1. ชุดโครงการ แผนงานวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

2. ชื่อโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี
ชื่อกิจกรรม การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช

3. ชื่อการทดลอง การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ไอโซเลท 20W16 หรือ 20W33 เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

Formulation of *Bacillus subtilis* 20W16/20W33 Isolate for Biological Control of *Colletrotrichum gloeosporioides* Fungi causal agent of Chilli Anthracnose Disease

4. คณะผู้ดำเนินงาน:

หัวหน้าการทดลอง: บุษราคัม อุดมศักดิ์
ผู้ร่วมงาน : สุรีย์พร บัวอาจ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ บูรณี พั่ววงษ์แพทย์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ดำเนินการทดลองระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 โดยนำแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Bs) ไอโซเลท 20W 16 ซึ่งผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์รูปเอ็นโดสปอร์ ทั้งสูตรเหลวและสูตรแข็ง (สูตรผงละลายน้ำ) การพัฒนาสูตรเหลวดำเนินการโดยเลี้ยง Bs ในอาหาร 6 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 กากน้ำตาล สูตรที่ 2 กากน้ำตาล + โซเดียมเบนโซเอท 0.05% W/V สูตรที่ 3 กากน้ำตาล +กากถั่วเหลือง สูตรที่ 4 กากน้ำตาล + กากถั่วเหลือง + โซเดียมเบนโซเอท 0.05% W/V สูตรที่ 5 ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา) + กากถั่วเหลือง และสูตรที่ 6 ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา) + กากถั่วเหลือง + โซเดียมเบนโซเอท 0.05% W/V ตรวจนับปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้นและทุกเดือนหลังเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (25$\pm$ 3 องศาเซลเซียส) และ ในตู้เย็นธรรมดาที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า ชีวภัณฑ์ Bs ทั้ง 6 สูตร มีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้นไม่แตกต่างกันคือ 10^8 spores/ml โดยสูตรที่ 3 มีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงสุด คือ 4.9 x 10^8 spores/ml เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 6 เดือน ทุกสูตรมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ลดลงเหลือ 10^7 spores/ml และเมื่อเก็บเป็นเวลา14 เดือน พบว่า ชีวภัณฑ์ทุกสูตรมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ลดลงเหลือเพียง 10^5 spores/ml ผลการทดลองเก็บชีวภัณฑ์ 6 สูตรในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บไว้ 6 เดือน ชีวภัณฑ์ทุกสูตรยังมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงจากปริมาณเริ่มต้นคือ 10^8 spores/ml แต่เมื่อเก็บถึง 14 เดือน ปริมาณลดลงเหลือ 10^5-10^6 spores/ml การพัฒนารูปแบบชีวภัณฑ์ Bs สูตรแข็ง รูปผงละลายน้ำ 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ใช้ ทัลคัม ซีโอไลท์ แคลเซียมคาร์บอเนต Kaolin (ดินขาว) และภูไมท์ซัลเฟต เป็นสารพา พบว่า สูตรที่ 1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพามีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์สูงสุด

คือ 1.7 x 10^8 spores/ml และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรที่ใช้ทัลคัมและสูตรที่ใช้เกาลีน ยังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 10^7 spores/ml แต่เมื่อเก็บไว้ 14 เดือนพบว่าทุกสูตรมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ลดลงเหลือเพียง 10^5 spores/ml การทดสอบการเก็บในตู้เย็น พบว่า ปริมาณเอ็นโดสปอร์ในทุกสูตรจะคงที่จนถึงเดือนที่ 6 และเริ่มลดลงหลังเก็บเป็นเวลา 8 เดือน และเมื่อเก็บถึง 14 เดือน ปริมาณเอ็นโดสปอร์จะลดลงเหลือเพียง 10^3-10^5 spores/ml การทดสอบการละลายในน้ำธรรมดาพบว่า สูตรเกาลินมีการละลายดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ สูตรทัลคัมและสูตรแคลเซี่ยมคาร์บอเนตตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ในแปลงปลูก ดำเนินการทดลอง ที่ อ.ท่ามะกา และ อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ผลการทดลองพบว่า ที่ อ.ท่ามะกา หลังพ่นชีวภัณฑ์ Bs 3 ครั้ง ทุกกรรมวิธีที่พ่นชีวภัณฑ์สูตรเหลว (T1-T4) และสาร mancozeb มีการเกิดโรคระหว่าง 29.25-48.86% ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่ากับกรรมวิธีที่ไม่พ่นชีวภัณฑ์Bs (T9 และT10) ซึ่งมีการเกิดโรคเท่ากับ 89.25 และ 86.63 % ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับสูตรผง (T5-T7) พบว่า ชีวภัณฑ์ Bs20W16 สูตรที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพา(T5) มีการเกิดโรคต่ำสุดและไม่แตกต่างทางสถิติกับสารmancozeb ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองแปลงที่ 2 ที่ อ.ท่าม่วง พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นชีวภัณฑ์Bs และพ่นสารmancozeb มีการเกิดโรคระหว่าง 8.12- 15.87% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่พ่นชีวภัณฑ์Bs ซึ่งมีการเกิดโรคเท่ากับ 48.00 และ 49.75% ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำหลัก : บาซิลลัส ซับทิลิส พริก โรคแอนแทรคโนส เอ็นโดสปอร์

