การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย

Development of Bioproduct of *Bacillus subtilis* BS-DOA 24 strain for Controlling Bacterial Wilt of Ginger

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ทิพวรรณ กันหาญาติ รุ่งนภา ทองเครึ่ง

Nuttima Kositcharoenkul Buranee Puawongphat Tippawan Kanhayart Rungnapha Thong kreng

ABSTRACT

All 135 isolates of *Bacillus subtilis* were isolated from soil, roots and manure that were collected from 9 Provinces. The 8 isolates (BS-DOA 24, BS-DOA 69, BS-DOA 97, BS-DOA 108, BS-DOA 114, BS-DOA 123 BS-DOA 125 and BS-DOA 132) from 135 isolates were selected as antagonistic bacteria which can inhibit the growth of *Ralstonia solanacearum* causes bacterial wilt of Ginger in the laboratory. All antagonistic bacteria were tested for effectiveness in controlling bacterial wilt of Ginger plants in the greenhouse and experimental plots. The results showed that the antagonistic bacteria were BS-DOA 24 and BS-DOA 123 can control the disease 60%. The two antagonistic bacterial isolates were tested effective in controlling bacterial wilt of Ginger in the field. The results showed that antagonistic bacteria BS-DOA 24 can control the disease 68%. The antagonistic bacteria *B. subtilis* BS-DOA 24 was carried out to develop bioproduct as powder formulation using talcum 1:4 (V/W) gave the high population of *B. subtilis* BS-DOA 24 of $1.1x10^{10}$ CFU/g. The bioproduct storage for 12 months at room temperature and 15 months at 4 ^{o}C is still effective in controlling bacterial wilt of Ginger in greenhouse at 60% and in the wilt infested field at range 62-65%. The bioproduct of *B. subtilis* BS-DOA 24 was tested effective in controlling bacterial wilt of Ginger in a farmer's field at Phetchabun province. The results showed that the bioproduct can control the wilt at 62 % and harvest up to 2,260 kg / Rai. In this research, bioproduct of *B. subtilis* BS-DOA 24 was developed as a model to be extended to commercial production. Current, the Ladda Co.,Ltd. had requested the antagonistic bacteria *B. subtilis* BS-DOA 24 in order to develop the industry scale which is to bring the research of the Department of Agriculture to develop further commercial production and spread to farmers in the future.

Key words : Ginger, Bacterial Wilt

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จำนวน 135 ไอโซเลท ถูกแยกจากดิน รากพืช และปุ๋ยคอกจาก 9 จังหวัด นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของขิง ในห้องปฏิบัติการพบว่ามีสามารถคัดเลือกได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 8 ไอโซเลท (BS-DOA 24, BS-DOA 69, BS-DOA 97, BS-DOA 108, BS-DOA 114, BS-DOA 123 BS-DOA 125 และ BS-DOA 132) จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้ร้อยละ 60 นำแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 ไปทดสอบในสภาพแปลงทดลอง พบว่า *B. subtilis* BS-DOA 24 สามารถควบคุมโรคได้ร้อยละ 68 จากนั้นนำแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 ไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงสำเร็จอย่างง่าย โดยใช้ ผง talcum เป็นสารพาในอัตรา 1:4 (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ $1.1x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ชีวภัณฑ์นี้เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลองได้ร้อยละ 60 และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลองที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวของขิงได้ร้อยละ 62-65 จากนั้นนำชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร ที่จังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงเกษตรกรร้อยละ 62 และได้ผลผลิต 2,260 กิโลกรัม/ไร่ ผลจากการวิจัยนี้สามารถนำ ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 ที่ได้พัฒนาเป็นต้นแบบไปขยายผลสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ ซึ่งในปัจจุบันมีบริษัท ลัดดา จำกัด มาขอรับการถ่ายทอดแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* BS-DOA 24 เพื่อต่อยอดในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นจะการนำผลงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตรไปใช้ประโยชน์พัฒนาต่อยอดในเชิงพาณิชย์ และแพร่หลายสู่เกษตรกรในอนาคต

