

1. **ชุดโครงการ:** แผนงานวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
2. **ชื่อโครงการวิจัย:** วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี  
**ชื่อกิจกรรม:** การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช
3. **ชื่อการทดลอง:** การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา

*Alternaria brassicicola*

Formulation of Bioproduct *Bacillus subtilis* for Controlling  
*Alternaria brassicicola*

4. **คณะผู้ดำเนินงาน:** หัวหน้าการทดลอง: บุษราคัม อุดมศักดิ์  
ผู้ร่วมงาน : สุรียพร บัวอาจ และณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล  
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ:** การพัฒนารูปแบบชีวภัณฑ์ *B. subtilis* (Bs) 20W1 ให้เป็นผลิตภัณฑ์สูตรผง โดยทำการทดสอบสารพา 6 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าวกล้อง รำข้าว ซีโอไลท์ แปะงาสาลี แปะงาข้าวโพด และทัลคัม โดยเลี้ยง Bs ในอาหาร P:K (ปุ๋ยปลาหมักเหลว: กากถั่วเหลือง อัตรา 1:1) ซึ่งเป็นอาหารที่กระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง ( $25 \pm 5$  องศาเซลเซียส) และในตู้เย็นช่องธรรมดา อุณหภูมิ ( $5 \pm 2$  องศาเซลเซียส) ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดทุกเดือน โดยวิธี serial dilution plate technique บนอาหาร PSA ผลการทดลอง พบว่า การใช้แปะงาสาลี แปะงาข้าวโพด และทัลคัมเป็นสารพา ได้ปริมาณเซลล์ Bs เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ  $10^8$  เซลล์ต่อมล. หลังการเก็บผลิตภัณฑ์ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 เดือน พบว่า การใช้ทัลคัมเป็นสารพา ปริมาณ Bs ที่มีชีวิตรอดยังคงอยู่ในปริมาณสูงสุดคือ  $3.8 \times 10^7$  เซลล์ต่อมล. สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เก็บในตู้เย็น พบว่า การใช้ทัลคัมและแปะงาข้าวโพดเป็นสารพา มีปริมาณ Bs ในผลิตภัณฑ์มีเหลือสูงสุดเท่ากับ  $4.3 \times 10^7$  และ  $1.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมล. ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ Bs 6 สูตร ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตรที่ใช้ซีโอไลท์ และทัลคัมเป็นสารพา สามารถลดการเกิดโรคคะน้าได้สูงสุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.06 และ 0.11 ตามลำดับ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยผลิตภัณฑ์สูตรที่ใช้ปลายข้าว แปะงาข้าวโพด รำข้าว และ แปะงาสาลี และกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ Bs ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 1.54 1.96 2.43 3.77 และ 3.82 ตามลำดับ การทดสอบอัตราที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ Bs ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพา พบว่า ที่อัตรา 40 และ 50 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดเท่ากับ 1.22 และ 1.1.24 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารแมนโคเซบ 80 % WP ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.45 การทดสอบอัตราการละลายของผลิตภัณฑ์ Bs พบว่า การใช้แปะงาข้าวโพด มีอัตราการละลายน้ำได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ การใช้ทัลคัม และแปะงาสาลี เป็นสารพา สำหรับการใช้ ปลายข้าวกล้อง รำข้าว และซีโอไลท์ อัตราการละลายน้ำต่ำสุด จากผลการทดลองสรุปว่า การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ Bs สูตรผงนั้น การใช้สารทัลคัมเป็นสารพามีความเหมาะสมในการผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี เนื่องจากสามารถรักษาเซลล์ Bs ให้มีปริมาณคงเหลือได้ดีที่สุด มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูง และการละลายน้ำอยู่ในอัตราที่ดี นอกจากนี้ทัลคัมและซีโอไลท์เป็นสารที่หาซื้อง่าย และราคาไม่แพง จึงเหมาะสมในการนำมาเป็นสารพา