รหัสการทดลอง 03-05-59-02-02-00-01-59

Abstract

Formulation of *Bacillus subtilis* for biological control of *Colletrotrichum gloeosporioides* fungi causal agent of chilli anthracnose disease, experiment was conducted during 2016-18, the process of formulating was aim to formulate *Bacillus subtilis* 20W16 to commercially bioproducts both liquid solution and wettable powder formulation. About liquid formulalating process, *B. subtilis* 20W16 be cultured in 6 types of amendment, there were cane molasses 20 ml/1 litre of water, cane molasses + sodium benzoate 0.05% W/V, cane molasses + soybean meal +K_2HPO_4 0.5 %W/V, cane molasses+ soybean meal+sodium benzoate 0.05% W/V, fish fertilizer + soybean meal and fish fertilizer + soybean meal + Sodium benzoate 0.05% W/V. The bioproducts be maintained at laboratory room temperature (25 $\pm$ 3 °C) and in fridge condition (18 °C). Endospore of Bs in all bioproducts be counted by dilution plate technique on potato sucrose agar medium and viability cell of bacteria be assessed every month. The results showed that endospores of all liquid bioproducts were 10^8 spores/ml but the bioproduct with cane molasses + soybean meal +K_2HPO_4 0.5 %W/V showed the highest number of Bs spore was 4.9 x 10^8 cfu/ml. After 6 and

14 months preservation in laboratory room temperature the number of endospores of all liquid bioproducts reduced to 10^5-10^7 spores/ml. In the fridge condition preservation, the result showed that after 6 monts the number of endospores all of them did not reduce from fresh product (10^8 spores/ml) but after 14 months preservation, the number of endospores reduced to 10^5-10^6spores/ml. Formulation of Bs wettable bioproduct by using talcum zeolite calcium carbonate kaolin and phumai sulfate as carriers showed that products which were using talcum carrier showed the highest number of endospores in fresh product which was 1.7 x10^8 spores/ml. After 6 months preservation at laboratory room temperature, the endospores in products with talcum and kaolin carriers slowly reduced to 10^7 spores/ml. After 14 months preservation the endospores of all products reduced to 10^5 spores/ml. At fridge condition,the number of endospores in all products were stable until 8 months preservation but reduced to 10^3-10^5 spores/ml after 14 monts preservation. Testing of water soluble of wettable powder bioproducts found that the bioproduct with kaolin talcum and calcium carbonate as carrier showed good solubility. Efficacy trials of all bioproducts were then tested for the disease control at Tha Ma Kha and Tha Muang District, Kanchanaburi Province. The results revealed that, after 3 times application, at Tha Ma Kha District, the percentage of disease Incidences which were sprayed with liquid bioproduct and mancozeb were 29.25-48.86 showed significantly control the disease better than non sprayed treatment (T9 and T10) which the percentage of disease were 89.25 and 86.63 %, respectively. Bs 20w16 wettable powder bioproducts with talcum showed the best disease control and same level as mancozeb sprayed, the result was consistent with Tha Muang experiment which revealed that bioproducts and mancozeb application treatments showed disease incidences were 8.12-15.87, significantly control the disease better than non application treatment which showed 48.00 and 49.75% of disease incidence.
Keywords: *Colletrotrichum gloeosporioides, Bacillus subtilis,* bioproduct