คำหลัก: ขิง, โรคเหี่ยว

คำนำ

ขิง (*Zingiber officinalis* Rosc.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีที่มีศักยภาพในการส่งออก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทั้งใช้เป็นอาหาร เครื่องดื่ม ยารักษาโรค และเครื่องสำอางค์ เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ แหล่งเพาะปลูกขิงที่สำคัญอยู่ในแถบภาคเหนือเขตจังหวัด เชียงราย พะเยา เลย เพชรบูรณ์ และบางจังหวัดในภาคใต้ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และชุมพร เกษตรกรสามารถจำหน่ายผลผลิตโดยเข้าสู่ตลาดสดและโรงงานแปรรูป และยังมีโดยมีการส่งออกไปยังต่างประเทศในรูปขิงแห้งและขิงสด มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี โดยใน ปี พ.ศ. 2554 ส่งออกปริมาณ 39,137 ตัน มูลค่า 865.7 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) อย่างไรก็ตามการปลูกขิงในประเทศไทยไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากปัญหาและอุปสรรคหลายประการที่

สำคัญคือเรื่องของโรคและการป้องกันกำจัด โดยเฉพาะโรคเหี่ยวจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โรคนี้ทำความเสียหายอย่างสูงต่อการผลิตและการตลาดของขิง ทำให้ขิงที่ผลิตได้มีผลผลิตต่ำและคุณภาพไม่ตรงตามความต้องการของตลาด เกษตรกรสูญเสียรายได้ นอกจากนี้เกษตรกรยังไม่สามารถปลูกขิงซ้ำที่เดิมได้เพราะจะเกิดโรคระบาดรุนแรงในปีต่อมา จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนที่ปลูกทุกปีทำให้พื้นที่ปลูกหมดไป ต้องบุกรุกทำลายป่าเพื่อหาพื้นที่ปลูกขิง การป้องกันกำจัดโรคนี้มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรคเหี่ยว ซึ่งพบว่าการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง และเป็นที่ยอมรับอย่างมาก การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้อง และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมสาเหตุโรคพืชทั้งราและแบคทีเรียจนกระทั่งผลิตรูปแบบผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลายเช่น รา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นต้น

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นงานวิจัยเพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ใช้ง่าย แปลงปลูก สามารถถ่ายทอดให้กับเกษตรกรเพื่อในไปใช้ประโยชน์ในการผลิตขิง และเป็นต้นแบบในการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ และแพร่หลายสู่เกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากดิน ปุ๋ยคอกและรากพืชต่าง ๆ

การเก็บตัวอย่างรากพืช ดิน และปุ๋ยคอก เก็บตัวอย่างพืชที่ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวในแปลงปลูกพืชที่มีโรคเหี่ยวระบาดโดยเก็บราก ของพริก ยาสูบ กล้วย ปทุมมา มันฝรั่ง มะเขือเทศ และปุ๋ยคอก จาก จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง กาญจนบุรี ปทุมธานี นนทบุรี ชุมพร และนครปฐม จำนวน 20 ตัวอย่าง และเก็บดินบริเวณรอบราก จำนวน 20 ตัวอย่าง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างปุ๋ยคอกจากแปลงปลูกพืช จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง

การแยกแบคทีเรียจากดินและปุ๋ยคอก นำตัวอย่างดินและปุ๋ยคอกที่เก็บมาได้ ผึ่งลมให้แห้งพอหมาด ๆ นำมาแยกแบคทีเรียตามวิธี soil plate method จากนั้นนำสารละลายดินหรือปุ๋ย 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญเติบโต คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีตามวิธีการของ Holt *et al.*(1994)

การแยกแบคทีเรียจากรากพืช นำตัวอย่างรากพืชมาล้างดินบริเวณรากพืชออกหมด ชั่งตัวอย่างรากพืช จำนวน 1 กรัม นำมาบดในโกร่งนึ่งฆ่าเชื้อให้ละเอียด เติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ไว้นาน 20 นาที ทำให้เจือจางโดยวิธี serial dilution จากนั้นนำตัวอย่างรากพืช 0.1 มิลลิลิตร ไปกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA เก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญเติบโต คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีตามวิธีการของ Holt *et al.*(1994)

2. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

การเตรียมแบคทีเรีย *R. solanacearum* นำแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวที่แยกได้จากขิง จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ No.28 และ No.1378 จาก จังหวัดเชียงราย และเพชรบูรณ์ มาเลี้ยงบนอาหารเอียง Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทำสารละลายแบคทีเรียโดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทำ double layer ลงบนอาหาร PSA โดยนำหลอดอาหาร PSA ปริมาตร 7 มิลลิลิตร หลอมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมด้วยสารละลายแบคทีเรีย 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับลงในจานเลี้ยงเชื้อมีอาหาร PSA เทอยู่แล้วปริมาตร 15 มิลลิลิตร เอียงจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ส่วนบนกระจายคลุมทั่วผิวหน้าชั้นล่างที่เทไว้แล้ว เมื่ออาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อลง