คำค้น: คะน้า, *Alternaria brassicicola*, *Bacillus subtilis*, bioproduct

**Abstrac:** Formulation of *Bacillus subtilis* 20W1 to commercially Bioproduct formulations, wettable powder, the bacteria *B. subtilis* be cultured in P:K medium (marinade of fish : soybean meal, rate of about 1:1) to produce endospore and using broken-milled rice, rice bran, zeolite, wheat flour ,maize flour and talcum powder as carriers/protectants. The bioproducts be maintained at room temperature ( $25 \pm 5$  °C) and in the fridge ( $5 \pm 2$  °C) condition. The viability cell of bacteria be assessed on potato sucrose agar medium by dilution plate technique every month. The results showed that using wheat flour ,maize flour and talcum powder as carriers could maintain the highest cells of bacteria as  $10^8$  cfu/ml. After 15 months storage at room temperature condition, we found that using talcum powder as carriers showed the highest viability cell was  $3.8 \times 10^7$  cfu/ml. and in the fridge condition, the bioproducts which using talcum powder and maize flour as carriers showed the highest viability cell were  $4.3 \times 10^7$  and  $1.0 \times$  cfu/ml, respectively. Efficacy trial of all bioproducts were then tested for the disease control in the screen house by spraying. The results showed that the bioproducts which used zeolite and talcum powder as carriers could effectively reduced the chinese kale leaf spot disease to 0.06% and 0.11%, respectively and significantly control the disease better than using broken-milled, maize flour, rice bran, wheat flour as carriers and water spraying treatment which could reduced the disease to 1.54%, 1.96%, 2.43%, 3.77% and 3.82%, respectively. Efficacy trial of the bioproduct at 40 and 50 grams/20 liters of water showed the most effective to reduce the disease to 1.22% and 1.24%, respectively and showed the disease control at the same level as using mancozeb 80% WP when applied at 40 grams/20 liters of water. Testing of water soluble of all bioproducts found that the bioproduct which used maize flour as carrier at 40 grams/20 liters of water showed the best solubility and using talcum powder and wheat flour showed better than broken-milled rice, rice bran and zeolite as carriers, respectively. In conclusion, using talcum powder and zeolite as carrier are appropriate to bioproduct formulation into wettable powder.

**Keyword:** *Alternaria brassicicola*, *Bacillus subtilis*, bioproduct

## 6. คำนำ

คะน้า (*Brassica alboglabra*) เป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นิยมปลูกและบริโภคทั้งในประเทศ และเป็นสินค้าส่งออกไปต่างประเทศ คะน้าอุดมด้วยธาตุอาหารและวิตามิน โดยเฉพาะเบต้า-แคโรทีนและแคลเซียม (กรมอนามัย, 2535) คะน้าสามารถปลูกได้เกือบทุกพื้นที่ในประเทศไทย โดยในช่วงปี 2548/2549 พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกคะน้า 48,731 ไร่ ให้ผลผลิต 58,019.86 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549) แต่ประเทศไทยมักประสบปัญหาการส่งออกพืชผักรวมทั้งคะน้า เนื่องจากมักตรวจพบสารเคมีตกค้างในผักเกินกว่าค่าที่กำหนด ซึ่งปัญหาหลักของการปลูกคะน้าคือโรคและแมลงศัตรู โดยโรคพืชที่สำคัญคือ โรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire เป็นเชื้อราที่มักทำให้เกิดโรครากับพืชผักตระกูลผักกาด เช่น คะน้า ผักกาดขาว ผักกาดเขียว บร็อคโคลี่ กวางตุ้ง และกะหล่ำปลี เป็นต้น อาการของโรคเกิดทุกส่วนของพืช ทั้งใบ ก้าน ใบและลำต้น พบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการในต้นแก่มักพบบนใบและก้าน เกิดเป็นแผลจุดเล็ก ๆ สีเหลือง ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้น สีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลมีลักษณะเป็นวงค่อนข้างกลม เรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ สปอร์ของเชื้อราแพร่ไปตามลม น้ำ แผลง สัตว์ มนุษย์ และติดไปกับเครื่องมือระบอบมากในฤดูฝนหรือสภาพที่มีความชื้นสูง (พรพิมล, 2552) โรคนี้พบได้ทุกแหล่งปลูกของคะน้า เชื้อราสามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้ผลผลิตลดลงหรือด้อยคุณภาพ เกษตรกรจึงมักเลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดเป็นอันดับแรก และมักใช้อย่างผิดวิธีจึงทำให้เกิดผลกระทบของการใช้สารเคมีดังกล่าว ในปัจจุบันการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในต่างประเทศมีการผลิตขายในเชิงพาณิชย์แล้ว เช่น *Bacillus subtilis* MBI 600 ; Integral<sup>®</sup> หรือ *Bacillus subtilis* QST 713 ซึ่งผ่านการขึ้นทะเบียนจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา หรือ Environment Protection Agency ; EPA ([WWW.epa.gov/biotech\\_rule/pubs/fra/fra009.htm](http://WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm))

