การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

Formulation of *Bacillus subtilis* Endospore for Controlling Ginger Wilt

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* (Bs) ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง เริ่มจากการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่าระหว่างการบ่มเชื้อ ความทนทานของ Bs ที่อยู่ในระยะเอ็นโดสปอร์ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ Bs ในรูปเอ็นโดสปอร์ และทดสอบประสิทธิภาพ ผลการทดลองพบว่า สูตร N3 และสูตร FFS1 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ Bs ได้สูงสุดถึง 3.10×10^8 และ 2.1×10^8 สปอร์/มล. เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 480 และ120 ชั่วโมง ตามลำดับ การเลี้ยง Bsในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิปกติ ภายใต้แสงธรรมดา เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง Bs ในการสร้างเอ็นโดสปอร์ และพบว่า Bs สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 100 $^{\circ}$C โดยที่ 40 $^{\circ}$C ซึ่งใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูก ปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลง การทดสอบการแปรรูปผลิตภัณฑ์ในรูปของเหลว พบว่า หลังการเก็บ 3 เดือน ปริมาณ Bs ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ที่ใส่หางนมเป็นสารนำพา ลดลงเพียงเล็กน้อย คือจาก 1.1×10^8 โคโลนี/มล. เป็น 0.2×10^8 โคโลนี/มล. แต่หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ 5 เดือน ปริมาณ Bs เริ่มลดลง จาก 10^7 เป็น 10^6 โคโลนี/มล. ในผลิตภัณฑ์ผงพบว่า ทั้งที่ใช้ทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพา ปริมาณ Bs เริ่มต้นมีปริมาณเท่ากันคือ10^8 โคโลนี/มล. โดยการใช้แป้งข้าวโพด ผลิตภัณฑ์ที่ได้ละลายน้ำได้ดี ในขณะที่การใช้สารทัลคัมนั้น การละลายน้ำจะมีตะกอน หลังการเก็บรักษา 7 เดือน พบว่า ปริมาณ Bs ทั้งสองผลิตภัณฑ์ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนี/มล. ในขณะที่ปริมาณ Bs จากผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากอาหาร PSA ซึ่งไม่มีการกระตุ้นให้สร้างเอ็นโดสปอร์ ไม่มี Bs ที่มีชีวิตรอด เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนการผลิต พบว่า ราคาของสารนำพาทั้งสองชนิดที่นำมาใช้แปรรูปไม่แตกต่างกัน ในปี 2550-2551 ได้ทำการปรับวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลวโดยลดปริมาณหางนมลง 2 เท่า ศึกษาการเก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เหลวในโรงเรือนทดลอง พบว่า ปริมาณ Bs ที่มีชีวิตรอดมีค่าไม่คงที่ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น เมื่อเก็บ 5 เดือน และไม่มีความแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมหางนม แต่จะมีปริมาณ

รหัสการทดลอง 07-01-49-06

มากกว่าในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร PSB เปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติและในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บ 5 เดือน ปริมาณเซล Bs เพิ่มขึ้น โดยในสภาพอุณหภูมิปกติมีปริมาณมากกว่าที่เก็บในตู้เย็น แต่สำหรับผลิตภัณฑ์ผงปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอด มีปริมาณลดลงเท่ากันทั้ง 2 แหล่งเก็บ การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลวจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1โดย เปรียบเทียบการเติมหางนมและไม่เติมหางนมเป็นสารนำพา พบว่า ปริมาณการมีชีวิตรอดของ Bsไม่แตกต่างกัน เมื่อเก็บไว้ 6 เดือน ในอุณหภูมิปกติ และพบว่า ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 มีปริมาณ Bs ที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB การเก็บผลิตภัณฑ์ในอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่าการเก็บในอุณหภูมิปกติ ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ Bs ในโรงเรือน พบว่าการคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุด และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การทดสอบในแปลงปลูก พบว่า การแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกและการคลุกดินก่อนปลูกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมาก ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา การควบคุมโรคด้วยสารเคมีค่อนข้างยาก และมักก่อให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อมตามมา จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาวิธีควบคุมโรคเหี่ยวที่มีความปลอดภัยหลายวิธี เช่น การเขตกรรม การปรับปรุงพันธุ์ และการควบคุมโรคโดยชีววิธีโดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นantagonist ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย จนกระทั่งแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เช่น เชื้อรา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ณัฏฐิมาและคณะ (2548) จึงได้ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ และพบว่า เชื้อแบคทีเรีย Bs มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงถึง 60% แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมาการนำเชื้อแบคทีเรีย Bs ทำโดยใช้สารละลายเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์ และ/หรือราดลงบนดิน ซึ่งวิธีการปฏิบัติเช่นนี้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bs* มักไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลแบคทีเรียตายลง

เนื่องด้วยแบคทีเรียในสกุล*Bacillus* มีคุณสมบัติในการสร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเป็นอวัยวะที่อยู่ในเซลแบคทีเรีย (vegetative cell) โดยเอ็นโดสปอร์จะมีผนังหนา

คงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น รังสี แรงกระแทก ร้อนจัดหรือเย็นจัดหรือสภาพขาดแคลนอาหาร และเอ็นโดสปอร์จะสามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell ได้ใหม่เมื่อใส่ลงไปในดินและสภาพแวดล้อมเหมาะสมและมีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อโรคได้ทันที (http://www.splammo.net/bact102/102/bacillus.html) โดยมหาวิทยาลัยน้อททิ่งแฮม (University of Nottingham) ของประเทศอังกฤษได้ทำการศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรีย *Bs* และรูปแบบผลิตภัณฑ์ในรูปของเอ็นโดสปอร์และได้รับการจดทะเบียนจาก EPA แล้วในชื่อ MBI 600 โดย มีคุณสมบัติทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถเก็บในสภาพแห้งได้ไม่ต่ำกว่า 2 ปี สามารถใช้ร่วมกับสารเคมีชนิดอื่นได้อย่างกว้างขวางและสปอร์สามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell และเข้าครอบคลุม (colonise) รากพืชได้ทันที เมื่อใส่ลงไปในดิน (http://www. microbiogroup.com/BS1.htm)

วาสนา และคณะ, 2547 ได้ศึกษาการยืดอายุผลิตภัณฑ์ *Bs* TISTR 001 เพื่อใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ พบว่า ถ้าเติมสารตัวพา (carrier) ได้แก่ zeolite, talcum, และ calcium carbonate ลงไปในการรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผง แม้เพิ่มอุณหภูมิถึง 150 องศาเซลเซียสในระหว่างกระบวนการผลิตก็ตาม สปอร์ของแบคทีเรียก็สามารถทนอยู่ได้และจำนวนของเอ็นโดสปอร์ก็ไม่ลดลง และพบว่าความเข้มข้นของเอ็นโดสปอร์จะคงที่กว่าผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของเหลว (http://www.nowledge.biotec.or.th/doc_upload /200411495822 .doc)

เพ็ญจันทร์,2546 ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อขบวนการหมักสปอร์ของ *B.subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก พบว่า การใช้โมลาสและกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้หมัก จะสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 001 ได้ถึง 10^9 สปอร์/มล.

งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จของแบคทีเรีย Bs ให้อยู่ในรูปของเอ็นโดสปอร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ให้มีความคงทน เนื่องจากการมีชีวิตรอดในรูปสปอร์ของเชื้อ และสามารถนำไปใช้ได้ทุกสภาพแม้กระทั่งในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง โดยอาศัยคุณสมบัติความทนทานของเอ็นโดสปอร์และการงอกกลับมาเป็นเซลใหม่ได้โดยง่ายของเอ็นโดสปอร์ดังกล่าว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย *B.subtilis* 1 ไอโซเลท (ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* (ณัฏฐิมาและคณะ, 2547)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA (Potato sucrose agar) และสารเคมีในห้องปฏิบัติการ
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ เครื่องเขย่า (incubator shaker)
4. สารที่ได้จากของเหลือภาคเกษตร เช่น หางนม กากน้ำตาล กากถั่วเหลือง โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก) ฯลฯ

วิธีการ

1. การทดสอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

สูตรอาหารทดสอบ (ภาคผนวก) ได้แก่

- **ชุดที่ 1** สูตรอาหารทั่วไป 15 สูตร ได้แก่ : CA MY NGA PSB (Wakimoto'broth) CPG YP NA NTG GMP B N1 N2 N3 N4 และ N5

- **ชุดที่ 2** สูตรอาหารที่มีส่วนผสมจากส่วนเหลือภาคเกษตร ได้แก่ : SM1 SM2 FM1 FM2 FFS1 และ FFS2

1.1 การเตรียมหัวเชื้อ : เลี้ยง Bs บนอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 1 ลูป มาตรฐานลงในอาหาร PSB ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟาสก์ขนาด 25 มล. นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 การทดสอบในสูตรอาหารต่างๆ : ถ่ายหัวเชื้อ 1 มล. ลงในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ ซึ่งบรรจุอยู่ในฟาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 99 มล. นำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

1.3 การบันทึกผล : ตรวจผลโดยนับจำนวนเอ็นโดสปอร์โดยการย้อมสีและนับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 24 ชั่วโมง

2. การทดสอบความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

2.1 เลี้ยง Bs ในอาหารสูตร N3 (Parry,J.M. และคณะ,1988) โดยปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 นำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ ได้แก่ 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 360 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิปกติ (26 $^{\circ}$C)

2.3 ตรวจผลโดยนับจำนวนเอ็นโดสปอร์โดยการย้อมสีและนับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบความทนทานของเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *B.subtilis* สร้างขึ้น ที่อุณหภูมิต่างๆ

3.1 เลี้ยง Bs ในอาหารเหลว N1 N2 N3 N4 และ N5 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

3.2 นำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 8 40 60 80 และ100 $^{\circ}$C เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิปกติ เป็นเวลา 30 นาที