การเตรียมแบคทีเรีย *B. subtilis* นำแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่แยกได้จากพืช ดิน และปุ๋ยคอก มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง (optical density) 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียมีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว ในสภาพห้องปฏิบัติการโดยวิธี disc diffusion method ใช้ micropipette หยดสารละลายของแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เตรียมไว้แล้ว แต่ละไอโซเลท 10 ไมโครลิตรลงบนกระดาษแผ่นกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้ววางบนผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยการวัดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของแบคทีเรียถึงขอบบริเวณใส

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนทดลอง

การเตรียมดินปลูกขิงที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* นำสารละลายแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.28 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตร100 มิลลิลิตร/ดิน 8 กิโลกรัม ผสมคลุกให้เข้ากัน ตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates นำดินที่ผสมเชื้อแล้วใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 0.8 กิโลกรัม/กระถาง จำนวน 90 กระถาง

การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ มาทำเป็นสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความเข้มข้น 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

การทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนทดลอง โดย วางแผนการทดลองแบบ complete randomize design (CRD) มี 9 กรรมวิธี 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24
กรรมวิธีที่ 2 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 69
กรรมวิธีที่ 3 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 97
กรรมวิธีที่ 4 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 108
กรรมวิธีที่ 5 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 114
กรรมวิธีที่ 6 แบคทีเรียปฏิปักษ์. BS-DOA 123
กรรมวิธีที่ 7 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 125
กรรมวิธีที่ 8 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 132
กรรมวิธีที่ 9 กรรมวิธีควบคุม น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ขิง แช่ ในสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีที่เตรียมไว้ นาน 30 นาที ผึ่งให้แห้ง ก่อนปลูกในดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้ กรรมวิธีละ 10 กระถาง ๆ ละ 1 หัว รดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธี ปริมาตร 50 มิลลิลิตร/ต้นทุกๆ 7 วัน

การบันทึกผล บันทึกต้นขิงที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 15, 30 และ 45 วัน และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ทุก 15, 30 และ 45 วัน

4. การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง

การเตรียมแปลงทดลอง เตรียมแปลงทดลองที่ ศูนย์วิจัยพืชสวน ลำปาง โดย ทำการเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่ำเสมอ โดยปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum* No. 28 ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร โดยวิธี clipping method ทิ้งไว้ประมาณ 1 เดือน ต้นมะเขือเทศแสดงอาการของโรคเหี่ยว จากนั้นทำการสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียดและปล่อยให้ย่อยสลายในแปลงทดสอบ จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด 8.0 x 1.5 เมตร จำนวน 20 แปลง

การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในโรงเรือนทดลอง และ แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพน้อยในการควบคุมโรคเหี่ยวที่ใช้เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มาทำเป็นสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์ความเข้มข้นประมาณ 1.0 x 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง

การทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) มี 4 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 20 หัว ดังรายเอียดกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24
กรรมวิธีที่ 2 แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 123
กรรมวิธีที่ 3 กรรมวิธีเปรียบเทียบ BS-DOA 69
กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ขิง มาแช่ในสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีที่เตรียมไว้ นาน 30 นาที ผึ่งให้แห้ง ปลูกหัวพันธุ์ขิงโดยใช้ 20 หัวต่อแปลง หลังปลูกขิง รดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีให้ทั่วทั้งแปลง ทำการรดแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุก ๆ 15 วัน จำนวน 14 ครั้ง เป็นเวลา 7 เดือน

การบันทึกผล บันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวและตาย ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแต่ละกรรมวิธี เดือนละครั้ง และบันทึกน้ำหนักและปริมาณของผลผลิตที่ได้

5. การพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรผงของแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 สำหรับควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

5.1 การเตรียมชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24

การเตรียมชีวภัณฑ์ชนิดผง เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B.subtilis* BS-DOA 24 บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.1M magnesium sulfate ปริมาตร 10 มิลลิลตร/จานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียบนผิวอาหารให้ผสมในสารละลายจากนั้นนำไปผสมกับ carboxymethylcellulose 2.5% ในน้ำ ในปริมาตรที่เท่ากัน พักไว้ 20 นาที จึงผสมกับสารพาผงทัลคัม (Talcum) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1:4 โดยปริมาตร/น้ำหนัก ผสมให้เข้ากันดีก่อนนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดให้เป็นผงละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 35 mesh เก็บไว้ในถุงพลาสติกก่อนนำไปศึกษาต่อไป (Xu and Gross, 1986)

การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ชนิดผงที่ผลิตได้ นำชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

5.2 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผงสำเร็จที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

นำชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ชนิดผง ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน

6. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

การเตรียมดินผสมแบคทีเรีย *R. solanacearum* นำสารละลายแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.28 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร นำไปผสมคลุกเคล้ากับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตรา 1:10 (ปริมาตร:น้ำหนัก) นำดินที่ผสมแบคทีเรียไปตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ก่อนนำดินไปบรรจุในกระถางเพื่อเตรียมไว้ปลูกพืชทดสอบต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 นำหัวพันธุ์ขิงมาคลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ รดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย $1x10^9$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร) ทุก 7 วัน สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงที่ไม่ได้คลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงและใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อรดทุก 7 วัน

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

7. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง

การเตรียมแปลงทดลอง เตรียมแปลงทดลองที่ ศูนย์วิจัยพืชสวน ลำปาง โดยทำการเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่ำเสมอ ปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวลงในแปลงทดสอบ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum* No. 28 ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ลงบนต้นมะเขือเทศโดยวิธี clipping method ทิ้งไว้ประมาณ 1 เดือน จากนั้นสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียด จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด 8.0 x 1.5 เมตร จำนวน 12 แปลง

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ๆ ละ 20 หัว ดังรายเอียดกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 15 วัน

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 60 วัน

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม หัวพันธุ์ขิงไม่คลุกชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ขิงของกรรมวิธีที่ 1-3 ไปคลุกด้วยใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก แล้วไปปลูกในแปลงทดลองตามแผนการทดลอง

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นขิงที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน

8. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร

ทำการทดสอบในแปลงปลูกขิงของเกษตรกร อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ขนาด 2 งาน โดยการเลือกแปลงปลูกขิงที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว ทำการตรวจหาปริมาณของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกก่อนการทดลอง

ทำการทดลอง โดยแบ่งแปลงทดลองเป็น 2 แปลง ขนาดแปลงละ 1 งาน คือ

แปลงที่ 1 ทำการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง ด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 โดยนำหัวพันธุ์ขิงพันธุ์ขิงหยวก คลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 30 วัน

แปลงที่ 2 แปลงเปรียบเทียบ ปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงที่ไม่ได้คลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงและใช้น้ำเปล่ารดพืชแทนการใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นขิงที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน และ เก็บน้ำหนักและปริมาณของผลผลิตที่ได้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* จากดินและรากพืชต่าง ๆ

ผลการแยกแบคทีเรียจาก ดิน รากพืช และปุ๋ยคอก จำนวน 50 ตัวอย่าง นำมาคัดเลือกหาแบคทีเรีย *B. subtilis* ตามวิธีการของ Holt *et.al.*(1994) สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้จำนวน 135 ไอโซเลท เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน glycerol 20% ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

คัดเลือกได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ 8 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24, BS-DOA 69, BS-DOA 97, BS-DOA 108, BS-DOA 114, BS-DOA 123 BS-DOA 125และ BS-DOA 132 (Table 1) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้มากที่สุดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองมีการผลิตสารปฏิชีวนะออกมาจำนวนมากโดยมีความกว้างของบริเวณใส 3.36- 4.85 มิลลิเมตร (Table 2; Figure 1)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนทดลอง

ผลการทดลองพบว่าต้นขิงที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้ดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวร้อยละ 60 ในขณะที่ต้นขิงที่เป็นตัวเปรียบเทียบที่รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแสดงอาการของโรค 100% ตั้งแต่ 15 วันหลังปลูก (Table 3 ; Figure 2)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าสอดคล้องกับผลทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดย ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวมากที่สุดมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1.5×10^{5} และ 1.75×10^{5} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ (Table 4) ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในกรรมวิธีที่ใช้ แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 ลดลง โดยมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* 2.75×10^{4} และ 5.6×10^{4} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ (Table 4) จากผลทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 มีการผลิตสารปฏิชีวนะออกมาจำนวนมากและสามารถอยู่ในดินปลูกขิงได้นาน จึงทำให้ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับที่ Baker และ Cook (1974) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ (endospore) ซึ่งมีความทนทาน และอยู่รอดสูงแม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง ในสภาพแปลงทดลอง

ผลการทดสอบพบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* BS-DOA 24 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและการควบคุมโรคแตกต่างกับกรรมวิธีอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีการเกิดโรคเหี่ยวเพียงร้อยละ 32 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวร้อยละ 68 ให้ผลผลิต 4,288.03 กิโลกรัม/ไร่ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคร้อยละ 86 ได้น้ำหนักผลผลิตเพียง 287.44 กิโลกรัม/ไร่ (Table 5; Figure 3) จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sanaina *et al.* (1997) ที่คัดเลือกแบคทีเรีย *B. cereus, B. subtilis* จากบริเวณรากของต้นมันฝรั่ง สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ถึง 83% ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 160% เช่นเดียวกับ Guo *et al.* (2002) ได้รายงานการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BH11 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ 30% ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง ทำให้โรคลดลง 65 % ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 80-100% ในสภาพแปลง จากการทดลองพบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการทดสอบนี้เป็นการใช้ในรูปเซลแขวนลอยของแบคทีเรียทำให้ไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ในสภาพแปลง และประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* มักไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรผงที่ใช้สะดวกและมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่อไป

5. การพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรผงของแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 สำหรับควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

5.1 การเตรียมชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24

ได้ชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 ที่มีผงทัลคัม (Talcum) เป็นสารพา หลังจากผึ่งให้แห้งสนิทในตู้ปลอดเชื้อ นำไปตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์สูตรผง โดยวิธี dilution plating บนอาหาร NA พบว่า ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์สูตรผง คือ$1.1x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม

5.2 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผงสำเร็จที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

ผลการทดลองพบว่า ชีวภัณฑ์สูตรผงแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน แต่ปริมาณแบคทีเรียเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนที่ 3 และลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เดือนที่ 8 จนถึงเดือนที่ 12 เหลือเพียง 1.0×10^{2} หน่วยโคโลนี/กรัม (Table 6) ในขณะที่ชีวภัณฑ์สูตรผงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง 15 เดือน โดยในเดือนที่ 15 ยังมีความเข้มข้นเหลือ 4.3×10^{7} หน่วยโคโลนี/กรัม (Table 6)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

พบว่า ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์สูตรผงในการควบคุมโรคเหี่ยวในสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกขิง มีเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรคร้อยละ 60 โดยมีปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* 3.5×10^{5} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม และมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เหลืออยู่เพียง 5.6×10^{3} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแสดงอาการของโรคเหี่ยว 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 7)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า การควบคุมโรคเหี่ยวของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 โดยการคลุกหัวพันธุ์ด้วย 1% ชีวภัณฑ์ชนิดผง และรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง ทุก 15 วัน 30 วัน และ 60 วัน พบในกรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์สูตรผงทุกรรมวิธีให้ผลการเกิดโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำเปล่าแทนชีวภัณฑ์ (Table 8) กรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 30 วัน ให้ผลการควบคุมโรคดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวร้อยละ 65 จากผลการทดลอง พบว่า การใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผงทุก 30 วันให้ผลการควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีกว่า การใช้ชีวภัณฑ์สูตรผง ทุก 15 วัน เนื่องมาจากจากหัวพันธุ์ขิงที่นำมาใช้ปลูกในแปลงที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ ทุก 15 วัน มีแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวติดมาด้วย โดยพบ บางแปลงทดลองย่อยพบการเกิดโรคเหี่ยวจำนวนมาก (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ทำให้เมื่อเฉลี่ยการเกิดโรคทั้ง 4 ซ้ำ ทำให้มีการเกิดโรคเหี่ยวในแปลงที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ผง ทุก 15 วันมากกว่า การใช้ทุก 30 วัน

8. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร

จากการตรวจหาปริมาณของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกก่อนการทดลอง พบปริมาณแบคทีเรีย *R. solacearum* 1.6×10^5 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ผลการทดสอบพบว่า แปลงที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผงพบการเกิดโรคร้อยละ 38 ได้ผลผลิต 2,260 กิโลกรัม/ไร่ ส่วนแปลงที่ไม่ได้ใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผงพบการเกิดโรคร้อยละ 79 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลผลิตเพียง 690 กิโลกรัม/ไร่ (Table 9; Figure 4)

