การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

Development Bioproduct from *Bacillus subtilis* BS-DOA 24 strain for Controlling Bacterial Wilt of Ginger (*Ralstonia solanacearum*)

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1/]

ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/] รุ่งนภา ทองเครง[1/]

Nuttima Kositcharoenkul[1/] Buranee Puawongphat[1/]

Tippawan Kanhayart[1/] Rungnapha Thong kreng[1/]

ABSTRACT

A collection of 135 isolates of *Bacillus subtilis* was obtained from soil, manure and roots of chili, tobacco, banana, Siam tulip, potato and tomato across 9 provinces of Thailand. All isolates were laboratory tested for inhibiting growth of *Ralstonia solanacearum*. Eight isolates of *B. subtilis* viz. BS-DOA 24, BS-DOA 69, BS-DOA 97, BS-DOA 108, BS-DOA 114, BS-DOA 125 and BS-DOA 132 were found as effective antagonist of *R. solanacearum*. Afterward, the effectiveness of these 8 isolates was verified in the greenhouse experiment. Ginger rhizomes were soaked into solutions with 8 different isolates of *B. subtilis* before being planted in soil mixed with *R. solanacearum*. The results showed that only isolates of BS-DOA 24 and BS-DOA 123 could control the bacterial wilt in ginger for 60%. The BS-DOA 24 and BS-DOA 123 isolates were selected for the field experiment. Isolate of BS-DOA 24 suppressed the said disease in ginger for 68%. Thus, the BS-DOA 24 isolate of *B. subtilis* was selected to develop for *R. solanacearum* antagonist powder. The appropriate ratio of BS-DOA 24 bacteria per talcum was 1 : 4 (v/w) which induced the highest population of BS-DOA 24 to 1.1 x 10^{10} CFU/g. After storing at ambient air (ca.30 °C) for 12 months and at 4 °C for 15 months, this antagonist powder

[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ 10900

[1/] Plant Pathology Research group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 10900

showed the efficiency to control the bacterial wilt of ginger in greenhouse and wilt infested field up to 60 and 65%, respectively. The experiment was further carried out at the farmer's field at Phetchabun Province, where the BS-DOA *B. subtilis* could control the disease of bacterial wilt for 62% with yield of 2,260 kg/rai (ca. 361.6 kg/ ha). The results suggest that antagonist powder based on BS-DOA 24 *B. subtilis* could be a potential source to control the bacterial wilt disease and for further commercial development.

Key-Words: *Bacillus subtilis*, antagonistic, *Ralstonia solanacearum*, bio product, ginger

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จำนวน 135 ไอโซเลท แยกจากตัวอย่างดิน รากพืช และปุ๋ยคอกที่เก็บมาจาก 9 จังหวัด นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของขิง ในห้องปฏิบัติการ สามารถคัดเลือกได้แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 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 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้ 60% และนำแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 ไปทดสอบต่อในสภาพแปลงทดลอง พบว่า *B. subtilis* BS-DOA 24 สามารถควบคุมโรคได้ 68% จากนั้นนำแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 ไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงสำเร็จ โดยใช้ ผง talcum เป็นสารพาในอัตรา 1:4 (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1.1×10^{10} CFU/g ชีวภัณฑ์นี้สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือนที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในเรือนทดลองได้ 60% และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลองที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวของขิงได้ 62-65% จากนั้นนำชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร ที่จังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่ามีประสิทธิภาพ ในการควบคุมโรคในแปลงเกษตรกร 62% และได้ผลผลิต 2,260 กก./ไร่ ผลจากการวิจัยนี้สามารถนำชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 ที่ได้ไปพัฒนาเป็นต้นแบบเพื่อขยายผลสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

