60% จากนั้นนำผงเชื้อไปทดสอบในสภาพแปลงทดลองที่ อำเภอหนองตาก

ยา จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า ผงเชื้อในอัตรา 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตรรดทุก 7 และ 15 วัน ให้ผลดีที่สุด ด้วยสามารถควบคุมโรค ได้ตั้งแต่ 63-65 %

6. คำนำ

ปทุมมาเป็นไม้พื้นเมืองของประเทศไทยที่นิยมนำไปเป็นไม้ประดับและไม้ตัดดอก มีการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไปขายยังต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ปัญหาสำคัญที่พบในการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมามีโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) ระบาดทำความเสียหายให้กับเกษตรกรและผู้ส่งออก แบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (wilt) ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิด โดยเฉพาะในประเทศไทยมีการปลูกพืชหลายชนิดที่พืชเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียชนิดนี้ ได้แก่ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา เป็นต้น *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียทางดินสามารถอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ได้ ทำให้การแพร่ระบาดของโรคนี้จึงสามารถแพร่ได้อย่างรวดเร็วและทั่วประเทศเมื่อมีการขนย้ายส่วนขยายพันธุ์ของพืชที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไปปลูกในที่ต่าง ๆ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลายสภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีเรีย *R. solanacearum* ยังเป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืช ถ้าพบแบคทีเรียนี้ติดไปกับหัวพันธุ์ที่ส่งออก หัวพันธุ์เหล่านั้นจะถูกเผาทำลายทันที ทำให้ไม่สามารถส่งออกได้

การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคสามารถที่จะคงอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคนี้ วิธีการป้องกันกำจัดยังคงจำกัด ได้มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธี ในการป้องกันกำจัดโรคนี้ ซึ่งการใช้วิธีควบคุมโรคเหี่ยวโดยชีววิธีนี้ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับและส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาใช้ โดยตระหนักถึงอันตรายจากการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมและช่วยแก้ปัญหาการดื้อสารเคมีของศัตรูพืชสำคัญหลายชนิด ตลอดจนเพิ่มทางเลือกในการพิจารณาใช้วิธีใดวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการควบคุมศัตรูพืชแก่เกษตรกร

การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวกับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น ปทุมมา มันฝรั่ง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้วิธีการจัดการดิน วิธีเขตกรรม ร่วมกับการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง

ณัฏฐิมา *et al.* (2551) ศึกษาการเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ 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 คือ1.1×10^{10} และ 0.7×10^{10} CFU/กรัม ตามลำดับ นำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 °C มีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน และ15 เดือน ตามลำดับ เมื่อนำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพ

ของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงพบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60 % ในเรือนทดลองและ 30-37 % ในแปลงทดลองปีที่ 1 และ 67.5-72.5% ในปีที่สอง

ณัฏฐิมา *et al* (2551) ได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4415 และ รากอ้อย no.6 ที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในแปลงทดลองได้ 43 และ 40 % ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เตรียมในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์ และ/หรือราดลงบนดินซึ่งเป็นการไม่สะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในสภาพแปลง และวิธีการปฏิบัติเช่นนี้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มักไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลแบคทีเรียตายลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนารูปแบบการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว ให้อยู่ในรูปที่ง่ายต่อการบรรจุหีบห่อ ขนส่ง และเกษตรกรนำไปใช้ได้สะดวก และสามารถนำไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆได้

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นงานวิจัยเพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ปฏิปักษ์ 4415 และรากอ้อย no.6 ให้อยู่ในรูปที่ง่ายต่อการบรรจุหีบห่อ ขนส่ง และเกษตรกรนำไปใช้ได้สะดวก

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

- อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ
- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
- เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ปทุมมา

วิธีการ

1. **การเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6**

เลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ในอาหารเหลว nutrient broth (NB) นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ 150 rpm. นาน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตกตะกอนเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเวี่ยง นำเซลล์แบคทีเรียไปผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, methylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และผงทัลคัม (Talcum) 1:4 (V:W) ผสมให้เข้ากันดีในสภาพปลอดเชื้อ บรรจุในถุงพลาสติก (Vidhyasekaran and Muthamilan, 1995)

2. **การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่ผลิตได้**

นำส่วนผสมผงเชื้อ 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณเชื้อ *B.subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับเชื้อ *B.subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

3. **การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ**

ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *B. subtilis* และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆของหัวเชื้อที่ผลิตได้ โดยทดสอบ 2 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษา 15 เดือน ทำการตรวจนับปริมาณตรวจนับเชื้อ *B.subtilis* ทุกเดือน

4. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนทดลอง

4.1 การเตรียมดินผสมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

เลี้ยงเชื้อ *R.solanacearum* บนอาหารแข็ง Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมน้ำนึ่ง 10 มล.ต่อจานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียผสมในน้ำเพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ปรับให้มีความเข้มข้น $1x10^6$ cfu/ml. นำไปผสมคลุกเคล้ากับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตรา 1:10 (ปริมาตร:น้ำหนัก) นำดินที่ผสมเชื้อสาเหตุโรคไปตรวจหาปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ก่อนนำดินไปบรรจุในกระถางเพื่อเตรียมไว้ปลูกพืชทดสอบต่อไป

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนทดลอง

วางแผนการทดลอง RCB 4 ซ้ำๆละ 10 ต้น จำนวน 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 0.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.0 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 2.0 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 5 กรรมวิธีควบคุม รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ปทุมมา ล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งมาคลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 จากนั้นเตรียมผงเชื้อตามกรรมวิธีที่กำหนด นำไปรดพืชทดสอบที่ปลูกไว้ในกระถางทุก 1 สัปดาห์ สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ปทุมมาที่ไม่ได้คลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* และใช้น้ำนึ่งรดพืชทดสอบแทนการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

4.3 การบันทึกข้อมูล

4.3.1 บันทึกปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* ในดินที่เตรียมไว้ก่อนนำไปใช้ปลูกพืชทดสอบ

4.3.2 บันทึกจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคเหี่ยวทุกสัปดาห์

5. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในแปลงทดลอง

5.1 การเตรียมแปลงทดลอง

เตรียมแปลงทดลองที่ อำเภอหนองตากยา จังหวัดกาญจนบุรี โดยทำการเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่ำเสมอ ปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวลงในแปลงทดสอบ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum*

ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ลงบนต้นมะเขือเทศ โดยวิธี clipping method ทิ้งไว้ประมาณ 1 เดือน ต้นมะเขือเทศแสดงอาการของโรคเหี่ยว จากนั้นสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียดและปล่อยให้ย่อยสลายในแปลงทดสอบ จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด 8.0 x 1.5 เมตร จำนวน 20 แปลง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อของแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลองต่อไป

5.2 ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในแปลงทดลอง

วางแผนการทดลอง RCB 5 ซ้ำๆละ 20 หัว จำนวน 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 15 วัน

กรรมวิธีที่ 3 สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ปทุมมา ล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งมาคลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในแปลงที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 จากนั้นเตรียมผงเชื้อตามกรรมวิธีที่กำหนด สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ปทุมมาที่ไม่ได้คลุกด้วยผงเชื้อ *B.subtilis* และใช้น้ำนึ่งรดพืชทดสอบแทนการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

5.3 การบันทึกข้อมูล

5.3.1 บันทึกปริมาณเชื้อ *R.solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงทดสอบก่อนนำพืชไปปลูก

5.3.2 บันทึกจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 - ก.ย.56 ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร และ แปลงเกษตรกร จังหวัดเชียงราย

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อยno 6

การเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อยno 6 ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) บนเครื่องเขย่าที่ 150 rpm. นาน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 400 ml มาตกตะกอนเซลล์ แบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเวี่ยง นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ ไปผสมกับ 0.1 M magnesium sulfate จำนวน 100 ml ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นเติมด้วย 2.5% methylcellulose จำนวน 100 ml ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน เติมผงทัลคัม (Talcum) จำนวน 400 กรัม ผสมให้เข้ากันดี ผึ่งให้แห้งสนิทในตู้ปลอดเชื้อ บรรจุในถุงพลาสติก (Vidhyasekaran and Muthamilan, 1995) เพื่อนำไปนำไปตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่ผลิตต่อไป

2. การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่ผลิตได้

โดย นำส่วนผสมผงเชื้อ 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับเชื้อ *B. subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารได้ พบว่า ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อยno 6 ที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เตรียมจากอาหารเหลว TSB คือ 1.1×10^{10} และ 0.7×10^{10} CFU/กรัม ตามลำดับ

3. การตรวจเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

นำผงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ แบ่งแต่ละสายพันธุ์ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 °C) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 °C) ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในผงเชื้อสูตรต่าง ๆ ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน ผลการทดลอง ผงเชื้อที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน แต่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียของทั้งสองสายพันธุ์ลดลง โดยเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนที่ 3 และลดลงอย่างรวดเร็วในตั้งแต่เดือนที 8 จนถึงเดือนที่ 12 โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 ลดจาก 1.1×10^{10} CFU/กรัม เหลือเพียง 1.0×10^{2} CFU/กรัม และ *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินอ้อยno 6 จาก 0.7×10^{10} CFU/กรัม เหลือเพียง 0.5×10^{2} CFU/กรัม (ตารางที่ 1) ในขณะที่ผงเชื้อที่เก็บรักษาในตู้เย็น ยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง 15 เดือนโดยที่ความเข้มข้นลดลงจากเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 จากปริมาณเริ่มต้น 1.1×10^{10} CFU/กรัม ลดลงเหลือ 2.3×10^{7} CFU/กรัม และ *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินอ้อยno 6 จากปริมาณเริ่มต้น 0.7×10^{10} CFU/กรัม ลดลงเหลือ 6.4×10^{6} CFU/กรัม ในเดือนที่ 15 (ตารางที่ 1)

4. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนทดลอง

นำผงเชื้อที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลอง วางแผนการทดลอง RCB 4 ซ้ำๆละ 10 ต้น จำนวน 5 กรรมวิธี โดยปริมาณประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* ในดินผสม ซึ่งเป็นประชากรเริ่มต้นคือ 2.4×10^{6} CFU/ดิน 1 กรัม พบว่า กรรมวิธีที่ 3 การใช้สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม และกรรมวิธีที่ 4 การใช้สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 2.0 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ให้ผลการควบคุมโรคเหี่ยวในเรือนปลูกพืชทดลองได้ดีที่สุด โดยพบโรคเหี่ยว 40% สามารถควบคุมโรคได้ 60%ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบถึงโรคเหี่ยว 100% (ตารางที่ 2)

5. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในแปลงทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 ในสภาพแปลงทดลองที่ อำเภอหนองตากยา จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า การควบคุมโรคเหี่ยวของผงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 โดยการคลุกหัวพันธุ์ด้วย 1% ผงเชื้อและราดด้วย ผงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อัตราอย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วันและ 15 วัน ให้ผลการควบคุมโรคดีที่สุด โดยมีการเกิดโรคเหี่ยวเพียง 35 และ 37 % ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยว 65 และ 63 % (ตารางที่ 3) ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อพบเกิดโรคเหี่ยวร้อยละ 80 (ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 พบว่า การใช้ผงเชื้อโดยการคลุกหัวพันธุ์ด้วย 1% ผงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์และรดด้วยผงเชื้อทั้งสองใน

อัตราอย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 และ 15 วัน ให้ผลการควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีกว่า การใช้ผงเชื้อ ทุก 30 วัน และการใช้ผงเชื้อ ทุก 7 วัน และ 15 วัน ให้ผลการควบคุมไม่แตกต่างกัน แต่การใช้ผงเชื้อ ทุก 7 วัน ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน ดังนั้น การใช้ผงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 โดยการคลุกหัวพันธุ์ด้วย 1% ผงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์และรดด้วยผงเชื้อทั้งสองในอัตราอย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 20 ลิตร 15 วัน ให้ผลการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาที่ดีที่สุด ประหยัดและสิ้นเปลืองน้อยที่สุด

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 โดยนำแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณได้จากอาหารเหลว TSB ไปทำเป็นผงเชื้อโดยใช้ผงทาคัมเป็นวัสดุรองรับ ได้ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อยno 6 ที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เตรียม คือ1.1x1010 และ 0.7x 1010 CFU/กรัม ตามลำดับ ทดสอบอายุของการเก็บรักษาผงเชื้อ พบว่าผงเชื้อสามรถเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิห้องได้นาน 3 เดือน ในขณะที่เก็บไว้ที่ตู้เย็น สามารถเก็บได้นาน 15 เดือน เมื่อนำผงเชื้อไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าราดด้วยผงเชื้อ ในอัตรา 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตรรดทุก 7 วันให้ผลดีที่สุด ด้วยสามารถควบคุมโรค ได้ 60% จากนั้นนำผงเชื้อไปทดสอบในสภาพแปลงทดลองที่ อำเภอหนองตากยา จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า ผงเชื้อในอัตรา 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตรรดทุก 7 และ 15 วัน ให้ผลดีที่สุด ด้วยสามารถควบคุมโรค ได้ตั้งแต่ 63-65 %

