การคัดเลือก และทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัว สาเหตุจากแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

Selection and efficacy test of *Bacillus* spp. for controlling anthulium blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae*

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ รุ่งนภา คงสุวรรณ์ เพลินพิศ สงสังข์
ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกเก็บจากหน้าวัว (epiphyte และ endophyte) และแบคทีเรียจาก culture collection เลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ด้วยเทคนิค paper disc diffusion บนอาหาร Nutrient Glucose Agar เกิดเป็นวงใส (clear zone) ขนาดกว้างและคงสภาพการยับยั้งเป็นเวลากว่า 7 วัน นำมาทดสอบการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ปี 2551 ใช้หน้าวัวพันธุ์อ่อนแอ 2 พันธุ์ คือ โรเซตตา และทรอปิคอล โดยพ่นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้และแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ชีวภัณฑ์การค้า เปรียบเทียบกับพ่นน้ำเปล่า ทุก 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1G7 และ 1G7+KA2 ให้ผลในการควบคุมโรคดีกว่าการทดลองเปรียบเทียบ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคยังค่อนข้างสูง ปี 2552 คัดเลือกและทดสอบการควบคุมโรคบนหน้าวัวพันธุ์โรซ่า พบว่ากรรมวิธีการพ่นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท 1G7+KA2+20W1 ให้ผลในการควบคุมโรคดีกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ รองลงมาคือ 20W1 การทดลองปี 2553 เลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1 และ KA2 มาพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นผงอัดเม็ดฟู่ ทดสอบการควบคุมโรคบนหน้าวัวพันธุ์โรซ่า โดยพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์ พบว่ากรรมวิธีพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อไอโซเลท 20W1 รองมาคือ KA2 และการพ่นชีวภัณฑ์ไอโซเลท 20W1+KA2 ควบคุมโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นและกรรมวิธีเปรียบเทียบ แต่ทุกกรรมวิธีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ร้อนชื้นกว่าสภาพแปลงเกษตรกร การพัฒนาวิธีการเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นชีวภัณฑ์รูปผงอัดเม็ดฟู่

รหัสการทดลอง 09-02-49-01

โดยผสมเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ ใส่สารเพิ่มปริมาณ สารก่อฟองฟู่ และสารกันติด แล้วอัดเป็นเม็ด น้ำหนักเม็ดละประมาณ 4 กรัม ชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่สามารถแตกตัวในน้ำได้ดีภายใน 1 นาที มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อสูง ใช้งานง่ายสะดวก สามารถพัฒนาชีวภัณฑ์สำหรับเกษตรกรเพื่อควบคุมโรคในแปลงได้ โดยไม่ต้องเตรียมเชื้อสดทุกครั้ง

คำนำ

โรคใบไหม้หน้าวัว เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ส่วนมากพบการเข้าทำลายที่ใบอ่อนถึงใบกลางของต้นหน้าวัว ทำให้เกิดอาการแผลจุดช้ำฉ่ำน้ำ โดยเฉพาะบริเวณใกล้ขอบใบ ที่มีต่อมคายน้ำ (hydrathode) และบริเวณปากใบ (stomata) ซึ่งเป็นจุดที่แบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าทำลายได้ง่าย ทั้งนี้อาการแผลจุดช้ำฉ่ำน้ำสังเกตเห็นได้ชัดเจนจากด้านใต้ใบหน้าวัว เนื้อเยื่อใบบริเวณที่ถูกเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลายจะเป็นสีเหลือง จุดช้ำฉ่ำน้ำลุกลามเชื่อมต่อกันทำให้เกิดอาการแผลไหม้จากบริเวณขอบใบ บางครั้งอาจพบอาการไหม้จากบริเวณกลางใบ เชื้อแบคทีเรียที่เข้าทำลายพืชเจริญเพิ่มปริมาณเคลื่อนที่ไปยังบริเวณท่อลำเลียงของก้านใบพืชและลำต้น แบคทีเรียเข้าทำลายเซลล์พืชและอุดตันขัดขวางการเคลื่อนย้ายอาหารและน้ำ ทำให้ต้นหน้าวัวเหี่ยวแสดงอาการขาดน้ำ ใบแก่ของหน้าวัวที่อยู่ด้านล่างเนื้อใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขณะที่เส้นใบยังเขียว ลำต้นหลักของหน้าวัวที่ถูกเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลายจะเน่าช้ำเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ทำให้บริเวณจุดเจริญเสียไป ใบหลุดร่วงจากต้นหน้าวัว เมื่อพืชไม่สามารถลำเลียงน้ำและอาหารไปเลี้ยงลำต้นได้ ต้นหน้าวัวจะแสดงอาการเหี่ยวหรือเน่าตายในที่สุด หากจานรองดอกของหน้าวัวที่มีรูปทรงคล้ายหัวใจถูกเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลาย เรียกว่าอาการดอกไหม้ นอกจากนี้อาจพบการเข้าทำลายของแบคทีเรียทางปากใบ ทำให้เกิดอาการเป็นจุดช้ำฉ่ำน้ำรอบแผลเป็นสีน้ำตาล (ปิยรัตน์, 2548; ปิยรัตน์ และคณะ, 2550)