คำหลัก: ขิง แบคทีเรียปฏิปักษ์ โรคเหี่ยวของขิง *Bacillus subtilis* ชีวภัณฑ์

คำนำ

ขิง (*Zingiber officinalis* Rosc.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีที่มีศักยภาพในการส่งออก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เป็นทั้งอาหาร เครื่องดื่ม ยารักษาโรค และเครื่องสำอาง ทำให้เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ แหล่งเพาะปลูกขิงที่สำคัญของประเทศไทยอยู่ในภาคเหนือเขต จ.เชียงราย พะเยา เลย เพชรบูรณ์ และบางจังหวัดในภาคใต้ ได้แก่ จ.ประจวบคีรีขันธ์ และชุมพร นอกจากการจำหน่ายในประเทศทั้งแบบสด และแปรรูปแล้ว ยังมีการส่งออกไปยังต่างประเทศในรูปขิงแห้ง และขิงสด ในปี พ.ศ. 2554 มีปริมาณการส่งออก 39,137 ตัน มูลค่า 865.7 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) อย่างไรก็ตามการปลูกขิงในประเทศไทยไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากปัญหาและอุปสรรคหลายประการ ที่สำคัญคือเรื่องของผลผลิตเสียหายเนื่องจากการเขาทำลายของโรคพืช โดยเฉพาะโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ทำให้ขิงมีผลผลิตต่ำและคุณภาพไม่ตรงตามความต้องการของตลาด เกษตรกรสูญเสียรายได้ นอกจากนี้เกษตรกรยังไม่สามารถปลูกขิงซ้ำที่เดิมได้เพราะจะเกิดโรคระบาดรุนแรงในปีถัดไป จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนที่ปลูกทุกปีทำให้มีการบุกรุกทำลายป่าเพื่อหาพื้นที่ปลูกขิงใหม่

โดยทั่วไปการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของขิง มีการใช้พันธุ์ต้านทาน ใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช การเขตกรรม และการใช้ชีววิธี ซึ่งพบว่าการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชเพื่อช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้อง และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ ในปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุม รา และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคพืชหลายชนิด มีการนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ จำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เช่น รา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นต้น (นิพนธ์, 2546; จิระเดช, 2549; Chamswarng *et al.* 2012) แบคทีเรีย *B. subtilis* มีความสามารถในการสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (Baker and Cook, 1974) มีรายงาน การใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* (Celino and Gotllieb, 1952; Aspiras and de la Cruz, 1985; Karuna *et al.*, 1997; Sanaina *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2002) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ใช้ง่าย สะดวก และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูก สามารถถ่ายทอดให้กับเกษตรกรเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตขิง และเป็นต้นแบบในการขยายผลการผลิตสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากดิน ปุ๋ยคอก และรากพืชต่าง ๆ

1.1 เก็บตัวอย่างรากพืช ดิน และปุ๋ยคอก: เก็บตัวอย่างพืชที่ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวในแปลงปลูกพืชที่มีโรคเหี่ยวระบาดโดยเก็บรากของพริก ยาสูบ กล้วย ปทุมมา มันฝรั่ง มะเขือเทศ จาก จ.เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง กาญจนบุรี ปทุมธานี นนทบุรี ชุมพร และนครปฐม จำนวน 20 ตัวอย่าง และเก็บดินบริเวณรอบราก จำนวน 20 ตัวอย่าง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างปุ๋ยคอกจากแปลงปลูกพืช จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง

1.2 การแยกแบคทีเรียจากดิน และปุ๋ยคอก: นำตัวอย่างดิน และปุ๋ยคอกมาผึ่งลมให้แห้งพอหมาด ๆ นำมาแยกแบคทีเรียโดยวิธี serial dilution plate method จากนั้นนำสารละลายดินหรือปุ๋ยที่ระดับความเจือจาง 10^{-5}-10^{-7} ปริมาตร 0.1 มล. มาหยดบนอาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA) แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. เก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญเติบโต คัดเลือกเฉพาะ แบคทีเรีย *B. subtilis* โดยทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี ตามวิธีการของ Holt *et al.* (1994)

1.3 การแยกแบคทีเรียจากรากพืช: นำตัวอย่างรากพืชมาล้างให้สะอาด ชั่งรากพืชปริมาณ 1 ก. นำมาบดให้ละเอียดในโกร่งนึ่งฆ่าเชื้อ เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน แช่ไว้นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เจือจางโดยวิธี serial dilution จากนั้นนำสารแขวนลอยตัวอย่างรากพืชปริมาตร 0.1 มล. หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ทำการทดสอบและคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* เช่นเดียวกับข้อ 1.2

2. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย *R. solanacearum*: นำแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวที่แยกได้จากขิง จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ No.28 และ No.1378 จาก จ.เชียงราย และเพชรบูรณ์ มาเลี้ยงบนอาหารเอียง Wakimoto's semisynthetic potato agar (PSA) บ่มเชื้อไว้ 48 ชม. แล้วทำสารแขวนลอยแบคทีเรียโดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มล. ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทำ double layer โดยเติมสารแขวนลอยแบคทีเรีย 0.25 มล. ลงในอาหาร PSA ปริมาตร 7 มล. ในหลอดทดลอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ ผสมให้เข้ากัน นำไปเททับลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PSA เทอยู่แล้วปริมาตร 15 มล. เอียงจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ส่วนบนกระจายคลุมทั่วผิวหน้าชั้นล่าง เมื่ออาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น 4 °ซ นาน 1 ชม. โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อลง