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพค่อนข้างมาก สามารถพบได้ทั่ว ๆ ไป ในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ ฯลฯ เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของซากพืชและซากอื่นๆ สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์จำพวก carbohydrase และ protease ออกนอกเซลล์ได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นแบคทีเรียประเภท aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมเพื่อการอยู่รอด ซึ่งสามารถอยู่รอดได้แม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง ขาดแคลนอาหาร และแสงอุลตราไวโอเล็ต และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม *B. subtilis* ก็สามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่โดยง่าย ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพธรรมชาติ (Baker and Cook, 1974) นอกจากนี้ *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Fiddaman and Rossal, 1994) และไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม (Shoda, 2000)

ในประเทศไทยก็ได้มีการศึกษาวิจัยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชกันมาอย่างต่อเนื่อง จนสามารถพัฒนาได้เป็นสารชีวอินทรีย์หลายชนิดที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบได้กับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช แบคทีเรีย *Bacillus* หลายชนิดมีรายงานว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคได้เช่นเดียวกับ pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสงในพืชหลายชนิด ทั้งสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและแปลง

ทดลอง (นิพนธ์, 2538) พากเพียร และคณะ (2544) ได้ทดสอบ เชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลงนาทดลอง ใช้ข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48, 52.53, 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ซึ่งทุกกรรมวิธีจะมีระดับความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธี เปรียบเทียบอย่างน้อยสำคัญทางสถิติซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคสูงถึง 65.46 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ณัฐิมาและคณะ (2548) ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากดิน, รากพืช และปุ๋ยคอก ได้จำนวน 525 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ประมาณ 70-100% วรรณวิไล และคณะ (2548) ได้ทดลองพ่น *Bacillus* sp. ไอโซเลท WS 16 และ WS 18 ในการควบคุมโรคใบจุดคาน้ำในแปลงปลูก พบว่า ทั้งสองไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ การพ่นด้วยน้ำหนึ่ง ในปี พ.ศ. 2550 บุษราคัม และ ณัฐิมา (2550) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 2G4, 22W10, 20W12, 17G18 และ 20W4 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ 100% และไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวแตงกวา 100% โดยไอโซเลท 17G18 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากทั้งเชื้อรา *F. oxysporum* และ *F. solani* ปฎิมาพรและคณะ (2551) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนสของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้า โดยวิธี standard blotter plate พบว่าการแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากับ 41.90% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง โดยหลังเสร็จสิ้นการทดลอง พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถมีชีวิตรอดอยู่รอดอยู่บนผิวพืช และในดินรอบรากต้นพริกชี้ฟ้าได้

*B. subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย และกากน้ำตาลได้ ส่วนเกลือแร่ต่างๆ มักต้องการในปริมาณน้อย การเติมเกลือแร่บางชนิด เช่น แคลเซียมและแมงกานีส จะเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ได้ โดยไวรจัน และคณะ (2550) ได้รายงานไว้ว่า ในการผลิตสปอร์ของ *B. subtilis* นั้น สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตได้ดี แต่อาจเกิดปัญหาเรื่องฟองในการผลิตระดับใหญ่ กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมและบุษราคัมและณัฐิมา (2553) ได้รายงานไว้ว่า สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูป *B. subtilis* คือสูตร FFS1 ซึ่งเป็นส่วนผสมของ โปรตีนปลา (เศษปลาหมักหรือปุ๋ยปลา) 10 ม.ล. ผสมกากถั่วเหลือง 10 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 ม.ล. เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด และการเลี้ยงแบคทีเรีย ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B. subtilis*

ได้มีการศึกษาความปลอดภัยของ *B. subtilis* ต่อคน โดย อมรรรัตน์ และ มณจันทร์ (2539) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืช ในหนูลับจักรเพื่อยืนยันความปลอดภัยนี้ โดยได้ทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรียชนิดผง 2 ชนิด โดยผสมกับอาหารในอัตรา 1:10 โดยน้ำหนักซึ่งเป็นอัตราที่แนะนำใช้ทาแผลบนต้นพืชทำการทดสอบกับหนูลับจักร ให้อาหารทางปากในอัตรา 10 กรัมต่อวันต่อตัวโดยเฉลี่ย เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าหนูในกลุ่มทดลองที่ได้รับชีวภัณฑ์แบคทีเรียผสมอาหารทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และจากการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบลักษณะรอยโรคที่อวัยวะภายใน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใดๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้เกิดขึ้น