เนื่องจากยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค แนวทางการควบคุมโรคด้วยเชื้อปฏิปักษ์ได้มีการศึกษาโดยเสมอใจ และคณะ (2548) ศึกษาการควบคุมโรคไหม้ของหน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยชีววิธีในพื้นที่ปลูกภาคใต้ โดยรวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากวัสดุปลูก ใบพืชที่เป็นโรค และใบพืชปกติ ด้วยวิธี dilution plate บนอาหาร King's B และ Nutrient agar เก็บเชื้อแบคทีเรียได้ จำนวน 1,387 ไอโซเลท ทดสอบปฏิกิริยายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* คัดเลือกได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ 18 ไอโซเลท จำแนกเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคโดยใช้กลุ่มเชื้อ 3 ไอโซเลท โดยกลุ่มเชื้อ B1128, B1317 และ B1348 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ดีที่สุด โดยจะดำเนินการทดสอบในโรงเรือนต่อไป นอกจากนี้ Fernandez *et al.* (1989) แยกเชื้อจากเนื้อเยื่อด้านในของก้านใบหน้าวัวนำมาทดสอบพบว่า สามารถควบคุมโรคใบไหม้ได้ ต่อมารายงานของ Fernandez *et al.* (1990, 1991) พบว่าการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวยังมีความผันแปรของประสิทธิภาพในการควบคุม ซึ่งต้องมีการวิจัยเพื่อปรับใช้ต่อไป

Fukui *et al.* (1999) แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากน้ำเลี้ยงที่อยู่บริเวณท่อลำเลียง และจากน้ำที่พืชคายออกมาจากต่อมคายน้ำ พบว่ากลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากน้ำที่พืชคายออกมาจากต่อมคายน้ำ มีประสิทธิภาพในการควบคุมอาการโรคที่เกิดทางใบได้ จากการติดตามการเข้าทำลายพืชด้วยสายพันธุ์ bioluminescent พบว่าหลังพ่นเซลล์แขวนลอยของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถลดความรุนแรง ของการเข้าทำลายจากเชื้อบริเวณต่อมคายน้ำของพืชได้ และเมื่อพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนบาดแผลสามารถยับยั้งการเข้าทำลายพืชทางบาดแผลได้ แต่เมื่อทดสอบการใช้เชื้อแต่ละชนิดเดี่ยว ๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv.*dieffenbachiae* ได้ Alvarez and Mizumoto (2001) จำแนกชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้หน้าวัว ที่แยกได้จากผิวใบพืช ประกอบด้วย *Sphingomonas chlorophenolica, Microbacterium testaceum, Brevundimonas veslcularis* และ *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด สามารถมีชีวิตรอดเจริญบนผิวใบพืชได้นานถึงสองเดือน ช่วยปกป้องพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค จากการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสัปดาห์ พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ 75 เปอร์เซ็นต์ Fujii *et al.* (2002) ทดสอบการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคร่วมกับการใช้พันธุ์พืชต้านทานจากการดัดแปลงพันธุกรรม พบว่าต้นหน้าวัวที่ดัดแปลงพันธุกรรมมีการปลดปล่อยสารเคมีเป็นโปรตีนที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 4 ชนิด โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ช่วยให้ต้นหน้าวัวมีระบบรากและลำต้นที่สมบูรณ์แข็งแรง ออกดอกเร็ว ต้นโตสูง จำนวนใบและขนาดของใบใหญ่ขึ้น จากรายงานการศึกษาต่างๆของการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้นสามารถนำมาเป็นแนวทางในการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวที่ดีมีประสิทธิภาพ ซึ่งในอนาคตจะได้พัฒนารูปแบบ ผลิตเป็นชีวภัณฑ์ที่ใช้สะดวกและปลอดภัยให้เกษตรกรใช้ต่อไป

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (แบคทีเรียปฏิปักษ์) ที่เก็บไว้ใน culture collections และแยกเก็บจากหน้าวัวและไม้ดอกไม้ประดับ ทั้งบริเวณผิวใบ (epiphyte) หรือแบคทีเรียที่เจริญในท่อลำเลียงพืชเป็น endophyte ทดสอบการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือน และทดลองพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคใบไหม้ของหน้าวัวในรูปแบบผงอัดเม็ดที่ละลายน้ำได้

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

1. การเลี้ยงและแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์

การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ (epiphyte) และท่อลำเลียงพืช (endophyte) โดยเก็บตัวอย่างพืชที่สมบูรณ์ไม่เป็นโรค ดังนี้ การแยกเชื้อจากบริเวณผิวใบ ตัดใบพืชใส่ในขวดน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ แช่ทิ้งไว้และเขย่าเป็นระยะ 30 นาที ทำการเจือจาง และเกลี่ยบนอาหาร NGA บ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ 24-48 ชั่วโมง แยกเก็บเชื้อที่โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ขอบหยัก นำไปเลี้ยงให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ให้รหัสเชื้อและเก็บลงน้ำและบนอาหารเอียงเททับด้วยพาราฟิน เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค การแยกเชื้อจากท่อลำเลียง เลือกเก็บเชื้อที่เจริญอยู่ในท่อลำเลียงบริเวณเส้นใบ ก้านใบ หรือลำ

ต้น โดยล้างบริเวณผิวพืชด้วยคลอร็อก 10 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำเปล่าตาม 2 ครั้ง นำตัวอย่างมาบดในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ และแช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที นำไปเจือจาง และเกลี่ยบนอาหาร เช่นเดียวกับกรรมวิธีด้านบน จากการทดลองแยกเก็บเชื้อได้จากบริเวณผิวใบ และในท่อลำเลียงน้ำอาหารบริเวณก้านใบของหน้าวัว และกล้วยไม้ จำนวน 44 ไอโซเลท