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 พบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงร้อยละ 68 ในสภาพแปลงทดลอง และนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 โดยใช้ ผง talcum เป็นตัวพาในอัตรา 1:4 (V/W) ได้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. Subtilis* 1.1×10^{10} หน่วยโคโลนี/ ชีวภัณฑ์ 1 กรัม ชีวภัณฑ์สูตรผงนี้เก็บรักษาไว้ได้นาน 12 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อัตราและวิธีการใช้ชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง คือ การคลุกหัวพันธุ์ขิงด้วย 1% ชีวภัณฑ์สูตรผงและรดด้วยชีวภัณฑ์สูตรผงทุก 30 วัน สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ ร้อยละ 65 และเมื่อนำไปทดสอบในแปลงปลูกขิงของเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว ที่อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่า ชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ร้อยละ 62 ได้ผลผลิต 2,260 กิโลกรัม/ไร่ การพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 นี้ เป็นการพัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ และแพร่หลายสู่เกษตรกรทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ตรงตามความต้องการของตลาด เกษตรกรสามารถปลูกขิงซ้ำที่เดิมได้ เป็นการลด

ปัญหาการบุกรุกทำลายป่าเพื่อหาพื้นที่ ปัจจุบัน บริษัท ลัดดา จำกัด ได้มาขอรับการถ่ายทอดแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* BS-DOA 24 เพื่อต่อยอดในระดับอุตสาหกรรม ให้อยู่ในรูปที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้สะดวกและเก็บรักษาได้นาน ซึ่งเป็นจะการนำผลงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตรไปใช้ประโยชน์พัฒนาต่อยอดในเชิงพาณิชย์ และแพร่หลายสู่เกษตรกรในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. สถิติการส่งออก (Export) ขิงแห้งและขิงสด : ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php. 22 เมษายน 2555.

Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. Biological Control of Soil-Borne Pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 433 p.

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

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.

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

Table 1. List of Antagonistic *Bacillus subtilis* isolates used in this study

Isolate No.	Location	Source
1. BS-DOA 24	Kanchanaburi	Soil from tobacco roots
2. BS-DOA 69	Chiang Rai	Soil from Curcuma roots
3. BS-DOA 97	Chumphon	Soil from Ginger roots
4. BS-DOA 108	Chiang Rai	Soil from Ginger roots
5. BS-DOA 114	Nakhon Pathom	Soil from sugarcane roots
6. BS-DOA 123	Pathum Thani	Soil from canal in the vegetable field
7. BS-DOA 125	Pathum Thani	Soil from canal in the vegetable field
8. BS-DOA 132	Pathum Thani	Manure (cow dung)

Table 2. Size of inhibition zone created by 8 antagonistic *Bacillus subtilis* againt *Ralstonia solanacearum* under Laboratory condition

Antagonistic Bacteria	Inhibition zone (mm.)	
	R. solanacearum **No 28.**	***R. solanacearum*** **No.1378**
1. BS-DOA 24	3.6	4.8
2. BS-DOA 69	3.5	2.15
3. BS-DOA 97	3.1	3.75
4. BS-DOA 108	2.6	2.5
5. BS-DOA 114	4.1	2.5
6. BS-DOA 123	3.35	4.85
7. BS-DOA 125	4.8	1.8
8. BS-DOA 132	2.75	2.4

Table 3. Efficacy of antagonistic *Bacillus subtilis* in controlling bacterial wilt of ginger caused by *Ralstonia solanacearum* in greenhouse experiments

Antagonistic Bacteria	Disease severity (%) [1/]			Disease control (%) [2/]		
	15 days	30 days	45 days	15 days	30 days	45 days
1. BS-DOA 24	0	20	40	100	80	60
2. BS-DOA 69	100	100	100	0	0	0
3. BS-DOA 97	20	80	80	80	20	20
4. BS-DOA 108	100	100	100	0	0	0
5. BS-DOA 114	0	40	60	100	60	40
6. BS-DOA 123	0	20	40	100	80	60
7. BS-DOA 125	40	80	80	60	20	20
8. BS-DOA 132	100	100	100	0	0	0
9. control	100	100	100	0	0	0

Table 4. Population of antagonistic *Bacillus subtilis* and *Ralstonia solanacearum* in controlling bacterial wilt of ginger under greenhouse experiments for 15, 30 and 45 days