## 7. วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ PDA (Potato dextrose agar) , PSA (Potato sucrose agar)
2. ปลาหมึก (ปุ๋ยปลาเหลว)
3. กากถั่วเหลือง
4. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท 20W1
5. สารพา (carrier) ได้แก่ ผงทัลคัม แป้งข้าวโพด ปลายข้าว รำข้าว ซีโอไลต์ และแป้งสาลี
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้อ่างแช่เย็น ฯลฯ

### วิธีการ

#### ปฏิบัติดังนี้:

#### 1. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

การทดสอบสารพาต่างๆ ใช้สารพา 6 ชนิด ดังนี้

1. ใช้สารพา ทัลคัม : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
2. ใช้สารพา แป้งข้าวโพด : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
3. ใช้สารพา ปลายข้าว : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
4. ใช้สารพา รำข้าว : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
5. ใช้สารพา ซีโอไลต์ : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
6. ใช้สารพา แป้งสาลี : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1

ปฏิบัติการทดลอง ดังนี้

1. เลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 ในอาหารเหลว สูตรปุ๋ยปลาหมึกผสมกากถั่วเหลือง เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน (บุษราคัม และคณะ, 2550)

2. เติมสารละลาย  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 M 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลว (ข้อ 1) อัตรา 10 % โดยปริมาตร
3. เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงในสารละลาย (ข้อ 1.2)
4. เติมสารพาหะ ตามกรรมวิธีที่ 1-5 ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน
5. นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผึ่งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์)
6. บดให้ละเอียด แล้วร่อนด้วยตระแกรงร่อน จากนั้นเก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ในอุณหภูมิห้อง ( $25 \pm 5$  องศาเซลเซียส) และในสภาพในตู้เย็นช่องธรรมดา อุณหภูมิ ( $5 \pm 2$  องศาเซลเซียส)
7. การบันทึกข้อมูล: ตรวจนับเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique บนอาหาร PSA

## 2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง 6 ชนิด ในการควบคุมโรคใบจุดในระดับโรงเรือนทดลอง

### 2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์สูตรผงทั้ง 6 สูตร ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบจุดในโรงเรือนทดลอง โดยวิธีการพ่นด้วยสารละลายผลิตภัณฑ์ โดยปฏิบัติดังนี้

วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ดังนี้

- |               |   |
|---------------|---|
| กรรมวิธีที่ 1 | พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง สูตรปลายข้าว เป็นสารพาหะ       |
| กรรมวิธีที่ 2 | พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง สูตรรำข้าว เป็นสารพาหะ         |
| กรรมวิธีที่ 3 | พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง สูตรแป้งข้าวโพด เป็นสารพาหะ    |
| กรรมวิธีที่ 4 | พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง สูตรแป้งสาลี เป็นสารพาหะ       |
| กรรมวิธีที่ 5 | พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง สูตรซีโอไลท์ เป็นสารพาหะ       |
| กรรมวิธีที่ 6 | พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง สูตรทัลคัม เป็นสารพาหะ         |
| กรรมวิธีที่ 7 | พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)   |
| กรรมวิธีที่ 8 | พ่นด้วย cell suspension ของเชื้อรา <i>A. brassicicola</i> (Control +) |

ปฏิบัติการทดลองดังนี้

1. ปลูกคะน้าในกระถางปลูกให้มีอายุประมาณ 30 วัน
2. นำผลิตภัณฑ์ผง *B. subtilis* สูตรต่างๆ มาผสมน้ำในอัตราต่างๆ 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม.
3. นำสารละลายที่ได้ จากข้อ 2 ไปพ่นบนต้นคะน้าอายุประมาณ 30 วัน ที่เตรียมไว้ จากข้อ 1 ตามกรรมวิธีต่างๆ โดยใช้เครื่องพ่นอัดแรงดัน ให้ชุ่มสม่ำเสมอทั้งต้น
4. การพ่น: พ่นสารละลายผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง ก่อนการพ่น cell suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* 24 ชม. และ ทำการพ่นซ้ำอีกครั้ง หลังการพ่น cell suspension ของ *A. brassicicola* 24 ชม.
5. การบันทึกข้อมูล: ตรวจผลโดยให้เป็นเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ที่ 15 วันหลังการทดสอบ