3.3 นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA เพื่อนับจำนวนเซลที่มีชีวิตรอด โดยวิธี serial dilution plate method

4. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis*

4.1 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* ในรูปของเหลว

4.1.1 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 4 เท่า

- เลี้ยง Bsในอาหารเหลว FFS1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มล. ลงไปในอาหารเหลว (ข้อ1) อัตรา 10 % ของปริมาตร

- เติมหางนมลงไป 4 เท่า เขย่าให้เข้ากัน

-บรรจุขวดแก้ว ปิดฝา วางไว้ที่อุณหภูมิปกติ

4.1.2 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า

ปฏิบัติเช่นเดียวกับ 4.1 แต่ลดปริมาณหางนมลงเหลือ 2 เท่า

ตรวจนับเซลแบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique เปรียบเทียบกับ การเลี้ยงบนอาหารเหลวFFS1 ที่ไม่มีการแปรรูปและในอาหาร PSB

4.2 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* ในรูปผง

- ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลอง 4.1 (ข้อ1-2)
- เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงในสารละลาย (ข้อ1)
- เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน
- นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) เก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- ตรวจนับเซลแบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์แปรรูป Bs ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ซึ่งปฏิบัติดังนี้
- เลี้ยง Bs บนอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 48 ชม.
- เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มล. ขูดเซลแบคทีเรีย
- นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 18 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 20 นาที
- รินเอาส่วนใสมาผสมกับ Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1
- เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน
- นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท เก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. ศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

5.1. ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เหลว

นำผลิตภัณฑ์เหลวที่ได้แยกเก็บเป็น 2 แหล่ง คือเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 $^{\circ}C$) และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิปกติ ตรวจนับจำนวน Bs ที่มีชีวิตรอดโดยวิธี serial dilution plate method ทุก ๆเดือน

5.2 ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ผงที่ปรุงแต่งโดยใช้ทัลคัมเป็นสารนำพา บรรจุในถุงพลาสติกปิดฝา แยกเก็บเป็น 2 แหล่ง คือเก็บในตู้เย็น และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิปกติ ปฏิบัติเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์เหลว (ข้อ 5.1)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ชนิดผง

โดยวิธีการแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูก

1. นำดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วมาผสมกับ cell suspension ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยใช้ปริมาณความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมล. ทิ้งไว้ 24 ชม.
2. นำหัวพันธุ์ขิงที่ล้างทำความสะอาดแล้ว แช่ในผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bs* ปริมาณความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมล. เป็นเวลา 1 ชม.
3. ปลูกในดินที่เตรียมไว้ โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบคือ
   - ปลูกขิงในดินที่ราดแบคทีเรีย *R. solanacearum* (C+)
   - ปลูกขิงในดินอบฆ่าเชื้อ (C-)
   - ปลูกขิงที่แช่ในผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ Bs ที่แปรรูปจากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PSA ปกติ
4. ตรวจผล โดยเช็คจำนวนต้นเหี่ยว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค

7. เปรียบเทียบการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว

เปรียบเทียบวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว 3 รูปแบบ คือ

1. FFS1+ Skimmed milk : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร FFS1 บ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 เติมหางนมเป็นสารนำพา

2. PSB + Skimmed milk : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร PSB บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 เติมหางนมเป็นสารนำพา
3. FFS1 : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร FFS1 บ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 แต่ไม่มีการเติมหางนม

8. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในโรงเรือนทดลอง

- เตรียมดินปลูกใส่กระถาง ปริมาณ 700 กรัมต่อกระถาง
- เพาะชำกล้าขิงในกระบะเพาะ ให้มีอายุประมาณ 45 วัน
- ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bs* ในสภาพโรงเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 (T1)คลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ อัตรา 70 กรัมต่อดิน 700 กรัม
กรรมวิธีที่ 2 (T2)ราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร 50 มล. ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 3 (T3)ราดดินด้วยสารละลายเชื้อ Bs* อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร 50 มล.ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 4 (T4)Control + ราดด้วยสารละลายเชื้อ Rs อัตรา 50 มล.ต่อกระถาง (ปริมาณ Rs เท่ากับ 1.8×10^9 cfu/ml.)
กรรมวิธีที่ 5 (T5)Control - ราดดินด้วยน้ำเปล่า

* การเตรียมสารละลายเชื้อ Bs ปฏิบัติโดยการเลี้ยง Bs บนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ จากนั้นนำมาทำเป็น cell suspension ด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นจนได้ปริมาณเซล Bs ประมาณ 10^8 cfu/ml.

