

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุมโรค  
เหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง

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

บุรณี พัวพงษ์แพทย์ ณิชฎิมา โฆษิตเจริญกุล  
ทิพวรรณ กันหาญาติ รุ่งนภา ทองเคิ่ง  
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของ  
มันฝรั่ง โดยการนำแบคทีเรียปฏิบัคษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 มาพัฒนาเป็นสูตรผงสำเร็จ  
อย่างง่าย ทำการเพิ่มปริมาณบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) และนำมาผสมกับสารละลาย  
magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และ  
สารตัวพวงแป้งทัลคัม (Talcum) ในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ได้ผลิตภัณฑ์แบบผงที่มี  
ปริมาณเชื้อ *B. subtilis*  $4.3 \times 10^{10}$  หน่วยโคโลนี/กรัม สูตรผงสำเร็จนี้เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือนที่  
อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) และสามารถเก็บได้นาน 15 เดือนในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส)  
เมื่อทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* แบบผงในระดับเรือนปลูกทดลองที่ศูนย์วิจัยเกษตรจังหวัด  
เชียงใหม่ อำเภอดอยหล่อ พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สามารถควบคุมโรคได้ 60%

คำนำ

แบคทีเรีย *R. solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช  
ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยวที่ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ตั้งแต่พืช  
เศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิดในวงศ์ *Solanaceae* (Hayward, 1964) ความรุนแรงของ  
โรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่แบคทีเรียเข้าทำลาย สภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย  
ในประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียสาเหตุโรคนี โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจของ  
ประเทศ ได้แก่ มันฝรั่ง ฝรั่ง ปทุมมา เป็นต้น

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-01-54

การป้องกันกำจัดโรคนี้อาจทำได้ยากเนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรคนี้อาศัยอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเกษตรกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง และเป็นที่ยอมรับอย่างมาก การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้อง และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมสาเหตุโรคพืชทั้งราและแบคทีเรีย จนกระทั่งผลิตรูปแบบผลิตภัณฑ์ 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 Gotlieb (1952) ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* B<sub>3</sub> 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) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่ใช้ในการป้องกันกำจัดแบบชีววิธี ได้แก่ *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 กระจกดินเผา ปุ๋ย สารกำจัดแมลง สารป้องกันกำจัดโรคพืช และหัวพันธุ์มันฝรั่ง

#### วิธีการ

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

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

การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่าย เลี้ยงแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ *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 จึงผสมกับสารตัวพองแห้งทัลคัม (Talcum) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผสมให้เข้ากันดีก่อนนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดให้เป็นผงละเอียดแล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติกก่อนนำไปศึกษาต่อไป (Xu and Gross, 1986)

การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จที่ผลิตได้ นำผงสำเร็จของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ *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 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

นำผงสำเร็จของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ *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 เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมเซลล์แบคทีเรียในน้ำกลั่นให้เป็นสารละลายแบคทีเรีย 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* และใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อรดทุก 7 วัน

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

## เวลาและสถานที่

### ระยะเวลา

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2558

### สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา 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 ผึ่งให้แห้งสนิทในตู้อบเชื้อ 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)

**ตาราง 1** ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (หน่วยโคโลนี/กรัม)	
	อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส)	ตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส)
0 <sup>1/</sup>	$4.3 \times 10^{10}$	$4.3 \times 10^{10}$
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<sup>1/</sup> ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น

## 2. การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง

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

ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง

สัปดาห์ ที่	ผงสำเร็จแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>		น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ		
	เปอร์เซ็นต์ <sup>1/</sup> การควบคุม โรคเหี่ยว	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU*/ดิน 1 กรัม) <sup>2/</sup>		เปอร์เซ็นต์ การ ควบคุม โรคเหี่ยว	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU*/ดิน 1 กรัม) <sup>2/</sup> <i>R. solanacearum</i>
		<i>R.</i> <i>solanacearum</i>	<i>B.</i> <i>subtilis</i>		
1	100 <sup>1/</sup>	$4.6 \times 10^6$	$3.9 \times 10^4$	100	$3.2 \times 10^6$
2	100	$3.2 \times 10^5$	$3.7 \times 10^4$	100	$4.6 \times 10^6$
3	90	$1.4 \times 10^5$	$2.6 \times 10^4$	80	$2.2 \times 10^7$
4	80	$5.9 \times 10^4$	$5.7 \times 10^4$	40	$5.2 \times 10^7$
5	70	$3.6 \times 10^4$	$2.5 \times 10^5$	0	$6.6 \times 10^6$
6	60	$2.3 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5$	0	$8.6 \times 10^5$
7	60	$5.6 \times 10^3$	$3.5 \times 10^5$	0	$7.7 \times 10^5$

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

$$^{2/} \text{CFU} = \text{หน่วยโคโลนี}$$

## สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

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

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

## เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภาณุอำไพ, ณัฐธิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ และ ปิยรัตน์ ธรรม กิจวัฒน์. 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมัน ฝรั่ง 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. Gottlieb. 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 2<sup>nd</sup> 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 Bacteria. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> 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. *Phytopathology* 76: 423-430.