2.2 การเตรียมแบคทีเรีย *B. subtilis* สำหรับทดสอบ: นำ แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่แยกได้จากพืช ดิน และปุ๋ยคอก มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB)

ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง (Optical Density) 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียจะมีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 CFU/ml สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum*: ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี disc diffusion method โดยหยดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เตรียมไว้แล้ว (ข้อ 2.2) แต่ละไอโซเลท ปริมาตร 10 μl ลงบนกระดาษแผ่นกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. แล้วนำมาวางบนผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้(ข้อ 2.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวัดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของแบคทีเรีย *B. subtilis* ถึงขอบบริเวณใส ทำการทดสอบไอโซเลทละ 3 ซ้ำ

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนทดลอง

3.1 เตรียมดินปลูกขิงที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum*: นำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.28 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 CFU/ml ผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ในปริมาตร 100 มล./ดิน 8 กก. ผสมคลุกให้เข้ากัน ตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี serial dilution plates อีกครั้งก่อนนำดินที่ผสมเชื้อแล้วใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 0.8 กก./กระถาง เตรียมดินปลูกขิงจำนวน 90 กระถาง

3.2 การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ มาทำเป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียมีความเข้มข้น 1.0×10^8 CFU/ml เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนพืชทดลอง

3.3 ทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Complete by Randomize Design (CRD) ประกอบด้วย 9 กรรมวิธี 10 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น 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 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม)

นำหัวพันธุ์ขิงแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีที่เตรียมในข้อ 3.2 นาน 30 นาที ผึ่งให้แห้ง ก่อนปลูกในดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้

(ข้อ 3.1) กรรมวิธีละ 10 กระถาง ๆ ละ 1 หัว หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีรดในกระถาง ปริมาตร 50 มล. ต่อต้นทุก ๆ 7 วัน

บันทึกต้นขิงที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวและตรวจนับประชากร แบคทีเรียปฏิปักษ์ และแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทุก 15 30 และ 45 วันหลังปลูกขิง

4. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง

4.1 เตรียมแปลงทดลอง: ทำการทดลองที่ ศูนย์วิจัยพืชสวน จ.ลำปาง เตรียมแปลงทดลองเพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้สม่ำเสมอ โดยปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดา เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* No. 28 ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml โดยวิธี clipping method หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือน ต้นมะเขือเทศแสดงอาการของโรคเหี่ยว ทำการสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียด และปล่อยให้ย่อยสลายในแปลงทดสอบประมาณ 1 เดือน เตรียมแปลงทดลองขนาด 8.0 x 1.5 ม. จำนวน 20 แปลง

4.2 การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์: คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเหี่ยว ในเรือนทดลอง และแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพต่ำเพื่อใช้เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ นำมาทำเป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ความเข้มข้นประมาณ 1.0 x 10^8 CFU/ml เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง

4.3 ทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) มี 4 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 20 หัว ดังนี้

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

นำหัวพันธุ์ขิงมาแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีที่เตรียมไว้ นาน 30 นาที ผึ่งให้แห้ง ปลูกหัวพันธุ์ขิงโดยใช้ 20 หัว/แปลง หลังปลูกขิงรดด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีให้ทั่วทั้งแปลง ปริมาตร 1 ล./แปลง ทำการรดแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุก ๆ 15 วัน จำนวน 14 ครั้ง เป็นเวลา 7 เดือน

บันทึกผลการทดลอง: บันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวและตาย ตรวจนับประชากร แบคทีเรียปฏิปักษ์ และแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแต่ละกรรมวิธี เดือนละครั้ง บันทึกน้ำหนัก และปริมาณของผลผลิตที่ได้ในเดือนที่ 8

5. การพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรผงแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

5.1 การเตรียมชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24: เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*

BS-DOA 24 บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เป็นเวลา 36 ชม. เติมสารละลาย 0.1M magnesium sulfate ปริมาตร 10 มล./จานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียบนผิวอาหารให้ผสมในสารละลายจากนั้นนำไปผสมกับ carboxy methylcellulose 2.5% ในน้ำ ในปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที จึงผสมกับสารพาคือผงทัลคัม ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตราสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. subtilis* 100 มล./ผงทัลคัม 400 ก. ตามวิธีของ Xu and Gross (1986) ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่มบดให้เป็นผงละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 35 mesh เก็บไว้ในถุงพลาสติกก่อนนำไปศึกษาต่อไป