- ตรวจผลโดยนับจำนวนต้นที่เป็นโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเปรียบเทียบกับจำนวนต้นทั้งหมด

9. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในแปลงปลูก

ทดสอบผลิตภัณฑ์ผงในแปลงปลูกที่ศูนย์วิจัยพืชสวนลำปาง อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง โดยวิธีรองก้นหลุมและแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกวางแผนการทดลองแบบ RCBD 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 (T1)แช่หัวพันธุ์ขิงก่อนปลูกอัตรา 15 กรัม/น้ำ 10 ลิตร 30 นาที
กรรมวิธีที่ 2 (T2)แช่หัวพันธุ์ขิงก่อนปลูกอัตรา 30 กรัม/น้ำ 10 ลิตร 30 นาที
กรรมวิธีที่ 3 (T3)หยอดก้นหลุมก่อนปลูกอัตรา 15 กรัม/หลุม
กรรมวิธีที่ 4 (T4)หยอดก้นหลุมก่อนปลูกอัตรา 30 กรัม/หลุม
กรรมวิธีที่ 5 (T5)Control

เวลาและสถานที่ **เริ่มต้น** ตุลาคม 2548 **สิ้นสุด** กันยายน 2553
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อ 240 วัน มีอาหาร 8 สูตรได้แก่ YP NB NTG GMP N1 B N2 และ N5 ที่Bs สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ประมาณ 10^2สปอร์/มล. หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 360 ชั่วโมง พบว่า Bs สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ในอาหารทั้ง 15สูตร โดยที่ในสูตร N3 และ N4 Bs สร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุด เท่ากับ 2.13×10^6 และ2.34×10^6สปอร์/มล.ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อจนครบ 480 ชั่วโมง พบว่า Bsสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุดถึง10^8ในอาหาร 6 สูตร ได้แก่ N1 B N2 N5

N4 และ N3 โดยมีปริมาณเอ็นโดสปอร์เท่ากับ 1.10 x 10^8 1.38 x 10^8 1.40 x 10^8 1.43 x 10^8 2.48 x 10^8 และ 3.10 x 10^8สปอร์/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การทดสอบสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร 6 สูตร พบว่า เมื่อเลี้ยง Bs ในอาหารที่มีส่วนผสมของเศษปลาหมักผสมกับกากถั่วเหลืองอัตรา 1:1 (FFS) Bsสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ปริมาณสูงภายใน 5 วัน คือได้ถึง 2.1 x 10^8สปอร์/มล. (ตารางที่ 2) ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนำไปแปรรูปคือ สูตร FFS1 ซึ่งมีส่วนผสมที่ราคาถูก หาง่าย และใช้เวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียไม่นานมาก

2. การทดสอบความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อในอาหาร N3 เป็นเวลา 360 วัน การเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อมล. Bs สร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 7.1x10^8 และ 9.7x10^8 สปอร์/มล.ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

3. การทดสอบความทนทานของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่อุณหภูมิต่างๆ

พบว่า Bs สามารถทนทานทั้งในสภาพอุณหภูมิต่ำ 8 $^{\circ}$C และอุณหภูมิสูงถึง 100 $^{\circ}$C เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร 5 สูตร โดยพบว่า เมื่อแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส Bs ยังคงมีชีวิตรอดถึงประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมล. ลดปริมาณลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่อุณหภูมิห้อง 26 $^{\circ}$C ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมล. และ พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C ซึ่งเป็นอุณหภูมิซึ่งใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูก Bs สามารถมีชีวิตรอดประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมล. โดยที่ปริมาณไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณ Bs ประมาณ 10^7โคโลนีต่อมล. และในสภาพอุณหภูมิสูงถึง 100 $^{\circ}$C Bs ก็ยังคงมีชีวิตรอดถึง 10^4 โคโลนีต่อมล. (ตารางที่ 4)

จากการทดลองนี้ การตรวจผลจำเป็นต้องใช้วิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี serial dilution plate method เพื่อตรวจสอบเซลที่มีชีวิตรอดเท่านั้น และจากลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ถ้าแบคทีเรียอยู่ในสภาพเป็นเซลและยังไม่สร้างเอ็นโดสปอร์ แบคทีเรียสามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 $^{\circ}$C (http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/MM_404652038_12.doc) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเซลแบคทีเรียจะตายลงจนไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ โดยเฉพาะถ้าอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นการที่โคโลนีแบคทีเรียยังสามารถเจริญอยู่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 40-100 $^{\circ}$C แสดงว่า เอ็นโดสปอร์ของ Bs เท่านั้นที่ยังทนต่อความร้อนและเจริญกลับมาเป็นเซลปกติได้ตามเดิม

4. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis*

4.1 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปของเหลว

4.1.1 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 4 เท่า

พบว่า หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลา 2-3 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง ปริมาณ Bs ที่มีชีวิตลดลงไม่มากนัก แต่หลังจาก 3 เดือน ปริมาณ Bs เริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณ Bsลดลงจาก 10^7 เป็น 10^6 โคโลนีต่อมล. เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ Bs ที่เลี้ยงในอาหาร FFS1 ซึ่งไม่มีการแปรรูป พบว่า ปริมาณเซลแบคทีเรียยังมีปริมาณถึง 10^7 โคโลนีต่อมล.

