การพัฒนาผลิตภัณฑ์*Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo.4 แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิง

Development of tablets product of Bacillus subtilis Tobacco root No.4 strain for controlling Ginger bacterial wilt disease

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บูรณี พั่ววงษ์แพทย์

ทิพวรรณ กันหาญาติ รุ่งนภา ทองเครั่ง

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 โดยการทดสอบการสร้างสปอร์บนอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ TSB, NB และ YT พบว่า อาหารสูตร YT สามารถทำให้เชื้อ BS สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ 4 สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

การเตรียมสูตรสำเร็จแบบเม็ด ทำการทดสอบส่วนผสมต่างๆ ในการผลิตสูตรสำเร็จแบบเม็ด โดยใช้ ผงทาคัมและ อัลจิเนต และ โดยใช้ส่วนผสมของsodium carboxymethyl cellulose (SCMC), microcrystalline cellulose (MCC), lactose, talcum และmagnesium stearate ในอัตราส่วน 2 : 40 : 20 : 37: 1 พบว่ามีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 อยู่ในระหว่างการทดสอบความอยู่รอดของแบคทีเรียในสูตรเม็ด

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-02-54

คำนำ

โรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Ralstonia solanacearum Syn. (Pseudomonas solanacearum) เป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างสูงต่อการผลิตและการส่งออกขิง การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานาน และมีพืชอาศัยกว้าง เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวกับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น ปทุมมา มันฝรั่ง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น antagonist ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย จนกระทั่งแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เช่น เชื้อรา Trichoderma และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

จิระเดช (2534) ได้รายงานว่าการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแอนทาโกนิสต์ ไม่ว่าจะอยู่ในรูปสปอร์ผสมน้ำหรือในรูปผงฝุ่นก็ตาม นับเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดที่สุดเนื่องจากใช้เชื้อปริมาณน้อยและวิธีการไม่ยุ่งยาก

Wassana et al. (2005)ได้ศึกษาการยืดอายุผลิตภัณฑ์ B. subtilis TISTR 001 เพื่อใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ พบว่า ถ้าเติมสารตัวพา (carrier) ได้แก่ zeolite, talcum, และ calcium carbonate ลงไปในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชนิดผง แม้เพิ่มอุณหภูมิถึง 150 องศาเซลเซียสในระหว่างขบวนการผลิตก็ตาม สปอร์ของแบคทีเรียก็สามารถทนอยู่ได้และจำนวนของเอ็นโดสปอร์ก็ไม่ลดลง และพบว่าความเข้มข้นของเอ็นโดสปอร์จะคงที่กว่าผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของเหลว

ณัฏฐิมา et al. (2547) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ Bacillus spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย B. subtilisมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงถึง 60% แต่การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย B. subtilis ในการทดลองนี้เตรียมในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์และราดลงบนดินซึ่งเป็นการไม่สะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในสภาพแปลงและทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย B. subtilis ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลแบคทีเรียตายลง

ณัฏฐิมา et al. (2551) ศึกษาการเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ Bacillus subtilis ดินรากยาสูบ no. 4 โดยเพิ่มปริมาณ B. subtilis ดินรากยาสูบ no. 4 บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar

และ บนอาหารเหลว Tryptic Soy Broth ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, methylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และผง talcum 1:4 (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียในผงเชื้อคือ1.1x1010 และ 0.7x 1010 CFU/กรัม ตามลำดับ นำผงเชื้อ B. subtilis ดินรากยาสูบ no. 4 ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 oC มีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน และ15 เดือน ตามลำดับ เมื่อนำผงเชื้อ B. subtilis ดินรากยาสูบ no. 4 ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ B.subtilis ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงพบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60 % ในเรือนทดลองและ 30-37 % ในแปลงทดลองปีที่ 1 และ 67.5-72.5% ในปีที่สอง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ขิง
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4

โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 บนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวอายุ 18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ทำการเก็บสปอร์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสปอร์ที่ได้ไปปั่นล้าง 2-3 ครั้ง เก็บเชื้อไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปเตรียมสูตรสำเร็จต่อไป