5.2 ตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ชนิดผงที่ผลิต: นำชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 1 ก. มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี serial dilution plate method บนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับโคโลนีแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ชนิดผงที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ: นำชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ที่ผลิตได้จำนวน 2 กก. แบ่งใส่ถุงพลาสติก PE ขนาด 8 x12 นิ้ว โดยแบ่งเป็น 2 ถุง ๆ ละ 1 กก. ถุงหนึ่งเก็บรักษาไว้บนชั้นวางของในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิ 27-30 °ซ อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาไว้บนชั้นวางของในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-6 °ซ สุ่มตัวอย่างประมาณ 10 ก. มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ชนิดผงตามข้อ 5.2 โดยตรวจนับทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน

6. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

6.1 เตรียมดินผสมแบคทีเรีย *R. solanacearum*: นำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.28 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0 x 10^8 CFU/ml นำไปผสมคลุกเคล้ากับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตรา 1:10 (ปริมาตร:น้ำหนัก) นำดินที่ผสมแบคทีเรียไปตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี serial dilution plate method ก่อนนำดินไปบรรจุในกระถางเพื่อเตรียมไว้ปลูกพืชทดสอบ

6.2 ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24: นำหัวพันธุ์ขิงมาคลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้(ข้อ 6.1) ละลายชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 อัตรา 10 ก./น้ำ 20 ล. (มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย 1x10^9 CFU/ml) นำมารดในกระถางปลูกขิงทุก 7 วัน สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงที่ไม่ได้คลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อรดทุก 7 วัน

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

7. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง

7.1 การเตรียมแปลงทดลอง: เตรียมแปลงทดลองที่ ศูนย์วิจัยพืชสวนลำปาง จ. ลำปาง โดยทำการเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่ำเสมอ เช่นเดียวกับข้อ 4.1 จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด 8.0 x 1.5 ม. จำนวน 20 แปลง

7.2 ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง: วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ๆ ละ 20 หัว รายเอียดกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 10 ก./น้ำ 20 ล. ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 10 ก./น้ำ 20 ล. ทุก 60 วัน

กรรมวิธีที่ 3 กรรมวิธีควบคุม หัวพันธุ์ขิงไม่คลุกชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อทุก 30 วัน

นำหัวพันธุ์ขิงไปคลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ตามกรรมวิธี 1-2 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก แล้วนำไปปลูกในแปลงทดลองตามแผนการทดลอง บันทึกจำนวนต้นขิงที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน เป็นเวลา 8 เดือน

8. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร

ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในแปลงปลูกขิงของเกษตรกร อำเภอเขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ ขนาด 800 ตร.ม (0.5 ไร่) โดยเลือกแปลงปลูกขิงที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว ทำการตรวจหาปริมาณของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกก่อนการทดลอง แบ่งแปลงทดลองเป็น 2 แปลงย่อย ขนาดแปลงละ 400 ตร.ม. คือ

แปลงที่ 1 ทำการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง ด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 โดยนำหัวพันธุ์ขิงพันธุ์หยวก คลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 จำนวน 10 ก./น้ำ 20 ล. ทุก 30 วัน เป็นเวลา 8 เดือน

แปลงที่ 2 แปลงเปรียบเทียบ ปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงพันธุ์หยวก ที่ไม่ได้คลุกด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงและใช้น้ำเปล่ารดพืชแทนการรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง

การบันทึกข้อมูล: บันทึกจำนวนต้นขิงที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน ชั่งน้ำหนักของผลผลิตที่ได้ในเดือนที่ 8

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* จากดิน รากพืช และปุ๋ยคอก

ผลการแยกแบคทีเรียจาก ดิน รากพืช และปุ๋ยคอก จำนวน 50 ตัวอย่าง แล้วนำมาคัดเลือกหาแบคทีเรีย *B. subtilis* ตามวิธีการของ Holt *et al.* (1994) สามารถคัดเลือก แบคทีเรีย *B. subtilis* ได้จำนวน 135 ไอโซเลท เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน glycerol 20% ที่ -20 °ซ เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

คัดเลือกได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *R. solanacearum* ได้จำนวน 8 ไอโซเลท จาก 135 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24, BS-DOA 69, BS-DOA 97, BS-DOA 108, BS-DOA 114, BS-DOA 123, BS-DOA 125 และBS-DOA 132 พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้มากที่สุดโดยมีความกว้างของบริเวณใสขนาด 3.36-4.85 มล.แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลท มีการผลิตสารปฏิชีวนะออกมาจำนวนมาก (Figure 1 and Table 1)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนทดลอง

ผลการทดลองพบว่าต้นขิงที่รดด้วยสารแขวนลอย แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้ดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้