6. คำนำ

โรคแอนแทรคโนสของพริก นับว่าเป็นโรคที่สำคัญของเกษตรกรผู้ปลูกพริกเป็นอย่างมาก โรคนี้เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum* sp. ที่พบเข้าทำลายพริกก็มีอยู่ 3 ชนิดด้วยกัน *C. gloespoloides* C. capcisi และ *C. piperatum* ผลพริกที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลายจะมีอาการตามชนิดของเชื้อรา โดยปกติในพริกผลใหญ่เชื้อราสาเหตุที่เข้าทำลายคือ *C. gloespoloides* อาการของโรคมักพบบนผลพริกที่เริ่มสุก หรือระยะก่อนที่ผลพริกจะเปลี่ยนสี อาการเริ่มแรกจะประกฏเป็นวงกลมซ้ำสีน้ำตาล เนื่อเยื่อบุ๋มลึกลงไปจากระดับเดิมเล็กน้อย และจะค่อย ๆ ขยายกว้างออกไปเป็นวงกลมหรือวงรีรูปไข่ ซึ่งมองเห็นลักษณะของเชื้อราที่เจริญ

ภายใต้เนื้อเยื่อของพืชขยายออกไปในลักษณะที่เป็นวงกลมสีดำซ้อนกันเป็นชั้น เมื่อมีความชื้นจะเห็นเป็นเมือกเยิ้มสีส้มอ่อน ๆ บริเวณแผลบนผลพริก ทำให้แผลขยายตัวและผลพริกจะเน่าและร่วงก่อนเก็บเกี่ยว ผลพริกนี้เมื่อนำไปตากแห้งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีด โดยโรคนี้มักระบาดมากในสภาพความชื้นสูง โดยเฉพาะในช่วงที่พริกกำลังให้ผลผลิต และเชื้อราสามารถติดไปกับเมล็ด (ศิริพงษ์ และพรพิมล, 2554) เกษตรกรส่วนใหญ่มักเลือกใช้วิธีการควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และได้ผลรวดเร็ว ซึ่งผลจากการใช้สารเคมีที่ไม่ถูกวิธี หรือใช้มากจนเกินไป ส่งผลเสียตามมาหลายประการ เช่น เกิดการดื้อยาของเชื้อโรค มีสารตกค้างในผลิตผล ตลอดจนเกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในสภาพธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เกิดผลเสียโดยตรงต่อผู้ใช้ได้แก่ตัวเกษตรกรเองและผู้บริโภค นอกจากนี้โดยทางอ้อม ส่งผลถึงการกีดกันทางการค้าเนื่องมาจากภายใต้เงื่อนไขข้อตกลงขององค์การการค้าโลก (WTO) สินค้าทางการเกษตรที่จะส่งไปขายยังประเทศคู่ค้าจะต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้น การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมโรคพืชทั้งในปัจจุบันและอนาคต เพื่อลดปัญหาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชดังกล่าวที่นับวันจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศ ที่จะนำจุลินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า “ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) “ ในธรรมชาติมาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และในปัจจุบันก็เป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปเป็นกลยุทธ์ป้องกันกำจัดโรคพืช เนื่องจากมีการนำไปใช้อย่างได้ผลดีและสามารถพัฒนาเป็นการค้าได้หลายชนิด

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่ว ๆ ไป ในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ ฯลฯ แบคทีเรียนี้สามารถหลั่งสารประกอบต่างๆ ที่สร้างขึ้นออกสู่ภายนอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แบคทีเรียนี้เพียงไม่กี่ Species ที่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับคน ส่วนใหญ่มีความปลอดภัย แบคทีเรียนี้เป็น aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมเพื่อการอยู่รอด 1 spore ใน 1 เซลล์เท่านั้น พบมีตามดินในสภาพในสภาพแวดล้อมต่างๆ แบคทีเรียจำพวกนี้พบได้ทั่วไปในดิน เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลาย ของซากพืชและซากอื่นๆ แบคทีเรียจำพวกนี้สร้างและหลั่งเอนไซม์จำพวก carbohydrase และ protease ออกนอกเซลล์ได้หลายชนิด

ณัฏฐิมาและคณะ (2548) ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากดิน, รากพืชและปุ๋ยคอก ได้จำนวน 525 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า มี 4 ไอโซเลทที่สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ประมาณ 70-100%

บุษราคัม และ ณัฏฐิมา (2550) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ จำนวน 80 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกบนผลพริก พบว่ามี 13 ไอโซเลท ได้แก่ 17G18 20W33 2G7 20W16 20W1 20W8 20W5 1G8 2G23 22W8 19W36 22W10 และ 20W3 ที่สามารถควบคุมการเกิดโรคบนผลพริกได้ โดยไอโซเลท 20W16 22W8 และ 1G8 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคสูงสุด

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 เปรียบเทียบอย่างนัยสำคัญทางสถิติซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคสูงถึง 65.46 เปอร์เซ็นต์