Antagonistic bacteria	Population of antagonistic *Bacillus subtilis* (CFU / soil 1g)			Population of antagonistic *Ralstonia solanacearum* (CFU / soil 1g)		
	15 days	30 days	45 days	15 days	30 days	45 days
1. BS-DOA 24	2.97×10^4	2.6×10^4	1.75×10^5	1.485×10^5	2.7×10^4	2.75×10^4
2. BS-DOA 69	7.2×10^5	7.45×10^4	6.75×10^3	7.65×10^4	9.0×10^5	6.7×10^5
3. BS-DOA 97	6.4×10^3	4.4×10^3	6.6×10^3	1.35×10^5	9.0×10^5	1.16×10^6
4. BS-DOA 108	6.84×10^5	7.4×10^4	2.7×10^3	1.035×10^5	2.5×10^6	1.05×10^6
5. BS-DOA 114	1.53×10^4	1.25×10^4	9.3×10^4	1.26×10^5	6.75×10^4	9.9×10^5
6. BS-DOA 123	9.9×10^4	$2.1x\ 10^5$	1.5×10^5	1.225×10^5	1.485×10^5	5.6×10^4
7. BS-DOA 125	4.5×10^5	1.75×10^4	1.25×10^3	1.53×10^5	1.935×10^5	9.6×10^5
8. BS-DOA 132	4.5×10^4	$3.4x\ 10^4$	9.2×10^4	2.79×10^5	2.835×10^5	7.8×10^5

Table 5. Efficacy of antagonistic *Bacillus subtilis* in controlling bacterial wilt of ginger in the field trial

Antagonistic bacteria	Disease severity (%)	Disease control (%)	Yield (kg./rai)
1. BS-DOA 24	32 c[1/]	68	4,288.03 a
2. BS-DOA 123	60 b	40	1,260.18 b
3. BS-DOA 69	69 b	31	968.49 b
4. control	86 a	0	287.44 b
CV.	26 %		26 %

1/ Mean in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 6. Populations *of Bacillus subtilis* that survive in bioproduct stored at various temperatures and time

Month	Populations *of Bacillus subtilis* (colony/ml)		Month	Populations *of Bacillus subtilis* (colony/ml)	
	Room temperature	4^oC		Room temperature	4^oC
0 [1/]	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}	8	1.7×10^7	9.0×10^9
1	0.7×10^{10}	1.3×10^{10}	9	2.2×10^5	8.0×10^9
2	0.2×10^{10}	1.9×10^{10}	10	1.3×10^4	8.6×10^9
3	5.3×10^9	1.5×10^{10}	11	3.2×10^3	8.3×10^9
4	2.8×10^9	1.5×10^{10}	12	1.0×10^2	3.0×10^8
5	3.3×10^9	1.7×10^{10}	13	-	2.5×10^8
6	1.2×10^8	0.3×10^{10}	14	-	1.5×10^8
7	0.9×10^8	0.9×10^{10}	15	-	4.3×10^7

[1/] Initial bacterial population

Table 7. Efficacy of the bioproduct powder of *Bacillus subtislis*, BS-DOA 24, in controlling bacterial wilt of ginger in greenhouse experiments

weeks	bioproduct powder			Sterilized distilled water	
	Disease control (%)	Bacterial Population (CFU* / soil 1 g)[2/]		Disease control (%)	Bacterial Population (CFU* / soil 1 g)[2/]
		Ralstonia solanacearum	*Bacillus subtislis*		*Ralstonia solanacearum*
1	100[1/]	3.6×10^6	2.97×10^4	100	3.6×10^6
2	100	1.2×10^5	2.7×10^4	100	4.9×10^6
3	90	1.4×10^5	2.6×10^4	80	1.2×10^7
4	80	8.9×10^4	8.7×10^4	40	7.2×10^7
5	70	5.6×10^4	1.75×10^5	0	9.6×10^6
6	60	2.3×10^4	2.5×10^5	0	4.7×10^5
7	60	5.6×10^3	3.5×10^5	0	2.6×10^4

Table 8. Efficacy of the bioproduct powder of *Bacillus subtislis*, BS-DOA 24, in controlling bacterial wilt of ginger in the field trial

Treatment	Disease severity (%)	Disease control (%)
1. Mix ginger rhizome with 1% of bioproduct + 10 g/20 liter of bioproduct every 15 days	38 b[1/]	62
2. Mix ginger rhizome with 1% of bioproduct + 10 g/20 liter of bioproduct every 30 days	35 b	65
3. Mix ginger rhizome with 1% of bioproduct + 10 g/20 liter of bioproduct every 60 days	37 b	63
4. control	60 a	0
CV.	2.17 %	-