เลี้ยงแบคทีเรียที่เก็บรวมรวบไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชแต่ละไอโซเลท โดยนำมาลากบนอาหาร Nutrient Glucose Agar ใช้ลูปแตะมาเลี้ยงต่อบนอาหารซ้ำให้ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ นำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas axopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว ด้วยวิธี paper disc diffusion

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ NGA, NA (ไม่ใส่ กลูโคส) และ PSA ที่มีส่วนประกอบของน้ำต้มมันฝรั่ง เพื่อเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมเชื้อทดสอบการควบคุมโรค และการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์

2. คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทที่เก็บรวมรวมจากข้อ 1 ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Xad.) ทดสอบ 3 ไอโซเลท และแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท บนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรีย Xad. มาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเชื้อ โดยใช้เซลล์แบคทีเรีย 9 ลูปเต็มละลายในน้ำ 10 มล. จากนั้นใช้ไปเปตดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว NGBที่หลอมและทิ้งให้อุ่นอุณหภูมิ ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NGA เทรองพื้นไว้บาง ๆ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยขูดเชื้อแต่ละไอโซเลท 1 ลูปเต็มละลายในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบโดยหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทชิ้นละ 7 ไมโครลิตร (เปียกชุ่มแต่ไม่เยิ้ม) ลงบนกระดาษตาปลา (เตรียมจากกระดาษกรอง whatman no. 1 ที่วางซ้อนกัน 2 ชั้น แล้วตัดด้วยที่เจาะกระดาษ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาทดสอบ) จากนั้นใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อหยิบกระดาษที่หยดเซลล์แบคทีเรียทดสอบแต่ละไอโซเลทวางบนผิวหน้าอาหารผสมเชื้อ จำนวน 4 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ตรงกลางวางกระดาษที่หยดน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเป็นการทดลองควบคุม (ภาพที่ 1) เก็บจานเลี้ยงเชื้อใส่ในถุงพลาสติก บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลหลังการทดสอบ 24, 48, 72 ชั่วโมง และ 7 วัน โดยวัดความกว้างเส้นรัศมีบริเวณส่วนใส (clear zone)

3. ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัว โดยเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 2 ดังนี้

<u>เตรียมโรงเรือน</u> โรงเรือนทดสอบเป็นชั้นเหล็กยกสูงจากพื้นดินพื้นเป็นกระเบื้อง สูงกว่าพื้นประมาณ 60 เซ็นติเมตร ทำการกั้นแบ่งออกเป็นห้องด้วยพลาสติกใส สำหรับแต่ละกรรมวิธี และซ้ำแต่ละห้องมีขนาดประมาณ 10x15 นิ้ว ด้านข้างกั้นด้วยพลาสติกสูงประมาณ 2 ฟุต ป้องกันการกระเด็นของสารขณะพ่น ด้านบนมีพลาสติกที่สามารถขึงปิดเพื่อรักษาความชื้นหลังการปลูกเชื้อหรือขณะพ่นสารแต่ละกรรมวิธี โดยปกติจะเปิดออกเพื่อให้มีสภาพคล้ายกับโรงเรือนปลูกหน้าวัวทั่วไป

<u>เตรียมต้นหน้าวัว</u> ซื้อต้นหน้าวัวอายุประมาณ 4 เดือน มีใบประมาณ 6-8 ใบ ปลูกในกระถางดำขนาด 4 นิ้ว วัสดุปลูกเป็นกาบมะพร้าว นำมาเลี้ยงปรับสภาพการเจริญในโรงเรือนปลูกพืชทดลองที่มีตาข่ายดำพรางแสงด้านบนประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ รดน้ำและให้ปุ๋ยเม็ดละลายช้าออสโมโคส

<u>เตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์</u> โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากห้องปฏิบัติการในข้อ 2 บนอาหาร NGA บ่มเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเชื้อด้วยน้ำกรอง ปรับความเข้มข้นมีความขุ่นประมาณ 0.2 OD ที่ A600 ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ 2x 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยเชื้อมาเจือจางและเกลี่ยบนอาหารเพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อ เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ใหม่ทุกครั้ง และพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ทดสอบทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน

<u>การพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์</u> เตรียมเชื้อตามกรรมวิธีต่าง ๆ ตามที่กำหนด ใส่ในกระบอกพ่นฝอยขนาด 0.5 ลิตร พ่นเป็นละอองฝอยทั่วต้นด้านบนใบและด้านใต้ใบ

ปี 2551 ทดสอบการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ระหว่างช่วงเวลาเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน โดยใช้หน้าวัวพันธุ์อ่อนแอ 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์โรเซตตา และพันธุ์ทรอปิคอล วางแผนการทดลองแบบ CRD เป็น 10 กรรมวิธี ซ้ำละ 5 ต้น ทดสอบ *Bacillus* sp. แบบใช้ไอโซเลทเดี่ยว และแบบผสม โดยเลือกไอโซเลทจาก culture collection ผสมกับ *Bacillus* sp. ที่แยกจากใบหน้าวัว เปรียบเทียบกับการใช้ *Bacillus* sp. การค้า 1 ชนิด และการทดลองเปรียบเทียบไม่พ่นสาร ดังนี้