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ชีวภัณฑ์ชนิดผง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ อ้อย no.6 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย ทำให้ ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ตรงตามความต้องการของตลาดต่างประเทศ สามารถส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไปยังต่างประเทศ ทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายล้านบาท สามารถนำไปขยายผลทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในพื้นที่ปลูกปทุมมา และถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่เกษตรกร เป็นการช่วยเหลือเกษตรกรให้สามารถมีรายได้เพิ่มมากขึ้น มีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น ยังเป็นการส่งเสริมการทำเกษตรอินทรีย์ และอาหารปลอดภัย ตามนโยบายของประเทศอีกด้วย นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ และแพร่หลายสู่เกษตรกรทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ตรงตามความต้องการของตลาด เกษตรกรสามารถปลูกปทุมมาซ้ำที่เดิมได้ เป็นการลดปัญหาการบุกรุกทำลายป่าเพื่อหาพื้นที่

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วนิดา ฐิตะฐาน. 2541. ศึกษาเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของปทุมมา. รายงานผลงานวิจัย ปี 2541. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 24-35.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ และบุษราคัม อุดมศักดิ์ 2551. พัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวในขิง. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัย

พัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล วิภาดา ทองทักษิณ และสุธามาศ ณ น่าน 2551. การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของปทุมมาโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. 2537. ปทุมมา. กสิกร. 67(5):415-419.

สุเนตรา ภาวิจิตร , ณัฏฐิมา บุญวัฒน์ และนิยมรัฐ ไตรศรี. 2538. โรคหัวเน่าของกระเจียวและปทุมมา ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 5(4) : 92

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2537 ปทุมมาและกระเจียว. น.58-72. ใน : ไม้ตัดดอกเขตร้อน. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.159 น.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว (Curcuma) ไม้ดอกไม้ประดับ. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด,กรุงเทพฯ.128 น.

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.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltomore.

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.

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

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 2 nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรีย*Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผงเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)			
	Bacillus subtilis สายพันธุ์ 4415		*Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินอ้อย no.6	
	อุณหภูมิห้อง (27-30 °C)	ตู้เย็น (4-6 °C)	อุณหภูมิห้อง (27-30 °C)	ตู้เย็น (4-6 °C)
0 [1/]	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}	0.7×10^{10}	0.7×10^{10}
1	0.8×10^{10}	1.0×10^{10}	8.9×10^{9}	0.7×10^{10}
2	0.2×10^{10}	1.0×10^{10}	7.6×10^{9}	0.5×10^{10}
3	2.3×10^{9}	1.0×10^{10}	2.5×10^{9}	0.4×10^{10}
4	1.4×10^{9}	1.0×10^{10}	1.2×10^{9}	0.4×10^{10}
5	3.3×10^{8}	1.0×10^{10}	4.3×10^{8}	0.3×10^{10}
6	0.8×10^{7}	0.9×10^{10}	2.8×10^{7}	0.2×10^{10}
7	2.9×10^{6}	0.3×10^{10}	3.8×10^{6}	9.7×10^{9}
8	1.7×10^{5}	9.0×10^{9}	1.9×10^{5}	8.5×10^{9}
9	2.2×10^{4}	8.0×10^{9}	2.0×10^{4}	8.0×10^{9}
10	1.3×10^{4}	8.6×10^{9}	1.1×10^{4}	6.8×10^{9}
11	3.2×10^{3}	8.3×10^{9}	4.3×10^{3}	3.7×10^{9}
12	1.0×10^{2}	3.0×10^{8}	0.5×10^{2}	6.7×10^{8}
13	-	2.5×10^{8}		2.7×10^{8}
14	-	1.5×10^{8}		6.7×10^{7}
15	-	2.3×10^{7}		6.4×10^{6}

[1/] **ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น**

ตารางที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของ ปทุมมาในเรือนทดลอง

กรรมวิธี	การเกิดโรค (%)	การควบคุมโรค (%)
1. สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 0.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน	80[1/]	20[2/]
2. สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.0 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน	60	40
3. สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน	40	60
4. สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 2.0 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน	40	60
5. กรรมวิธีควบคุม รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	100	-

-1/ การเกิดโรค (%) = $\frac{\text{จำนวนต้นตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

-2/ การควบคุมโรค (%) = $\frac{\text{จำนวนต้นรอดตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

ตารางที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของ ปทุมมาในแปลงทดลอง

กรรมวิธี	การเกิดโรค (%)	การควบคุมโรค (%)
1. สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วัน	35	65
2. สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 15 วัน	37	63
3. สูตรผง *B. subtilis* สายพันธุ์ 4415 และ ดินอ้อย no. 6 อย่างละ 1.5 กรัม/น้ำ 5 ลิตร ทุก 30 วัน	55	45
4. กรรมวิธีควบคุม รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	80	-