4.1.2 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า

พบว่า หลังการเก็บ 1 เดือน ปริมาณย Bs ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนีต่อมล. แล้วเพิ่มปริมาณเป็น 10^8 โคโลนีต่อมล. ในเดือนที่ 2 จากนั้นลดลง เหลือ10^7 โคโลนีต่อมล. ในเดือนที่ 3 และ4 และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าปริมาณเซลที่มีชีวิตของ Bs กลับเพิ่มขึ้นเป็น 10^{10} โคโลนีต่อมล. และมีปริมาณเท่ากับในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร FFS1 ที่ไม่มีการเติมหางนม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยง Bs ในอาหารPSB ที่เติมหางนมลงไป 2 เท่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ครบ 5 เดือนปริมาณ Bs ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนีต่อมล.(ตารางที่ 7)

4.2 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

พบว่า การแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยใช้ ทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพาเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมคือผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ พบว่า ปริมาณ Bsไม่แตกต่างกัน คือเท่ากับ 10^8 cfu/ml. แต่เมื่อเก็บไว้ 5 เดือน พบว่า ไม่พบ Bs ที่มีชีวิตรอดในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่กรรมวิธีที่แปรรูปจากอาหาร FFS1 ที่ใช้ทัลคัมและแป้งข้าวโพดลดลงเหลือ 10^7 cfu/ml. (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการผลิต พบว่า การใช้แป้งข้าวโพดจะค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีความมันลื่น การเกาะติดในขั้นตอนการผสมเชื้อค่อนข้างยาก ใช้เวลานาน แต่ข้อดีคือผลิตภัณฑ์ที่ได้ละลายน้ำได้ดีกว่าการใช้สารทัลคัม ไม่เหลือตะกอน และราคาไม่ต่างกัน

5. ศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

5.1. ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เหลว

ผลการทดลองเปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์เหลวที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs จากทั้ง 2 แหล่งเก็บ มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น 10^8 โคโลนีต่อมล.เป็น10^{10} โคโลนีต่อมล. และ10^9 โคโลนีต่อมล. เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิห้องและในตู้เย็น ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

5.2 ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผง

ผลการทดลองเปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ผงที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ผงเป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs จากทั้ง 2 แหล่งเก็บ ลดลงเท่า ๆ กัน คือ จากปริมาณเริ่มต้น 10^8 โคโลนีต่อมล. เหลือ 10^7 โคโลนีต่อมล. (ตารางที่ 8)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ชนิดผง

โดยวิธีการแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูก

ในการทดสอบประสิทธิภาพผง ในโรงเรือน พบว่า ในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (C-) ปริมาณต้นขิงที่ปลูกเปรียบเทียบงอกเจริญเป็นต้นไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ทำการทดสอบอีก 2 ครั้ง ก็ยังประสบปัญหาเดิม จึงไม่สามารถตรวจผลได้ ในปีพ.ศ.2551 จะทำการทดสอบอีกครั้งโดยปรับวิธีการ โดยเพาะหัวพันธุ์ขิงให้งอกก่อนทดสอบ และ อีกส่วนหนึ่งจะไปทำการทดสอบในระดับแปลงปลูกที่จังหวัดลำปาง

7. เปรียบเทียบการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว (Bs)

พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เหลวในสภาพอุณหภูมิปกติ เป็นเวลา 6 เดือน ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1ทั้งที่เติมหางนม (FFS1+SM) และไม่เติมหางนม (FFS) ในการแปรรูป มีปริมาณ Bs ที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB (PSB+SM) และพบว่า ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เหลวของกรรมวิธีที่เลี้ยงในอาหาร FFS1 นั้นการเติมหางนมลงไป จะมีปริมาณ Bs ที่มีชีวิตรอดเท่ากับกรรมวิธีที่ไม่เติมหางนม เมื่อเก็บไว้ 6 เดือนในสภาพอุณหภูมิปกติ และการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่า การเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ (ตารางที่ 10)

8. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในโรงเรือนทดลอง

พบว่า หลังการทดสอบ 60 วัน กรรมวิธีการคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุดคือ 46.94% รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ และราดดินด้วย cell suspension ของ Bs โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 62.74 และ65.26 ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี

ควบคุม (Control+) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 83.72 ทั้งนี้การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ (ตารางที่ 11)

9. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในแปลงปลูก

พบว่า หลังการตรวจผลที่ 2 เดือนหลังการทดสอบ พบว่า กรรมวิธีที่แช่หัวพันธุ์ด้วยผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ของ Bs มีอัตราการเกิดโรคเหี่ยวต่ำกว่าการคลุกดินก่อนปลูก โดยการแช่หัวพันธุ์ในอัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 15.7 แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์สถิติ พบว่าทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 12)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่ามีอาหารที่ช่วยกระตุ้นการการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ Bs สูงสุด ได้แก่ N1 B N2 N5 N4 N3 และ FFS1 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ Bs ได้สูงถึง10^8 สปอร์/มล. โดยสูตร N3 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ Bs ได้สูงสุดถึง 3.10 x 10^8 แต่สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูปคือสูตร FFS1 เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด การเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ Bs และพบว่า Bs สามารถทนอุณหภูมิได้ต่ำถึง 8 $^{\circ}$C และสูงถึง 100 $^{\circ}$C โดยที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูกปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือที่อุณหภูมิห้อง 25$\pm$2 $^{\circ}$C

การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงโดยใช้สารทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพาปริมาณ Bs ที่มีชีวิตรอดหลังการเก็บ 7 เดือนไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณลดลงประมาณ 10 ล้านเซล ในขณะที่การแปรรูปจาก Bs ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ ไม่พบการรอดของเซล Bs หลังการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ 5 เดือน

การปรับวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยลดหางนมลง 2 เท่า พบว่า ปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีค่าไม่คงที่ แต่ปริมาณกลับเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น เมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือน และไม่มีความแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมหางนม แต่จะมีปริมาณมากกว่าในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร PSB

เปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติและในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยในสภาพอุณหภูมิปกติมีปริมาณมากกว่าที่เก็บในตู้เย็น แต่สำหรับผลิตภัณฑ์ผงปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอด มีปริมาณลดลงเท่ากันทั้ง 2 แหล่งเก็บ

การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผง จะทำการปรับวิธีการทดสอบในระดับโรงเรือนใหม่ในและจะทดสอบในระดับแปลงปลูกในปี พ.ศ.2551

ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ Bs จากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 นั้น การเติมหางนมลงไปเป็นสารนำพาในผลิตภัณฑ์ ปริมาณการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียไม่แตกต่างกับการไม่เติมหางนม เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติเป็นเวลา 6 เดือน และพบว่า ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 มีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB การเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่า การเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ

การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ Bs ในโรงเรือนทดลอง พบว่าการคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุด รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ และราดดินด้วย cell suspension ของ Bs และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ทั้งนี้การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพในแปลงปลูกไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจน เนื่องจากกรรมวิธีเปรียบเทียบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวต่ำ แต่อย่างไรก็ดีพบว่า การแช่หัวพันธุ์ด้วยผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ Bs มีแนวโน้มลดการเกิดโรคได้ดีกว่า การคลุกดินก่อนปลูก

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รัศมี ฐิติเกียรติพงษ์ , อรพรรณ วิเศษสังข์ และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 90-105. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Parry, J.M., P.C.B. Turnbull, and J.R. Gibson .1988. A Colot Atlas on Bacillus species. Wolfe Medical Publication Ltd.

(http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_3_002c.asp?info_id=237) (ส.ค. 2547)

Norris J.R., R.C.W. Berkeley, N.A. Logan, and A.G. O'Donnell. 1981. The genera *Bacillus* ana *Sporolactobacillus,* p. 1711-1742. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, vol. 2. Springer-Verlag, New York

http://www.splammo. net/bact102/102/bacillus.html (ส.ค. 2547)

http://www. microbiogroup.com/BS1.htm (ส.ค. 2547)

วาสนา กิตติกนกรัตน์, ไวรุจ เดชมหิธกุล และเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง, 2547, "*Study of Formulation and Shelf-life of Bacillus subtilis TISTR 001 Product*", The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, "Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology

http://www.nowledge.biotec.or.th/doc_upload /200411495822 .doc (ส.ค. 2547)

http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/MM_404652038_12.doc (ส.ค. 2547)

เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง,2546 การปรับปรุงผลผลิตของกระบวนการหมักสปอร์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก

http://dcms.thailis.or.th/dcms/basic.php?institute_code=54&option=show&bib=193&query=Bacteria%20&doc_type=0 (ส.ค. 2547)

ตารางที่ 1 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหาร 15 สูตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 240 360 และ 480 ชั่วโมง ตามลำดับ

สูตรอาหาร	**ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่เวลาต่างๆ (สปอร์/มิลลิลิตร)**		
	240 ชั่วโมง (10 วัน)	**360 ชั่วโมง (15 วัน)**	**480 ชั่วโมง (20 วัน)**
CA	0	1.02×10^{2}	1.42×10^{2}
MY	0	3.36×10^{2}	5.70×10^{3}
NGA	0	7.28×10^{3}	2.60×10^{5}
PSB	0	8.48×10^{3}	3.00×10^{5}
CPG	0	8.97×10^{3}	7.00×10^{5}
YP	0	1.36×10^{4}	1.04×10^{6}
NB	1.3×10^{2}	6.45×10^{4}	1.46×10^{6}
NTG	1.27×10^{2}	8.38×10^{4}	2.00×10^{6}
GMP	1.63×10^{2}	3.94×10^{5}	1.04×10^{7}
N1	2.23×10^{2}	7.33×10^{5}	1.10×10^{8}
B	2.46×10^{2}	8.26×10^{5}	1.38×10^{8}
N2	3.34×10^{2}	8.28×10^{5}	1.40×10^{8}
N5	3.36×10^{2}	8.63×10^{5}	1.43×10^{8}
N4	0	2.13×10^{6}	2.48×10^{8}
N3	0	2.34×10^{6}	3.10×10^{8}

ตารางที่ 2 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร 6 สูตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 72 และ120 ชั่วโมง ตามลำดับ