## 2.2 ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง	อัตรา	20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2	พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง	อัตรา	30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3	พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง	อัตรา	40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4	พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ผง	อัตรา	50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5	พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ mancozeb 80% WP	อัตรา	40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6	พ่นด้วย cell suspension ของเชื้อรา <i>A. brassicicola</i> (Control +)		
กรรมวิธีที่ 7	พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)		

ปฏิบัติการทดลองดังนี้

1. ปลูกคะน้าในกระถางปลูกให้มีอายุประมาณ 30 วัน
2. นำผลิตภัณฑ์ผง *B. subtilis* สูตรที่ลดทอนเป็นสารพามาผสมน้ำในอัตราต่างๆ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม.
3. นำสารละลายที่ได้ จากข้อ 2 ไปพ่นบนต้นคะน้าอายุประมาณ 30 วัน ที่เตรียมไว้ จากข้อ 1 ตามกรรมวิธีต่างๆ โดยใช้เครื่องพ่นอัดแรงดัน ให้ชุ่มสม่ำเสมอทั้งต้น
4. การพ่น: พ่นสารละลายผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง ก่อนการพ่น cell suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* 24 ชม. และ ทำการพ่นซ้ำอีกครั้ง หลังการพ่น cell suspension ของ *A. brassicicola* 24 ชม.

### การบันทึกข้อมูล

ตรวจผลโดยให้เป็นเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบต่อต้น ที่ 15 วันหลังการทดสอบ

### 3. ทดสอบการละลายของชีวภัณฑ์สูตรผง ในน้ำธรรมชาติ

- ชั่งสารชีวภัณฑ์สูตรผงที่ใช้สารพา 6 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าว ไร่ข้าว ซีโอไลท์ แปะสาสี แปะข้าวโพด และ ทัลคัม 0.5 กรัม ใส่ลงในฟลัก เดิมน้ำเปล่าลงไป 250 มล. (อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร) โดยอุณหภูมิเท่ากับ 24 °C

- คนให้ละลาย จากนั้นตรวจผลโดยสังเกตด้วยสายตา ที่เวลา 5 10 และ 15 นาที หลังการทดสอบ ในคะแนนเป็นระดับการละลายจากละลายน้อยที่สุดจนถึงละลายดีที่สุด

### เวลาและสถานที่

เริ่มต้น: ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการทดลอง: กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

ผลการทดลอง พบว่า การแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bs* โดยใช้แป้งสาลี แป้งข้าวโพด และทัลคัมเป็นสารพา จะได้ปริมาณเซลล์ *Bs* ในผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ  $10^8$  เซลล์ต่อมล. ซึ่งสูงกว่าการใช้ ปลายข้าว รำข้าว และซีโอไลท์เป็นสารพา ซึ่งมีปริมาณ *Bs* หลังการผสมปรุงแต่งเท่ากับ  $10^7$  เซลล์ต่อมล. หลังการเก็บสารชีวภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้อง ( $25 \pm 5$  องศาเซลเซียส) ไว้เป็นเวลา 15 เดือน พบว่า สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพา มีปริมาณ *Bs* ที่มีชีวิตรอดคงอยู่เท่ากับ  $3.8 \times 10^7$  เซลล์ต่อมล. ในขณะที่การใช้ปลายข้าว รำข้าว ซีโอไลท์ แป้งสาลี แป้งข้าวโพด และรำข้าว เป็นสารพา มีปริมาณ *Bs* เหลือประมาณ  $10^6$  และ  $10^5$  เซลล์ต่อมล. ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

การทดลองเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพตู้เย็นช่องธรรมดา อุณหภูมิ ( $5 \pm 2$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 เดือน พบว่า การใช้ทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารพา ปริมาณ *Bs* ในผลิตภัณฑ์มีเหลือเท่ากับ  $4.3 \times 10^7$  และ  $1.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมล. ในขณะที่การใช้ปลายข้าว รำข้าว ซีโอไลท์ แป้งสาลี และรำข้าว เป็นสารพา ปริมาณ *Bs* มีเหลือประมาณ  $10^6$  เซลล์ต่อมล. (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1)