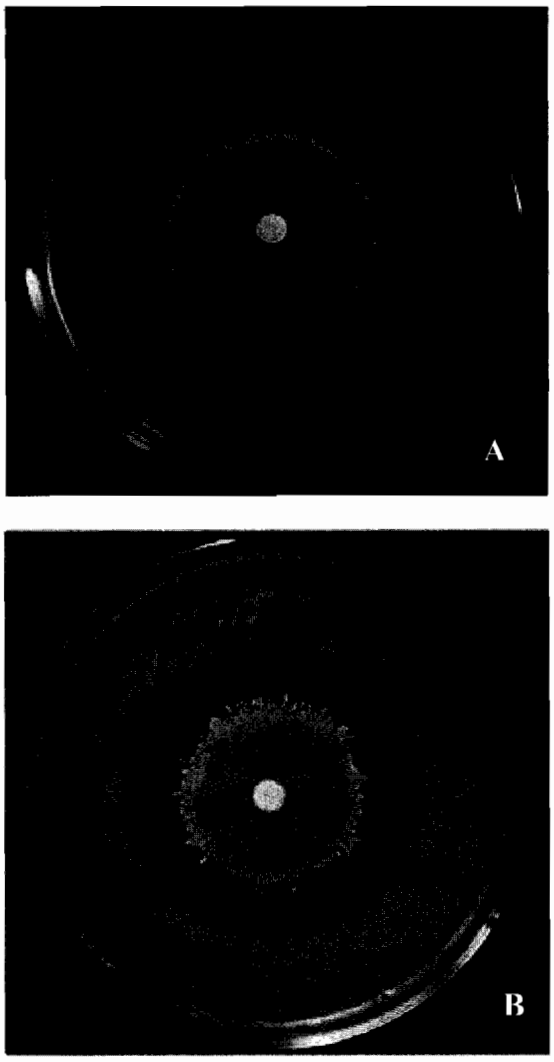

Figure 1 Inhibition zone of 2 antagonistic *Bacillus subtilis* BS-DOA 123 (A) and BS-DOA 24 (B) againt *Ralstonia solanacearum* were tested under laboratory condition

Table 1 Size of inhibition zone created by 8 antagonistic *Bacillus subtilis* againt *Ralstonia solanacearum* under laboratory condition

Antagonistic Bacteria	Location	Source	Inhibition zone (mm.)*	
			R. solanacearum No 28.	*R. solanacearum* No.1378
1. BS-DOA 24	Kanchanaburi	Soil from tobacco roots	3.6	4.8
2. BS-DOA 69	Chiang Rai	Soil from Curcuma roots	3.5	2.15
3. BS-DOA 97	Chumphon	Soil from Ginger roots	3.1	3.75
4. BS-DOA 108	Chiang Rai	Soil from Ginger roots	2.6	2.5
5. BS-DOA 114	Nakhon Pathom	Soil from sugarcane roots	4.1	2.5
6. BS-DOA 123	Pathum Thani	Soil from canal in the vegetable field	3.35	4.85
7. BS-DOA 125	Pathum Thani	Soil from canal in the vegetable field	4.8	1.8
8. BS-DOA 132	Pathum Thani	Manure (cow dung)	2.75	2.4

* average of 3 replications

60 % หลังปลูก 45 วัน ในขณะที่ต้นขิงที่รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียวแสดงอาการของโรค 100% ตั้งแต่ 15 วันหลังปลูก (Figure 2 and Table 2)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าสอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวมากที่สุดจะมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นเป็น 1.5 x 10^5 และ 1.75 x 10^5 CFU/g ของดิน ตามลำดับ (Table 3) ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 ลดลง โดยมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* 2.75 x 10^4 และ 5.6 x 10^4 CFU/g ของดิน ตามลำดับ (Table 3) จากผลทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 สามารถอยู่ในดินปลูกขิงได้นาน

Table 2 Efficacy of eight antagonistic *Bacillus subtilis* in controlling bacterial wilt of ginger caused by *Ralstonia solanacearum* in greenhouse experiments

Antagonistic Bacteria	infected plants (%) 1/			Disease control (%) 2/		
	15 days	30 days	45 days	15 days	30 days	45 days
1. BS-DOA 24	0	20	40 a	100	80	60
2. BS-DOA 69	100	100	100 d	0	0	0
3. BS-DOA 97	20	80	80 c	80	20	20
4. BS-DOA 108	100	100	100 d	0	0	0
5. BS-DOA 114	0	40	60 b	100	60	40
6. BS-DOA 123	0	20	40 a	100	80	60
7. BS-DOA 125	40	80	80 c	60	20	20
8. BS-DOA 132	100	100	100 d	0	0	0
9. control	100	100	100 d	0	0	0
CV.			**19.7%**			