2. การเตรียมสูตรสำเร็จแบบเม็ด

นำสารประกอบต่างๆ ได้แก่ kaolin tacumn alginate lactose hydrogenate vegetable oil (HVO) และกากน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ ผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B.*

subtilis สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ no. 4 จำนวน 1.0 x 10^{12}หน่วยโคโลนี ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสม จนได้เป็นก้อนหมาด นำส่วนผสมที่ได้ใส่ในแม่พิมพ์ยาเม็ด (triturate mold) จากนั้นกดเม็ดยาออกจากแม่พิมพ์ แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3. ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4

โดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4โดยสุ่มจากเม็ดที่ผลิตได้ จำนวน 3 ครั้ง มาวัดความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 โดยนำสูตรสำเร็จแบบเม็ดที่ผสมเข้ากันดีจนเป็นก้อนหมาดๆ เล็กๆ มา drop plate บนอาหารTSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดในสูตรสำเร็จ (cfu/g)

4. การทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยแบคทีเรีย B. subtilis สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 ที่เวลาต่างๆ

โดยทำการชั่งสูตรสำเร็จ สูตรละ 1 กรัม ใส่ขวดที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 99 มิลลิลิตร แล้วเก็บเม็ดยาที่ลอยน้ำที่เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ออก โดยเตรียมตัวอย่างแต่ละเวลาแยกกันเพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ ณ เวลาต่างๆ มานับจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธีการ drop plate บนอาหาร TSA คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการปลดปล่อยเชื้อที่เวลาต่างๆ จากสูตรดังนี้

เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการปลดปล่อยเชื้อ = n x 100 / N

n = ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสารละลายที่เวลาต่างๆ

N = ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เริ่มต้นในสูตรสำเร็จ

5. ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

โดยทดสอบ 2 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษา 15 เดือน วางแผนการทดลอง factorial in CRD 2 ปัจจัย คือ ระดับอุณหภูมิ 15 กรรมวิธี ได้แก่ จำนวนเดือน จำนวน 4 ซ้ำ

6. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในโรงเรือนทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 4 กรรมวิธี ได้แก่ สูตรชนิดเม็ดที่ผลิตได้ จำนวน 5 กรัม, 7 กรัม, 10 กรัม และ 12 กรัม พร้อมกรรมวิธีเปรียบเทียบ จำนวน 4 ซ้ำ

7. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในแปลงทดลองและแปลงเกษตรกร โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 4 กรรมวิธี ได้แก่ สูตรชนิดเม็ดและอัตราการใช้ที่ให้ผลควบคุมโรคเหี่ยวดีที่สุด ในโรงเรือนทดลอง ในการระยะเวลาในการใช้ได้แก่ทุก 7 วัน, ทุก 15 วัน, ทุก 30 วัน และ กรรมวิธีเปรียบเทียบ จำนวน 4 ซ้ำ

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ แปลงปลูกขิงของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 โดยการทดสอบการสร้างสปอร์บนอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ TSB, NB และ YT พบว่า อาหารสูตร YT สามารถทำให้แชื้อ BS สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ 4 สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

การเตรียมสูตรสำเร็จแบบเม็ด ทำการทดสอบส่วนผสมต่างๆ ในการผลิตสูตรสำเร็จแบบเม็ด โดยใช้ ผงทาคัมและ อัลจิเนต และ โดยใช้ส่วนผสมของsodium carboxymethyl cellulose (SCMC), microcrystalline cellulose (MCC), lactose, talcum และmagnesium stearate ในอัตราส่วน 2 : 40 : 20 : 37: 1 พบว่ามีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 อยู่ในระหว่างการทดสอบความอยู่รอดของแบคทีเรียในสูตรเม็ด

เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2534. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการหลักสูตร การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.หน้า 1-13. ระหว่างวันที่13-17 พฤษภาคม 2534 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล,วงศ์ บุญสืบสกุล, อรพรรณ วิเศษสังข์ และ ทัศนาพร ทัศคร. 2547. การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ Bacillus spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2547 . กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 115-126.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ และบุษราคัม อุดมศักดิ์ 2551. พัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรีย Bacillus subtilis ควบคุมโรคเหี่ยวในขิง. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภานุอำไพ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ Bacillus subtillis ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

Wassana Kittikanokrat, Wairuj Dechmahitkul and Phenjun Mekvijitsaeng. 2005. Formulation of Bacillus subtilis TISTR 001 for Increasing Probiotic Shelf-life (http://www.knowledge. biotec.or.th/doc_upload/200411495822.doc) (http://www.splammo.net/bact102/102/ bacillus.html)