### 2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง 6 ชนิด ในการควบคุมโรคใบจุดในระดับโรงเรือนทดลอง

#### 2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bs* ที่ใช้สารพา 6 ชนิด พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตรที่ใช้ซีโอไลท์ และทัลคัมเป็นสารพา สามารถลดการเกิดโรคได้สูงสุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.06 และ 0.11 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยผลิตภัณฑ์สูตรที่ใช้ปลายข้าว แป้งข้าวโพด รำข้าว แป้งสาลี และกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *Bs* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 1.54 1.96 2.43 3.77 และ 3.82 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

#### 2.2 ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง

ผลการทดสอบอัตราที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ *Bs* สูตรผง พบว่า ที่อัตรา 40 และ 50 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดเท่ากับ 1.22 และ 1.24 ตามลำดับ โดยที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารแมนโคเซบ 80 % WP ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.45 (ตารางที่ 4)

### 3. ทดสอบการละลายของชีวภัณฑ์ผง ในน้ำธรรมดา

ผลการทดสอบอัตราการละลายของผลิตภัณฑ์ *Bs* ที่ใช้สารพา 6 ชนิด อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ในน้ำธรรมดา พบว่า การใช้แป้งข้าวโพด มีอัตราการละลายน้ำได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่การใช้ทัลคัมเป็นสารพา สำหรับการใช้ ปลายข้าว รำข้าว และซีโอไลท์ อัตราการละลายน้ำต่ำสุด (ตารางที่ 5)



ตารางที่ 1 ปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์สูตรผงที่ใช้สารพาหะ 6 ชนิด หลังเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิห้อง  $25 \pm 3$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 เดือน

เดือนที่	ปริมาณ <i>Bacillus subtilis</i> (cfus/ml)					
	ปลายข้าว	รำข้าว	ซีโอไลท์	แป้งสาลี	แป้งข้าวโพด	ทัลคัม
0	$6.6 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$8.3 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$	$3.2 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$
1	$2.5 \times 10^7$	$4.2 \times 10^8$	$1.8 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$	$4.9 \times 10^7$	$1.5 \times 10^8$
2	$3.4 \times 10^6$	$1.8 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$	$5.8 \times 10^7$	$5.6 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$
3	$1.9 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$8.3 \times 10^7$	$7.5 \times 10^7$	$2.7 \times 10^8$
4	$3.3 \times 10^6$	$0.8 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$	$7.7 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$
5	$3.3 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$0.8 \times 10^6$	$9.2 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$7.2 \times 10^7$
6	$6.7 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	$8.3 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	$3.0 \times 10^7$
7	$4.7 \times 10^6$	$0.8 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$4.2 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$	$1.9 \times 10^7$
8	$2.33 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$	$8.3 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$	$2.7 \times 10^7$
9	$1.7 \times 10^6$	$4.1 \times 10^5$	$5.8 \times 10^6$	$3.7 \times 10^6$	$6.9 \times 10^6$	$1.25 \times 10^7$
10	$2.0 \times 10^6$	$5.3 \times 10^5$	$8.3 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$
11	$6.3 \times 10^6$	$2.8 \times 10^5$	$3.8 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$	$9.7 \times 10^6$	$5.4 \times 10^7$
12	$5.6 \times 10^6$	$8.9 \times 10^5$	$1.8 \times 10^6$	$8.4 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$2.1 \times 10^7$
13	$1.5 \times 10^6$	$8.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	$6.5 \times 10^6$	$3.2 \times 10^7$
14	$5.0 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5$	$7.5 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$7.8 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7$
15	$4.2 \times 10^6$	$2.0 \times 10^5$	$1.9 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$	$3.8 \times 10^7$

ตารางที่ 2 ปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์สูตรผงที่ใช้สารพาหะ 6 ชนิด หลังเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น  
ช่องธรรมดา อุณหภูมิ  $5 \pm 2$  เซลเซียส เป็นเวลา 15 เดือน