ในการทดลองเริ่มด้วยการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 ครั้ง เพื่อเป็นการป้องกัน 24 ชั่วโมงต่อมาพ่นด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรค *X .axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ที่เตรียมโดยเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ บนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ ปรับความเข้มข้นให้มีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml พ่นให้ทั่วใบหน้าวัวทุกต้นที่ทดสอบ หลังจากนั้นทำการทดสอบโดยพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทุก ๆ 7 วัน ตรวจผลการเกิดโรค หากยังไม่พบการเกิดโรค ทำการปลูกเชื้อซ้ำ และพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1-8 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1, 1G7, 772(KA2), 20W4, 2G24, 20W1+KA2, 1G7+KA2 และ 2G24+KA2 ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 9 ชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. (Rotor®)

กรรมวิธีที่ 10 การทดลองเปรียบเทียบ น้ำเปล่า

ปี 2552 ทดสอบการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ระหว่างช่วงเวลาเดือนพฤษภาคม ถึงกรกฎาคม โดยใช้หน้าวัวพันธุ์โรซา วางแผนการทดลองแบบ RCB 10 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1- 8 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 1G7, 20W1, KA2, 1G7+KA2, 1G7+KA2+20W1, KA2+KA14+KA16, KA2+KA16 และ KA2+KA14 ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 9 สารเคมีกลุ่มสารประกอบคอปเปอร์ (บอร์โดมิกซ์เจอร์)

กรรมวิธีที่ 10 การทดลองเปรียบเทียบ น้ำเปล่า

ปี 2553 ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ระหว่างช่วงเวลาเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน โดยการพัฒนาชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ทดสอบเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง ทดลองกับหน้าวัวพันธุ์โรซา วางแผนการทดลองแบบ RCB 7 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 9 ต้น ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1-3ชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1, KA2 และ 20W1+ KA2 ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 4-6 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1, KA2 และ 20W1+ KA2 ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 7 การทดลองเปรียบเทียบ น้ำเปล่า

4. การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp.

<u>การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์</u> เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1 และ KA2 บนอาหาร NGA บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปขูดเอาเฉพาะเซลล์ของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร เพื่อนำมาเตรียมเป็นชีวภัณฑ์

<u>ทดสอบสารประกอบชีวภัณฑ์เม็ดฟองฟู่</u> ทดสอบโดยการปรับสูตรของส่วนประกอบชีวภัณฑ์ที่ประกอบด้วยส่วนประกอบหลักคือ เซลล์ของแบคทีเรีย สารเพิ่มปริมาณ สารก่อฟองฟู่ สารหล่อลื่น และสารกันติด

<u>ทดสอบประสิทธิภาพการละลาย</u> โดยสุ่มชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ จำนวน 3 เม็ด นำมาทดสอบการละลายในบิกเกอร์แก้วที่ใส่น้ำ 50 มิลลิลิตร จับเวลาในการละลาย สังเกตความใสของเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ได้

<u>ทดสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อ</u> นำตัวอย่างสารละลายชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ มาทำการเจือจางไปเปตเชื้อ 100 ไมโครลิตร นำมาเกลี่ยบนอาหาร NGA จำนวน 3 ซ้ำ บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณเชื้อหลังการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สุ่มตรวจนับปริมาณเชื้อจากชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2550 สิ้นสุด กันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนปลูกพืชทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเลี้ยงและแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์

แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผิวใบ จากท่อลำเลียงของหน้าวัว และกล้วยไม้ เนื่องจากเป็นพืชที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนภายใต้การพรางแสง มีอุณหภูมิและความชื้นคล้ายคลึงกัน ซึ่งจะช่วยในเรื่องของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถปรับตัวและคงสภาพเจริญได้ดีได้เมื่อนำไปใช้ควบคุมโรค จากการทดลองแยกเก็บแบคทีเรียได้รวม 41 ไอโซเลท เป็นไอโซเลทจากหน้าวัว 31 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่แยกเก็บได้จากผิวใบ และ 10 ไอโซเลทแยกจากกล้วยไม้

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ สกุล *Bacillus* จาก culture collection จำนวน 68 ไอโซเลท บนอาหาร NGA

เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* บนอาหาร NGA, NA และ PSA พบว่าการเจริญบนอาหาร NGA มีการเจริญของแบคทีเรียที่ดีสม่ำเสมอกว่าบนอาหาร NA และบนอาหาร PSA แบคทีเรียที่ได้โคโลนีค่อนข้างเยิ้ม อาจเนื่องจากมีสารอาหารสมบูรณ์มากกว่าอาหารชนิดอื่น ๆ ในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NGA ตลอดการทดลอง

2. คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์สกุล *Bacillus* spp. รวม 112 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียจาก culture collection จำนวน 70 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่แยกเชื้อเก็บจากหน้าวัวและกล้วยไม้ในงานทดลองนี้ จำนวน 42 ไอโซเลท ในปีแรกทดสอบคัดเลือกกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ไอโซเลท P104 คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ดี มีค่าเฉลี่ยวงรัศมีขนาด 5-9 มิลลิเมตร ได้แก่ ไอโลท 20W1, 1G7, KA2, 20W4, 2G24 (ตารางที่ 1, ภาพที่ 2) โดยสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อได้นานกว่า 7 วัน โดยแบคทีเรียสาเหตุโรคไม่เจริญเข้ามาในบริเวณวงใสของบริเวณยับยั้ง ในปีต่อมาทดสอบคัดเลือกเพิ่มเติมโดยเลือกใช้ไอโซเลทที่ดีในปีแรก เปรียบเทียบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมเชื้อเพิ่มใหม่ คัดเลือกได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญจองเชื้อสาเหตุโรค จำนวน 10 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยรัศมีส่วนใส 5.0-9.5 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคไอโซเลทที่แยกจากหน้าวัวในแหล่งปลูกต่างกัน ได้แก่ ไอโซเลท P061, P139 และ P256 จากผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ โดยมีรัศมีวงใสของการยับยั้งแตกต่างกันไป ดังนั้นในการทดลองควบคุมโรคใน

โรงเรือนจึงเลือกทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบไอโซเลทเดี่ยว และแบบใช้เชื้อผสมกันหลายไอโซเลท เพื่อให้มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคกว้างหลายไอโซเลท โดยทดสอบการเข้ากันได้หรือการยับยั้งปฏิกิริยากันของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยการนำเชื้อมาขีดตัดกันบนอาหารผสมเชื้อสาเหตุโรค แล้วบ่มจานเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูการเข้ากันได้ของเชื้อและปฏิกิริยาการสร้างบริเวณส่วนใสยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค จากผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลือกนำมาผสมกันนั้นสามารถเจริญร่วมกันได้ โดยไม่มีปฏิกิริยายับยั้งการเจริญต่อกัน จึงนำไปทดสอบในสภาพโรงเรือนต่อไป

3. ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัว ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

ปี 2551 ทดสอบการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลองโดยใช้หน้าวัวพันธุ์อ่อนแอ 2 พันธุ์ พบว่าการทดลองที่พ่นด้วย *Bacillus* sp. ทุก 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง ตรวจผลหลังการพ่นแล้วจำนวน 3 ครั้ง และตรวจผลทุกสัปดาห์เป็นจำนวน 4 ครั้ง พบว่าการตรวจผล 2 ครั้งหลังหยุดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์การเกิดโรครุนแรงขึ้น โดยสายพันธุ์ 1G7 ให้ผลในการควบคุมโรคได้ต่ำสุด 27% รองลงมาคือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 20W4, 2G24 และ20W1 ความรุนแรงในการเกิดโรคใกล้เคียงกัน คือ 31% โดยการทดลองเปรียบเทียบมีความรุนแรงในการเกิดโรคในระดับ 38% (ภาพที่ 4) จากการตรวจนับจำนวนต้นที่แข็งแรงมีการเจริญเติบโตดี พบว่ากรรมวิธีพ่นแบคทีเรีย 20W1 มีต้นเจริญสมบูรณ์ใกล้เคียงกับกรรมวิธีพ่นบาซิลลัสการค้า และมากกว่าการทดลองเปรียบเทียบถึง 60 เปอร์เซ็นต์

ปี 2552 ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัว โดยพ่นติดต่อกันทุก 7 วันพบว่ากรรมวิธีการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1G7+KA2+20W1 ให้ผลการควบคุมโรคดีที่กว่ากรรมวิธีอื่น ๆ รองลงมาคือ 20W1 สำหรับการพ่นสารเคมีให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดี แต่พบอาการเป็นพิษต่อพืชทำให้ใบยอดหงิกกระด้าง และอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคดื้อต่อสารเคมี

ปี 2553 ทดสอบซ้ำโดยใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อและชีวภัณฑ์ที่พัฒนาในรูปผงอัดเม็ดฟู่ เลือกใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1 และ KA2 ที่พัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นผงอัดเม็ดฟู่เปรียบเทียบกับการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่ากรรมวิธีพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ KA2 รองมาคือ 20W1 และการพ่นชีวภัณฑ์ 20W1+KA2 ควบคุมโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นและกรรมวิธีเปรียบเทียบ (ภาพที่ 5) แต่อย่างไรก็ดีพบว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคค่อนข้างต่ำ เนื่องจากยังพบการเกิดโรคใกล้เคียงกับการทดลองเปรียบเทียบ และบางกรรมวิธีพบการเกิดโรคสูงกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ ทั้งนี้แนวทางการควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นวิธีที่ดี แต่อาจต้องใช้ระยะเวลาในการหาปริมาณเชื้อ ปริมาณน้ำในการพ่นที่เหมาะสม ตลอดจนช่วงเวลาหรือระยะเวลาในการพ่นชีวภัณฑ์ควบคุมโรค ดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทดลองนี้ทดสอบในโรงเรือนที่หลังคาเป็นตาข่ายพรางแสงไม่สามารถกันฝนได้ และมักพบปัญหาฝนตกหลังการพ่นเชื้อปฏิปักษ์ ทำให้น้ำฝนชะเชื้อปฏิปักษ์ที่พ่นไว้บนใบหน้าวัวออกไป ประกอบกับสภาพอากาศช่วงเดือนสิงหาคมและกันยายนที่ทำการทดลองนี้ร้อนและมีความชื้นในอากาศค่อนข้างสูง เหมาะแก่การเกิดโรคทำให้การพัฒนาของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว และการบันทึกข้อมูลคิดจากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากพื้นที่ใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรค

หน้าวัวบางต้นที่ใบมีอาการของโรคมาก ก้านใบเน่าช้ำเป็นสีน้ำตาล จนหลุดร่วงไป และบางต้นก็มีใบใหม่ขึ้นมา ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ตรวจวัดจากอาการบนใบที่อยู่บนต้นมีความผันแปรไปในบางสัปดาห์

จากการทดลองควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวในสภาพโรงเรือน ได้ทดสอบตรวจดูความสามารถในการเจริญบนใบหน้าวัว ตรวจนับปริมาณเชื้อที่เจริญบนผิวใบหน้าวัวที่ทดลองในแต่ละกรรมวิธี โดยสุ่มตัดใบนำมาแช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำมาเจือจางและเกลี่ยบนอาหาร NGA พบว่าหลังการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ครั้ง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนใบโดยสุ่มได้ในปริมาณค่อนข้างสูงโดยเฉลี่ยประมาณ 10^7 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบพืช 1 กรัม โดยในกรรมวิธีที่พ่นสารเคมี ตรวจไม่พบแบคทีเรียบนใบหน้าวัวที่นำมาแยกตรวจเชื้อ

3. การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp.

ผลการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร NA NGA และ PSA พบว่าเชื้อที่เจริญบน NA จะมีผิวหน้าที่แห้งกว่าบน NGA และ PSA เชื้อที่เจริญบน PSA จะมีลักษณะค่อนข้างเยิ้ม เนื่องจากอาหารมีความสมบูรณ์มาก และเชื้อที่มีอายุ มากจะมีการสร้างสปอร์มากกว่าเชื้ออายุน้อย อาหารที่เหมาะสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ให้ได้ปริมาณมากและมีการสร้างสปอร์ที่ดีได้แก่ NGA

การผลิตชีวภัณฑ์เม็ดฟองฟู่ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดัดแปลงวิธีมาจากชีวภัณฑ์บาซิลลัสที่ใช้กำจัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม โดยใช้อัตราส่วนของสารสำคัญ คือเซลล์แบคทีเรีย 3.75 เปอร์เซ็นต์ สารเพิ่มปริมาณ ใช้แป้งมัน สารก่อฟองฟู่ ได้แก่ กรดซิตริก 33.5 เปอร์เซ็นต์ กรดฟูมาริก 7.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต 55.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และใช้แป้งทัลคัม เป็นสารกันติด โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟต และ CMC ในการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย คลุกส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันทั่วเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปอัดเม็ดด้วยแม่พิมพ์ให้ได้ผงอัดเม็ดฟู่ น้ำหนักเม็ดละประมาณ 4 กรัม จัดวางในถาด นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6) ทิ้งไว้ข้ามคืน แพคเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่แห้งปิดซองเพื่อป้องกันอากาศและความชื้น

ทดสอบประสิทธิภาพของผงอัดเม็ดฟู่ โดยสุ่มทดสอบการละลาย พบว่าเมื่อใส่ลงไปในน้ำ ชีวภัณฑ์เม็ดฟู่จะละลายแตกตัวได้หมดภายใน 30 วินาที ถึง 1 นาที ให้สารแขวนลอยสีขาวถึงเทาอ่อน ซึ่งนำไปเจือจางสำหรับพ่นควบคุมโรคได้ ทั้งนี้พบว่าความคงตัวในรูปเม็ดและความสามารถในการแตกตัวของเม็ดฟองฟู่ จะลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน หรือเปิดปิดถุงบ่อย ๆ เนื่องจากส่วนประกอบที่ใช้ในสูตรชีวภัณฑ์สามารถดูดความชื้นได้ ทำให้เม็ดฟองฟู่ไม่จับกันเป็นเม็ดและสูญเสียความสามารถในการแตกตัวเมื่อเก็บไว้นานๆ ทั้งนี้อาจพัฒนารูปแบบการเก็บเหมือนกับชีวภัณฑ์กำจัดน้ำเสีย โดยแพคในฟลอย์ที่ซิลปิดแบบสุญญากาศ และแกะออกมาใช้หมดไปทีละเม็ด จะแก้ปัญหาความชื้นได้

เมื่อนำชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่มาทดสอบการมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในเม็ดฟองฟู่ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน ตรวจพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถมีชีวิตรอดสูงถึง 10^9 cfu/ml ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดสำหรับชีวภัณฑ์เพื่อการค้า

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

คัดเลือกได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว *X. axonopodisi* pv.*dieffenbachiae* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ KA2 แยกเก็บจากใบน้าวัว ไอโซเลท 20W1 และ 1G7 เป็นแบคทีเรียจาก culture collection พบการเกิดบริเวณยับยั้งเป็นบริเวณวงใส (clear zone) รัศมีการยับยั้งเป็นบริเวณกว้าง 8.5-9.5 มิลลิเมตร ปี 2551 ทดสอบการควบคุมโรค โดยใช้หน้าวัวพันธุ์อ่อนแอ 2 พันธุ์ คือ โรเซตตา และทรอปิคอล พบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1G7 และ 1G7+KA2 ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่น การทดลองปี 2552 บนหน้าวัวพันธุ์โรซ่า พบว่ากรรมวิธีการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 1G7+KA2+20W1 ให้ผลในการควบคุมโรคดีที่สุด รองลงมาคือ 20W1 ผลการทดลองปี 2553 แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1 และ KA2 ที่พัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นผงอัดเม็ดฟู่เปรียบเทียบกับการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง พบว่ากรรมวิธีพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ 20W1 รองมาคือ KA2 และการพ่นชีวภัณฑ์ 20W1+KA2 ควบคุมโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นและกรรมวิธีเปรียบเทียบ การพัฒนาวิธีการเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นชีวภัณฑ์รูปผงอัดเม็ดฟู่ โดยผสมเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ ใส่สารเพิ่มปริมาณ สารก่อฟองฟู่ และสารกันติดแล้วอัดเป็นเม็ดสี่เหลี่ยม น้ำหนักเม็ดละประมาณ 4 กรัม โดยชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ที่ได้สามารถแตกตัวในน้ำได้ดีภายใน 1 นาที มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อสูง ใช้งานง่ายสะดวก สามารถนำไปพัฒนาชีวภัณฑ์สำหรับเกษตรกรทดสอบการควบคุมโรคในแปลงได้ โดยไม่ต้องเตรียมเชื้อสดทุกครั้ง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ของหน้าวัวในโรงเรือนไปทดสอบต่อในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร และปรับการใช้ให้เหมาะสม
2. ปรับปรุงรูปแบบชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ วิธีการเก็บรักษาป้องกันความชื้นให้มีความคงตัว และนำไปให้เกษตรกรทดลองใช้ควบคุมโรค