สูตรอาหาร	**ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่เวลาต่างๆ (สปอร์/มิลลิลิตร)**	
	72 ชั่วโมง (3 วัน)	**120 ชั่วโมง (5 วัน)**
FFS1	1.9×10^{6}	**2.1×10^{8}**
FFS2	1.1×10^{6}	**9.6×10^{7}**
FM1	1.2×10^{6}	**7.3×10^{7}**
FM2	8.5×10^{5}	**8.2×10^{6}**
SM1	8.1×10^{5}	**2.0×10^{6}**
SM2	2.8×10^{5}	1.9×10^{6}

ตารางที่ 3 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหาร N3 ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ เป็นเวลา 360 วัน ณ อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส)

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	**ปริมาณเอ็นโดสปอร์ (สปอร์/มิลลิลิตร)**
50	4.10×10^{6}
100	5.60×10^{6}
150	7.10×10^{8}
200	9.70×10^{8}

ตารางที่ 4 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอด ในอาหาร N3 ที่แช่ในน้ำอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

อุณหภูมิ (^{0}C)	**ปริมาณเอ็นโดสปอร์ (สปอร์/มิลลิลิตร)**
8	9.20×10^{6}
26	1.60×10^{7}
40	1.90×10^{7}
60	1.38×10^{6}
80	1.43×10^{4}
100	1.38×10^{4}

ตารางที่ 5 ปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลวที่ใช้หางนมเป็นสารนำพา เท่า เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงในอาหารเศษปลาหมักผสมกากถั่วเหลือง (FFS1) ที่ไม่มีการแปรรูป เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 5 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	ในอาหาร FFS1+หางนม 4 เท่า	**ในอาหารFFS1**
0 [1/]	1.1×10^{8}	1.0×10^{8}
1	0.7×10^{8}	5.3×10^{8}
2	0.2×10^{8}	5.9×10^{7}
3	5.3×10^{6}	8.0×10^{7}
4	2.8×10^{6}	8.6×10^{7}
5	3.3×10^{5}	8.3×10^{7}

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 6 ปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารทัลคัม และแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ก่อนแปรรูป เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 7 เดือน

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)		
	ทัลคัม (อาหาร FFS1)[2/]	แป้งข้าวโพด (อาหาร FFS1)[2/]	ทัลคัม (อาหาร PSA)[3/]
0 [1/]	1.2×10^8	1.5×10^8	2.1×10^8
1	0.9×10^8	0.6×10^8	1.5×10^8
2	1.7×10^7	1.5×10^7	2.0×10^8
3	2.2×10^7	1.7×10^7	1.5×10^7
4	1.3×10^7	1.5×10^7	4.3×10^7
5	3.2×10^7	3.0×10^7	0
6	1.0×10^7	9.0×10^7	0
7	1.5×10^7	2.5×10^7	0

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป [2/] ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เลี้ยงบนอาหาร FFS1 ก่อนแปรรูป [3/] ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ก่อนแปรรูป

ตารางที่ 7 ปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลวที่ใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงในอาหารเศษปลาหมักผสมกากถั่วเหลือง (FFS1) ที่ไม่มีการแปรรูป และในอาหาร PSB เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 5 เดือน

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)		
	ในอาหารFFS1 +หางนม	ในอาหารFFS1	ในอาหาร PSB + หางนม
0[1/]	5.3×10^8	5.5×10^8	8.5×10^8
1	1.0×10^7	8.3×10^8	1.0×10^6
2	7.5×10^8	4.0×10^8	2.0×10^5
3	1.0×10^7	5.0×10^9	4.0×10^6
4	5.0×10^7	1.1×10^{10}	1.0×10^7
5	6.1×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^7

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลว ที่เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) โดยใช้หางนม 2 เท่าเป็น สารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	อุณหภูมิปกติ (25±2 °C)	**อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C)**
0[1/]	5.3×10^{8}	5.3×10^{8}
1	1.0×10^{7}	2.5×10^{8}
2	7.5×10^{8}	1.5×10^{10}
3	1.0×10^{7}	2.6×10^{5}
4	5.0×10^{7}	4.9×10^{10}
5	6.1×10^{10}	6.5×10^{9}

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดผง เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) โดยใช้ทัลคัมเป็นสารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	อุณหภูมิปกติ (25±2 °C)	**อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C)**
0[1/]	6.7×10^{8}	6.7×10^{8}
1	6.0×10^{8}	1.2×10^{8}
2	7.5×10^{7}	1.5×10^{8}
3	2.2×10^{7}	1.7×10^{7}
4	4.3×10^{7}	1.1×10^{7}
5	1.0×10^{7}	1.7×10^{7}