1/ Mean in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 9. The efficacy of bioproduct powder of *Bacillus subtilis,* BS-DOA 24, in controlling bacterial wilt of ginger in a farmer's field

Treatment	Disease severity (%)	Yield (kg / rai)
1. bioproduct powder BS-DOA 24	38	2,260
2. Control	79	690

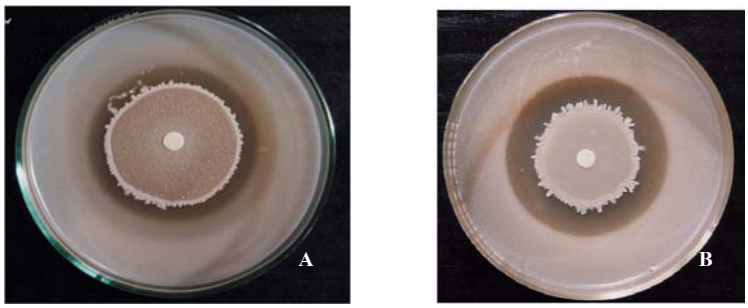

Figure 1. Inhibition zone of 2 antagonistic *Bacillus subtilis* BS-DOA 123 (A) and BS-DOA 24 (B) againt *Ralstonia solanacearum* were tested under laboratory condition

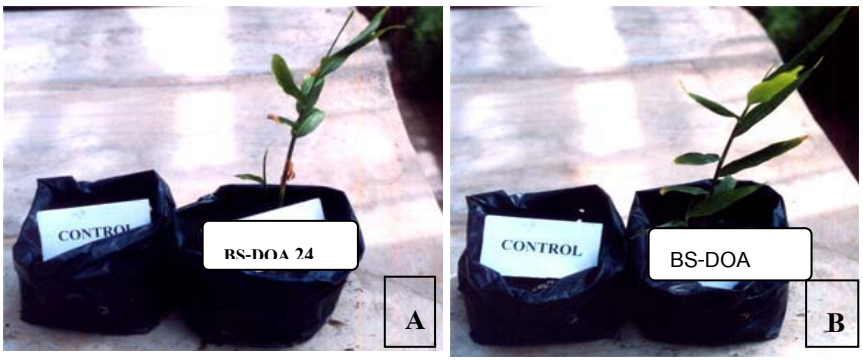

Figure 2. Efficacy of antagonistic *Bacillus subtilis in* controlling bacterial wilt of ginger in greenhouse experiments. BS-DOA 24 (A) and BS-DOA 123 (B)

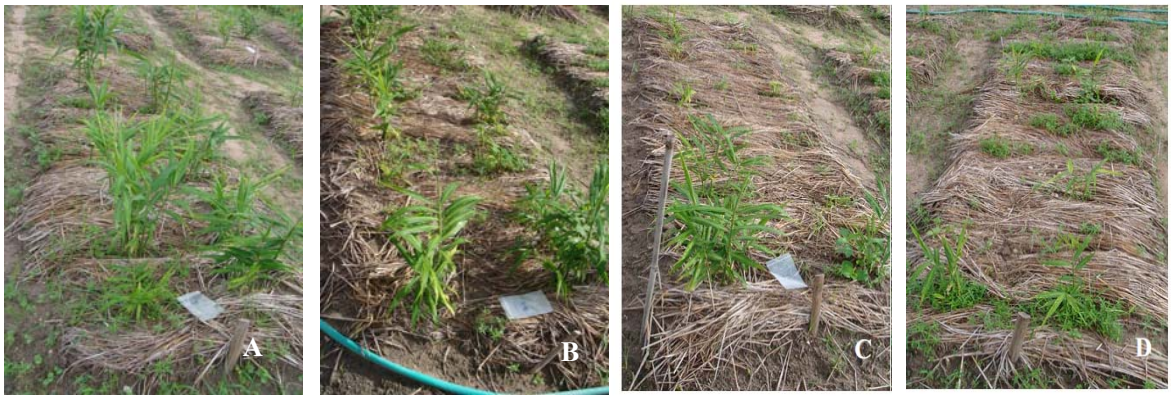

Figure 3. Efficacy of antagonistic *Bacillus subtilis* in controlling bacterial wilt of ginger in the field trial. (A) BS-DOA 24; (B) BS-DOA 123; (C) BS-DOA 69; (D) Control

Figure 4. The efficacy of bioproduct powder of *Bacillus subtilis* BS-DOA 24 in controlling bacterial wilt of ginger in a farmer's field.

(A) use the bioproduct powder BS-DOA 24 (B) Control