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2548. โรคใบไหม้!! ปัญหาใหญ่ของหน้าวัว. ข่าวอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 1(7):2.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2550. สำรวจ รวบรวม จำแนก และประเมินความรุนแรงของแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว. ผลงานวิจัยเรื่องเต็มการประชุม สัมมนาวิชาการ อารักขาพืชเพื่อการผลิตสู้วิกฤตโลกร้อน. 21-23 สิงหาคม 2550.

เสมอใจ ชื่นจิตต์ วสันต์ เพชรรัตน์ และพรศิลป์ จันทวีเมือง. 2548. การประเมินการควบคุมโรคใบไหม้ของหน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์. รายงานก้าวหน้า การประเมินผลศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูพืช และวัชพืชทางการเกษตรและสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย.
สืบค้นจาก http://conf.agi.nu.ac.th/nhc7/upload/abstract/abstract%20หน้าวัว1.doc [พฤศจิกายน 2551]

Alvarez, A. and C. Mizumoto. 2001. Bioprotection and stimulation of aroids with phylloplane bacteria. *Phytopathology*. 91:S3.

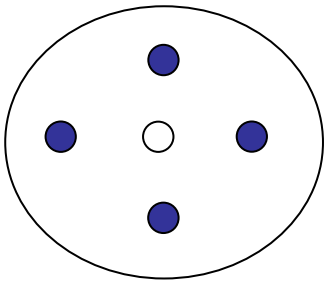
Fernandez, J. A., M. J. Tanabe, P. Moriyasu and B. Duffy. 1989. Biological control. Pages 27-29 in: Proc. Anthurium Blight Conf., 2nd. J.A. Fernandez and T. Nishijima, eds. Hawaii Inst. Trop. Agric. Human Res., University of Hawaii, Honolulu.

Fernandez, J. A., M. J. Tanabe, P. Moriyasu and W. J. Wolff. 1990. Biological control. Pages 41-43 in: Proc. Anthurium Blight Conf., 3rd. A. M. Alvarez, ed. Hawaii Inst. Trop. Agric. Human Res., University of Hawaii, Honolulu.

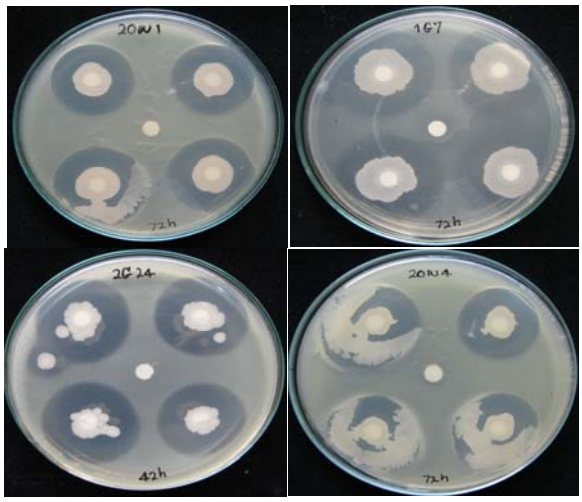
Fernandez, J. A., M. J. Tanabe, W. J. Wolff and P. Moriyasu. 1991. Biological control. Pages 28-30 in: Proc. Anthurium Blight Conf., 4th. A. M. Alvarez, D. C. Deardorff, and K. B. Wadsworth, eds. Hawaii Inst. Trop. Agric. Human Res., University of Hawaii, Honolulu.

Fukui, R., H. Fukui and A. M. Alvarez. 1999a. Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of anthurium blight. *Phytopathology*. 89:366-373.

Fukui, R., H. Fukui and A. M. Alvarez. 1999b. Suppression of bacterial blight by a community isolated from the guttation fluids of anthuriums. *Appl. Environ. Microbiol*. 65: 1020-1028.