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลว เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) ที่เติมและไม่เติมหางนมเป็นสารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณเซล *Bacillus subtilis* (cfu/ml.)**					
	อุณหภูมิปกติ (25+2 °C)			**อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C)**		
	FFS1+SM	**FFS1**	**PSB+SM**	**FFS1+SM**	**FFS1**	**PSB+SM**
0	1.4×10^9	1.7×10^9	1.0×10^9	1.4×10^9	1.7×10^9	1.0×10^9
1	4.0×10^8	2.0×10^8	1.0×10^7	1.0×10^7	6.0×10^6	3.6×10^7
2	1.0×10^7	9.0×10^7	5.0×10^6	4.0×10^7	1.1×10^7	2.1×10^7
3	5.0×10^7	2.0×10^7	5.0×10^6	1.0×10^7	3.0×10^6	1.2×10^7
4	2.0×10^7	7.0×10^8	8.0×10^6	9.0×10^6	8.0×10^7	3.2×10^6
5	5.0×10^7	8.2×10^8	4.0×10^6	8.5×10^6	3.0×10^7	2.0×10^6
6	1.5×10^7	9.0×10^7	5.0×10^6	2.0×10^6	1.0×10^7	2.0×10^6

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่ทดสอบการควบคุมด้วยผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ ที่ 15 30 45 และ 60 วัน หลังการทดสอบ ในโรงเรือน

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**			
	15 DAI	**30 DAI**	**45 DAI**	**60 DAI**
T1	34.88	44.44	45.83	46.94
T2	42.50	65.85	67.39	67.74
T3	43.53	56.32	67.77	68.26
T4	52.08	68.75	76.19	83.72
T5	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่ทดสอบการควบคุมด้วยผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ ที่ 60 วัน หลังการทดสอบในแปลงปลูก

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**
	60 DAI
T1	15.70
T2	36.77
T3	49.65
T4	49.65
T5	16.52
F = 4.2722*	
Treatments = 2.3672 ns	
CV. = 65.12%	

.....

ภาคผนวก

สูตรอาหารทดสอบเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอนโดสปอร์ 15 สูตร

1. Malt-yeast extract (MY)

Malt extract 3 ก., Yeast extract 3 ก., Peptone 5 ก., Glucose 10 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

2. Peptone-calcium carbonate

Peptone 5 ก., $CaCO_3$ 3 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

3. CPG

Casamino acid 1 ก., Peptone 10 ก., Glucose 10 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

4. NGA

Beef extract 3 ก., Peptone 5 ก., Glucose 2.5 ก. น้ำกลั่น 1,000 มล.

5. PSB (wakimoto'broth)

Potato 300 ก., Sucrose 20 ก., $Ca(Na_3)_2 4H_2O$ 0.5ก., $NaHPO_4 12H_2O$ 2 ก.,Peptone 5 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

6. B

Yeast extract 1 ก., Beef extract 3 ก.,Peptone 5 ก., $MnSO_4H_2O$ 50 มก., $CaCl_2 2H_2O$ 100มก., $MgSO_4 7H_2O$ 500 มก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

7. GMP

Glucose 15 ก., Peptone 6 ก., Meat extract 3 ก., Yeast extract 3 ก. ,NaCl 5 ก., $MgSO_4 7H_2O$ 0.25 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

8. YP

Yeast extract 5 ก., Peptone 10 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

9. NB

Peptone 5 ก., Beef extract 3 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

10. NTG

Glucose 20 ก., KH_2PO_4 0.4ก., $MgSO_4 7H_2O$ 0.2 ก., NaCl 1 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

11. N 1 :Norris J.R และคณะ (1981)

Peptone 5 ก., Meat extract 3 ก., Mn $_2SO_4H_2O$ 0.005 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

12. N 2 : Parry J.M และคณะ (1988)

Mn $_2SO_4H_2O$ 0.03 ก., KH_2PO_4 0.25 ก.,Beef extract 3 ก., Peptone 5 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

13. N 3 : Parry J.M และคณะ (1988)

Peptone 15 ก., Yeast extract 3 ก., NaCl 6 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

14. N 4

$Ca(Na_3)_2 4H_2O$ 0.5ก., $NaHPO_4 12H_2O$ 2 ก., Peptone 15 ก., น้ำกลั่น

1,000 มล.

15. N 5

$Ca(Na_3)_2 4H_2O$ 0.5 ก., $NaHPO_4 12H_2O$ 0.5 ก., Peptone 5ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.

16. SM 1

กากถั่วเหลือง 10 ก., กากน้ำตาล (โมลาสส์; cane molass) 10 มล., น้ำกลั่น 1,000 มล.

17. SM 2

กากถั่วเหลือง 10 ก., กากน้ำตาล (โมลาสส์; cane molass) 5.0 มล., น้ำกลั่น 1,000 มล.

18. FM 1

ปลาป่น 10 ก.,กากน้ำตาล (โมลาสส์; cane molass) 10 มล.,น้ำกลั่น 1,000 มล.

19. FM 2

ปลาป่น 10 ก., กากน้ำตาล (โมลาสส์; cane molass) 5.0 มล., น้ำกลั่น 1,000 มล.

20. FFS 1

โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก) 10 มล., กากถั่วเหลือง 10 ก.,น้ำกลั่น 1,000 มล.

21. FFS 2

โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก)10 มล., กากถั่วเหลือง 5.0 ก., น้ำกลั่น 1,000 มล.