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

1/ infected plants (%) $= \frac{\text{No. of infected plants}}{\text{Total no. of plant assessed}} \times 100$

2/ Disease control (%) $= \frac{\text{No. of non infected plants}}{\text{Total no. of plant assessed}} \times 100$

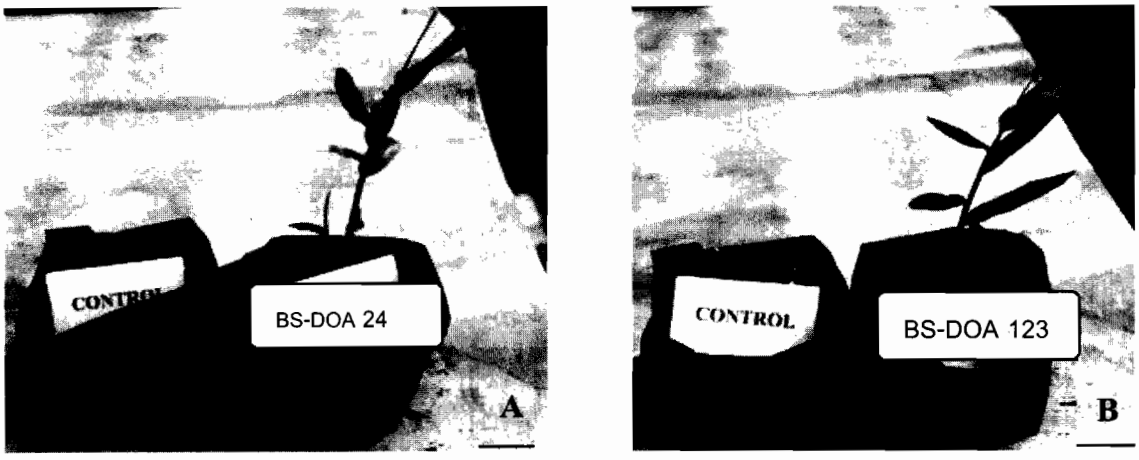

Figure 2 Efficacy of antagonistic *Bacillus subtilis* in controlling bacterial wilt of ginger in greenhouse experiments. BS-DOA 24 (A) and BS-DOA 123 (B)

Table 3 Population of antagonistic *Bacillus subtilis* and *Ralstonia solanacearum* in controlling bacterial wilt of ginger under greenhouse experiments at 15, 30 and 45 days after planting

Antagonistic bacteria	Population of antagonistic *Bacillus subtilis* (CFU / soil 1g)			Population of *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	2.1×10^5	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	3.4×10^4	9.2×10^4	2.79×10^5	2.835×10^5	7.8×10^5
9. control	-	-	-	3.45×10^5	1.67×10^6	2.58×10^6

ถึง 45 วัน จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับที่ Baker และ Cook (1974) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ (endospore) ซึ่งมีความทนทานและมีความอยู่รอดสูงแม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

4. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง ในสภาพแปลงทดลอง

ผลการทดสอบพบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* BS-DOA 24 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และการควบคุมโรคแตกต่างกับกรรมวิธีอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์ต้นขิงที่เกิดโรคเหี่ยวเพียง 32% มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยว 68% และให้ผลผลิตสูงถึง 4,288.03 กก./ไร่ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 86% มีน้ำหนักผลผลิตเพียง 287.44 กก./ไร่ เท่านั้น (Table 4) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sanaina *et al.* (1997) ที่คัดเลือกแบคทีเรีย *B. cereus, B. subtilis* จากบริเวณรากของต้นมันฝรั่ง มาใช้เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ ถึง 83% ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 160% เช่นเดียวกับ Guo *et al.* (2002) ได้รายงานการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BH11 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ 30% ในสภาพเรือน

Table 4 Efficacy of antagonistic *Bacillus subtilis* in controlling bacterial wilt of ginger under field trial

Antagonistic bacteria	infected plants (%)	Disease control (%)	Yield (kg./rai)
2. BS-DOA 24	32 a	68	4,288.03 a
1. BS-DOA 123	60 b	40	1,260.18 b
3. BS-DOA 69	69 b	31	968.49 b
9. control	86 c	0.00	287.44 b
CV.	26 %		26 %

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

ปลูกพืชทดลอง ทำให้โรคลดลง 65% ผลผลิตเพิ่มขึ้น 80-100% ในสภาพแปลง

จากการทดลองพบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการทดสอบนี้เป็นการใช้ในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียทำให้ไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ในสภาพแปลง และประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไม่คงที่ จะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรผงที่ใช้ได้สะดวก และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยคัดเลือก *B. Subtilis* ไอโซเลท BS-DOA 24 มาพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรผง

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

5.1 การเตรียมชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24: ได้ชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 ที่มีผงทัลคัมเป็นสารพา หลังจากผึ่งให้แห้งสนิทในตู้ปลอดเชื้อ นำไปตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์สูตรผง พบว่าประชากรแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์สูตรผง 1.1×10^{10} CFU/g

5.2 การเก็บรักษาชีวภัณฑ์สูตรผงที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ

ผลการทดลองพบว่า ชีวภัณฑ์สูตรผงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง แบคทีเรียมีชีวิตอยู่รอดได้นาน 12 เดือน แต่ประชากรแบคทีเรีย *B. subtilis* เริ่มลดลงในเดือนที่ 3 และลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เดือนที่ 8 จนถึงเดือนที่ 12 เหลือประชากรแบคทีเรียเพียง 1.0×10^2 CFU/g ในขณะที่ชีวภัณฑ์ สูตรผงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ แบคทีเรียยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ 15 เดือน โดยในเดือนที่ 15 มีประชากรแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด 4.3×10^7 CFU/g (Table 5)

Table 5 The survival populations of *Bacillus subtilis* in bioproduct powder BS-DOA 24 stored at room temperature and 4 °C at various times

Months	Populations of *Bacillus subtilis* (cfu/ml)		Months	Populations of *Bacillus subtilis* (cfu/ml)	
	Room temperature [2/]	4 °C		Room temperature	4 °C
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 [2/] Room temperature = 27-30 °C

6. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

พบว่าชีวภัณฑ์สูตรผงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวในสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกขิง สามารถการควบคุมโรคได้ 60% โดยตรวจพบประชากรของแบคทีเรีย *B. subtilis* 3.5×10^{5} CFU/g ของดิน และมีประชากรแบคทีเรีย *R. solanacearum* เหลืออยู่เพียง 5.6×10^{3} CFU/g ของดิน ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อขิงแสดงอาการของโรคเหี่ยว 100% (Table 6)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลอง

ผลการทดลอง การควบคุมโรคเหี่ยวด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 โดยการคลุกหัวพันธุ์ด้วย 1% ชีวภัณฑ์ และรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงละลายน้ำ ทุก 30 วัน และ 60 วัน พบว่าในกรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์สูตรผงทุกกรรมวิธีให้ผลการเกิดโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า (Table 7) กรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง 10 ก./น้ำ 20 ล. ทุก 30 วัน ให้ผลการควบคุมโรคดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้ 65 %

Table 6 Efficacy of the bioproduct powder BS-DOA 24 in controlling bacterial wilt of ginger under greenhouse experiments

Weeks	Disease control (%)	bioproduct powder		Disease control (%)	Sterilized distilled water
		Bacterial Population (CFU / soil 1 g)			Bacterial Population (CFU / soil 1 g)
		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

[1/] Disease control(%) = $\frac{\text{No. of non infected plants}}{\text{Total No. of plant assessed}} \times 100$

Table 7 Efficacy of the bioproduct powder BS-DOA 24, in controlling bacterial wilt of ginger under the field trial during 2011-2012.

Treatment	infected plants (%)	Disease control (%)
1. Mix ginger rhizome with 1% of bioproduct + 10 g/20 liter of bioproduct every 30 days	35 a	65
2. Mix ginger rhizome with 1% of bioproduct + 10 g/20 liter of bioproduct every 60 days	37 a	63
3. control	60 b	0
CV.	**2.17 %**	**-**

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

8. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร

จากการตรวจหาประชากรของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกก่อนการทดลอง พบประชากรแบคทีเรีย *R. solacearum* 1.6 x 10^5 CFU/g ของดิน ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ผงพบว่า แปลงที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ชนิดผง BS-DOA 24 พบการเกิดโรคเพียง 38% และได้ผลผลิต 2,260 กก./ไร่ ส่วนแปลงที่ไม่ได้ใช้ชีวภัณฑ์พบการเกิดโรคเหี่ยวสูงถึง 79% ผลผลิตเหลือเพียง 690 กก./ไร่ (Table 8 and Figure 3)

Table 8 The efficacy of bioproduct powder BS-DOA 24, in controlling bacterial wilt of ginger in a farmer's field during 2012-2013

Treatment	infected plants (%)	Disease control (%)	yield (kg / rai)
1. Bioproduct powder BS-DOA 24	38	62	2,260
2. Control	79	-	690