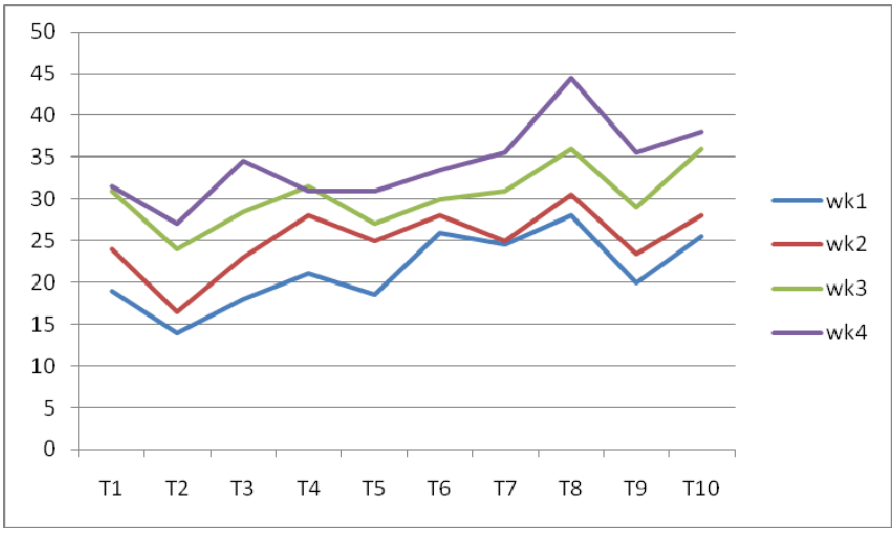


ภาพที่ 1 แสดงผังการวางกระดาษ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ กระดาษขาวตรงกลางหยดน้ำ และกระดาษสีน้ำเงินทั้งสี่จุดเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์

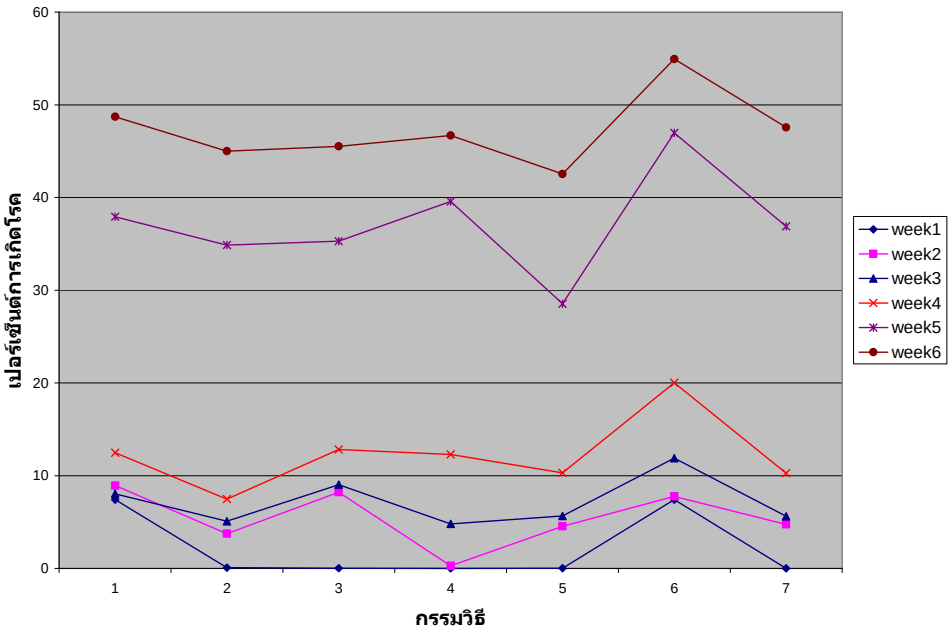


ภาพที่ 2 แสดงบริเวณวงใส (clear zone) จากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

ภาพที่ 3 แสดงผลการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัว ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (ปี 2551) : (ก) การทดลองเปรียบเทียบ (ข) แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท 1G7 (ค) แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท 20W4 (ง) แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท 20W1



ภาพที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นหน้าวัวหลังจากพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแต่ละสัปดาห์ (ปี 2551) ; T1,ไอโซเลท 20W1; T2, ไอโซเลท 1G7; T3, ไอโซเลท KA2 ; T4, ไอโซเลท 20W4 T5, ไอโซเลท 2G24 ; T6, ไอโซเลท 20W1 +KA2; T7, แบคทีเรียไอโซเลท 1G7+KA2 T8, ไอโซเลท 2G24 +KA2; T9, Rotor® ; T10, การทดลองเปรียบเทียบ น้ำเปล่า



ภาพที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นหน้าวัวหลังจากพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแต่ละสัปดาห์ (ปี 2553) : (1) ชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ไอโซเลท 20W1 (2) ชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ไอโซเลท KA2 (3) ชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ไอโซเลท 20W1+ KA2 (4) เซลล์แขวนลอยเชื้อไอโซเลท 20W1 (5) เซลล์แขวนลอยเชื้อไอโซเลท KA2 (6) เซลล์แขวนลอยเชื้อไอโซเลท 20W1+KA (7) การทดลองเปรียบเทียบน้ำเปล่า

ภาพที่ 6 แสดงการผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์และสารเคมี ผงเชื้อที่ได้ก่อนอัดเม็ด และผงอัดเม็ดฟู่แบคทีเรียปฏิปักษ์

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงค่าเฉลี่ยรัศมีส่วนใสบริเวณที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว
ไอโซเลท 256 ด้วยวิธี paper disc diffusion ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด จำนวน 10 ไอโซเลท

ลำดับที่	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยรัศมีส่วนใส (มิลลิเมตร)	แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์
1	KA2	9.5	ใบหน้าวัว
2	20W1	8.5	Culture collection
3	1G7	8.5	Culture collection
4	KA16	8.0	ก้านใบหน้าวัว
5	20W4	7.5	Culture collection
6	2G24	7.5	Culture collection
7	PA12	6.5	ใบกล้วยไม้
8	KA31	5.5	ใบหน้าวัว
9	SA8	5.5	ใบหน้าวัว
10	KA14	5.0	เส้นใบหน้าวัว

ค่าเฉลี่ยรัศมีส่วนใส คำนวณจากการทดสอบ 8 ซ้ำ