เดือนที่	ปริมาณ <i>Bacillus subtilis</i> (cfus/ml)					
	ปลายข้าว	รำข้าว	ซีโอไลท์	แป้งสาลี	แป้งข้าวโพด	ทัลคัม
0	$6.6 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$8.3 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$	$3.2 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$
1	$1.7 \times 10^7$	$4.2 \times 10^7$	$0.5 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$
2	$2.4 \times 10^7$	$0.8 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$	$6.7 \times 10^7$	$1.7 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$
3	$2.5 \times 10^6$	$0.9 \times 10^6$	$5.9 \times 10^6$	$2.5 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$
4	$2.0 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$0.8 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$
5	$1.7 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$	$5.9 \times 10^6$	$1.9 \times 10^7$	$6.5 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$
6	$6.7 \times 10^6$	$4.2 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$	$4.7 \times 10^7$	$4.4 \times 10^7$
7	$7.5 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$	$9.2 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$5.4 \times 10^7$	$5.8 \times 10^7$
8	$1.9 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$	$6.2 \times 10^7$	$1.7 \times 10^7$
9	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$	$4.3 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$
10	$2.1 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$	$4.1 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$
11	$1.3 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$2.8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$
12	$1.6 \times 10^6$	$6.9 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	$2.7 \times 10^7$	$4.3 \times 10^7$
13	$1.3 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$3.5 \times 10^7$	$3.8 \times 10^7$
14	$2.6 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$5.3 \times 10^6$	$4.0 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$
15	$5.3 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$	$4.3 \times 10^7$

**ตารางที่ 3** เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดคะน้ำสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่พ่นด้วยผลิตภัณฑ์  
 สูตร ผง *Bacillus subtilis* ไอโซเลข 20W1 ที่ใช้สารพา 6 ชนิด ที่ 15 วันหลังการทดสอบ ในสภาพ  
 โรงเรือน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
	15 DAI*
T1 (ปลายข้าว)	1.54 b
T2 (รำข้าว)	2.43 b
T3 (แป้งข้าวโพด)	1.96 b
T4 (แป้งสาลี)	3.77 c
T5 (ซีโอไลท์)	0.06 a
T6 (ทอล์คัม)	0.11a
T7 (C+)	3.82 c
T8 (C-)	0.00 a
<b>CV (%)</b>	<b>29.05</b>

DAI\* = Day after inoculation

**ตารางที่ 4** เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดคะน้ำสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่พ่นด้วยผลิตภัณฑ์  
 สูตร ผง *Bacillus subtilis* ไอโซเลข 20W1 ที่ใช้ทอล์คัมเป็นสารพา อัตรา 20 30 40 และ 50 กรัมต่อน้ำ  
 20 ลิตร ที่ 15 วัน หลังการทดสอบ ในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
	15 DAI
T1 (20 กรัม)	1.98 dc
T2 (30 กรัม)	2.66 d
T3 (40 กรัม)	1.22 cb
T4 (50 กรัม)	1.24 cb
T5 (mancozeb 80% WP)	0.45ba
T6 (C+)	1.87 dc
T7 (C-)	0.00 a
<b>CV (%)</b>	<b>45.0</b>

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการละลาย ของผลิตภัณฑ์สูตรผงที่ใช้ปลายข้าว รำข้าว ซีโอไลท์ แปะงาสาลี แปะง้าวโพด และทัลคัม เป็นสารพา ในน้ำธรรมดา อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ที่อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เวลา 5 10 และ 15 นาที

	อัตราการละลาย		
	5 นาที	10 นาที	15 นาที
ปลายข้าว	++*	++	++
รำข้าว	++	++	++
ซีโอไลท์	++	++	++
แปะงาสาลี	++++	++++	++++
แปะง้าวโพด	+++++	+++++	+++++
ทัลคัม	++++	++++	++++

\* +++++ = การละลายดีมาก ไม่เหลือสารตกตะกอน, ++++ = การละลายดี เหลือสารตกตะกอนประมาณ 1%, +++ = การละลายปานกลาง เหลือสารตกตะกอน ประมาณ 5%, ++ = การละลายไม่ดี เหลือสารตกตะกอนมากกว่า 5%



ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์สูตรผง ของ *Bacillus subtilis* 20W1 ที่ใช้สารพา 6 ชนิด ได้แก่  
ทัลคัม แป้งสาลี รำข้าว (แฉวบน จากซ้ายไปขวา) แป้งข้าวโพด ปลายข้าว ซีโอไลน์  
(แฉวล่างจากซ้ายไปขวา)