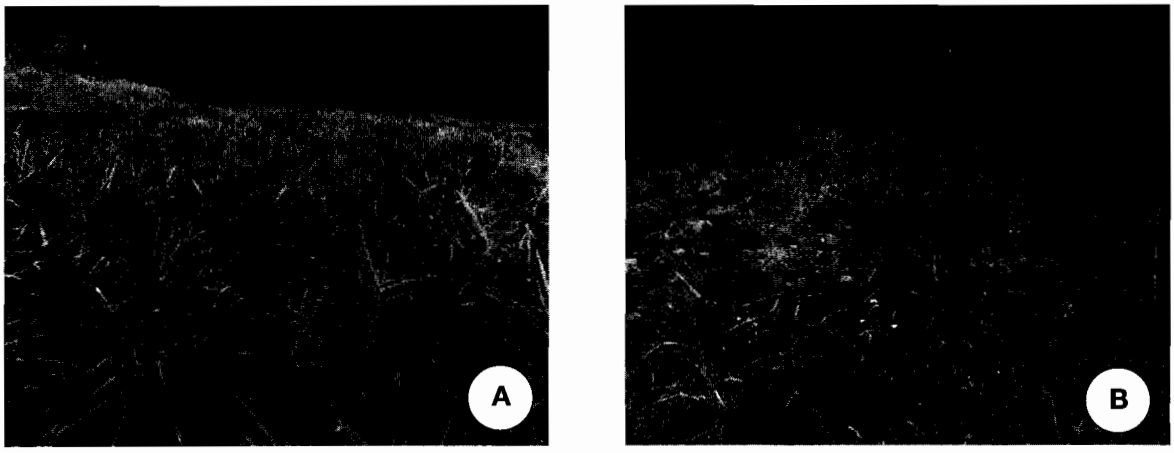

Figure 3 The efficacy of bioproduct powder BS-DOA 24 in controlling bacterial wilt of ginger in a farmer's field

(A) The bioproduct powder BS-DOA 24 application

(B) Control

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 พบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง 68% ในสภาพแปลงทดลอง และเมื่อนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 โดยใช้ ผงทัลคัมเป็นตัวพาในอัตรา 1:4 (V/W) ได้ประชากรแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. Subtilis* 1.1 x10^{10} CFU/g ชีวภัณฑ์สูตรผงนี้สามารถเก็บรักษาได้นาน 12 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ อัตราและวิธีการใช้ชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง คือ การคลุกหัวพันธุ์ขิงด้วย 1% ชีวภัณฑ์สูตรผง และรดต้นพืชด้วยชีวภัณฑ์สูตรผงละลายน้ำ อัตรา 10 ก./น้ำ 20 ล. ทุก 30 วัน เป็นเวลา 8 เดือน สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 65% และเมื่อนำไปทดสอบในแปลงปลูกขิงของเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว ที่อำเภอเขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ พบว่า ชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 62% ได้ผลผลิต 2,260 กก./ไร่ การพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรผง BS-DOA 24 นี้ เป็นการพัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการขยายผลการผลิตเชิงพาณิชย์ และเผยแพร่ให้เกษตรกรนำไปใช้ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ตรงตามความต้องการของตลาด เกษตรกรสามารถปลูกขิงซ้ำที่เดิมได้ เป็นการลดปัญหาการบุกรุกทำลายป่าด้วย และขณะนี้ภาคเอกชนได้มาขอรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* (BS-DOA 24) เพื่อต่อยอดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ให้อยู่ในรูปแบบที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้สะดวกและเก็บรักษาได้นานขึ้น ซึ่งเป็นการนำผลงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตรไปใช้ประโยชน์พัฒนาต่อยอดในเชิงพาณิชย์ และแพร่หลายสู่เกษตรกรในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. *การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.* ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 323 หน้า.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2546. การควบคุมโรคแบคทีเรียของพืชโดยชีววิธี, น. 55-88. ใน จิระเดช แจ่มสว่าง, บรรณาธิการ. *การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. สถิติการส่งออก (Export) ขิงแห้งและขิงสด : ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/oae__report/export__import/export__result.php. 22 เมษายน 2555.

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).

Chamswarng, C., Intanoo, W., Charoenrak, P., and Sirikongsuk, T. 2012. Efficacy of Powder Formulation of *Trichoderma harzianum* for Increasing Yield, Reducing Leaf Brown Spot and Dirty Panicle of Rice in Seed Production Field, pages 53. *In The International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases,* February 7-10, 2012 (Abstracts). The Empress Hotel Chiang Mai, Thailand.

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.

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.* pages 204-205. *In: Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium,* June 22-27, 1997. Guadeloupe.

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 pages 235-242. *In: Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium,* June 22-27, 1997. Guadeloupe.