### 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาารูปแบบผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* (Bs) สูตรผง เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยการทดสอบสารพาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาปริมาณ Bs พบว่า ถ้าทำการผสมปรุงแต่งแล้วนำไปใช้ทันที พบว่า การใช้ซีโอไลน์เป็นสารพามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงสุด ส่วนการใช้สารทัลคัมเป็นสารพาที่มีความเหมาะสมในการผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี เนื่องจากสามารถรักษาเซลล์ Bs ให้มีปริมาณคงเหลือได้ดีที่สุด ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในพืชได้สูง และการละลายน้ำอยู่ในอัตราที่ดี ซึ่งจะทำให้ไม่มีการตกค้างในถังฉีดเมื่อนำไปพ่นบนพืช นอกจากนี้ทั้งทัลคัมและซีโอไลน์เป็นสารที่หาซื้อง่าย และราคาไม่แพง ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสารพาในการแปรรูปเป็นสารชีวภัณฑ์

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้จัดส่งผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ให้กับศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครพนม นำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคในพืชผักตามโครงการวิจัยทดสอบเทคโนโลยีการผลิตพืชผักปลอดภัย เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตอนบน

2. นักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถนำข้อมูลไปพัฒนาการผลิตสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในเรื่องการป้องกันกำจัดโรคและการเก็บรักษา

## 11. คำขอบคุณ -

## 12. เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. สถิติปริมาณการเพาะปลูกพืชผัก ปีการผลิต 2548/2549. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร. แหล่งที่มา : [http://production.doae.go.th/estimate/report/P2\\_display.php](http://production.doae.go.th/estimate/report/P2_display.php), 15 พฤศจิกายน 2553

กรมอนามัย. 2535. ตารางแสดงคุณค่าโภชนาการของอาหารไทย. หน้า 108. ใน: มหัทศจรย์ผัก. มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล, รัศมี รุติเกียรติพงษ์, อรพรรณ วิเศษสังข์ และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548.

การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 90-105. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธี

ชีวภาพ. หน้า 118-129. ใน: เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย

กลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศและแตงกวา. หน้า 210-211. ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ (บทคัดย่อ) ครั้งที่ 8, 20-22

พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อ. เมือง

จ. พิษณุโลก.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์

*Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 988 -1005 . ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ปฎิมาพร ปลอดภัย,เสมอใจ ชื่นจิตต์ และ วสันต์ เพชรรัตน์. 2551. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ใน

การควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี. หน้า 185-188. ใน: วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39(3) (พิเศษ) : แหล่งที่มา: <http://www.agi.nu.ac.th/proceeding/Oral/3.CO%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%82%E0%>

B8%B2%E0%B8%9E%E0%B8%B7%E0%B8%8A%E0%B8%9C%E0%B8%B1%E0%B8%81/CO  
\_185\_188.pdf, วันที่ 14 พ.ค.2555)

พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2544.

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. หน้า 4-12. ใน:  
วารสารวิชาการเกษตร ม.ค.- เม.ย. 2544, 19(1) .

พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคใบจุด. หน้า 93-94. ใน: คู่มือโรคผัก สำนักวิจัยพัฒนาการ  
อารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และวารภรณ์ สุทธิสา. 2548. การควบคุมโรคใบจุด  
คะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ด้วยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์. หน้า 123-130. ใน:  
การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาพืช.

ไวรุจน์ เดชมหิทธกุล, จันทรจีรา อยู่คง, กนกวรรณ พุ่มพุทรา, แสงชัย เอกประทุมชัย และ  
เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง. 2550. การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis*  
เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. หน้า 251-259. ใน: วารสารวิจัยและพัฒนา มจร.,ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 เมษายน-  
มิถุนายน.

อมรรัตน์ ทศนกิจและมณจันท์ เมฆธน. 2539. การศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภท  
แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ B. subtilis AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชในหนู  
ถีบจักร. หน้า 99-104.ใน : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539 กรุงเทพฯ.

Baker, K.F. and Cook. R. J. 1974. Biological Control of Plant Pathogen. W.H.Freeman,  
San Francisco. 433 p.

Environment Protection Agency . แหล่งที่มา: [WWW.epa.gov/biotech\\_rule/  
pubs/fra/fra009.htm](http://WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm)., 28 พฤศจิกายน 2557

Fiddaman, P. J. and Rossall, S. 1994. Effect of substrate on the production of  
antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*, J. Appl. Bacteriol. 76 (4), 395-405.

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. Biosci. Bioeng. 89: 515-521.

YUN, C., Fang Y. and Jian-hua. G. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus  
Subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes  
mediating biofilm formation, J. Environmental microbiology. Mar 2013 ; 15(3), 848-864