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

B. subtilis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และมีการสร้างสปอร์ที่ทนทานกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell) จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย และกากน้ำตาลได้ ส่วนเกลือแร่ต่างๆมักต้องการในปริมาณน้อย การเติมเกลือแร่บางชนิด เช่น แคลเซียมและแมงกานิส จะเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ได้ โดยไวรุจน์ และคณะ (2550) ได้รายงานไว้ว่า ในการผลิตสปอร์ของ *B. subtilis* นั้น สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตได้ดี แต่อาจเกิดปัญหาเรื่องฟองในการผลิตระดับใหญ่ กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสม และบุษราคัมและคณะ (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*

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุทางการเกษตร เช่น กากน้ำตาล กากถั่วเหลือง ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา)
2. แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท 20W16 และ 20W33
3. สารเคมีในห้องปฏิบัติการ เช่น โซเดียมเบนโซเอท K_2HPO_4
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PSA
5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง จานเลี้ยงเชื้อ เข็มเขี่ย เป็นต้น

วิธีการ

1. ศึกษาการผสมปรุงแต่งผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* สูตรเหลว (ปีพ.ศ. 2559)

มี 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 4 ฟาสก์ขนาด 250 ม.ล.) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรที่ 1 กากน้ำตาล (cane molasses) 20 มล. (grams) ต่อน้ำ 1 ลิตร (litre of water)

กรรมวิธีที่ 2 สูตรที่ 2 กากน้ำตาล (cane molasses) 20 กรัม (grams) ต่อน้ำ 1 ลิตร (litre of water) + โซเดียมเบนโซเอท (Sodium benzoate) 0.05% W/V

กรรมวิธีที่ 3 สูตรที่ 3 กากน้ำตาล (cane molasses) + กากถั่วเหลือง (soybean meal) อัตรา 1: 1 + ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.5 %W/V

กรรมวิธีที่ 4 สูตรที่ 4 กากน้ำตาล (cane molasses) + กากถั่วเหลือง (soybean meal) อัตรา 1: 1 + โซเดียมเบนโซเอท (Sodium benzoate) 0.05% W/V

กรรมวิธีที่ 5 สูตรที่ 5 ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา: fish fertilizer) + กากถั่วเหลือง (soybean meal) อัตรา 1: 1

กรรมวิธีที่ 6 สูตรที่ 6 ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา: fish fertilizer) + กากถั่วเหลือง (soybean meal) อัตรา 1: 1 + โซเดียมเบนโซเอท (Sodium benzoate) 0.05% W/V

ทุกกรรมวิธีเติมน้ำเปล่าจนครบ 1 ลิตร

ปฏิบัติการทดลอง ดังนี้

1. เลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis*ในอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 24 ช.ม. จากนั้นย้ายเชื้อลงในอาหารเหลว PSB 1 ลูปต่ออาหาร 250 ม.ล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ช.ม. เพื่อทำเป็น inoculums
2. เมื่อครบกำหนดแล้ว ย้ายเชื้อจาก Inoculum ลงในอาหารสูตรต่างๆ ทั้ง 6 กรรมวิธี ปริมาณ 10% โดยปริมาตร
3. เติม $Cacl_2.2H_2O$ 0.65 กรัม/ลิตร และ $MnSO_4 . 2H_2O$ 0.15 กรัม/ลิตร ลงในอาหารสูตรต่างๆ เพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ (ไวรุจน์ และคณะ, 2550)
4. เติมยูเรียปริมาณ 1 กรัม/ลิตร ลงไปในอาหารทุกสูตร
5. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน
6. จากนั้นแบ่งเก็บไว้ 2 แหล่ง คือ เก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ (25$\pm$ 3° C) และ ในตู้เย็นธรรมดาที่ 18 องศาเซลเซียส
7. ตรวจเช็คการมีชีวิตรอด (Viability) ของเซลล์ *B. subtilis* ในผลิตภัณฑ์ โดยตรวจนับปริมาณเซลล์จากเดือนเริ่มต้นและทุกๆ เดือน โดยวิธี dilution plate techniqueและนับความเข้มข้นของสปอร์ โดยแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (ไวรุจน์ และคณะ ,2550) หรือที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชม. เพื่อฆ่าเซลล์ปกติ และเหนี่ยวนำให้สปอร์งอกก่อนโดย

การย้ายลงอาหาร PSB เขย่าเป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA โดยวิธี dilution plate technique

2. ศึกษาการผสมปรุงแต่งผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* สูตรแข็ง (ปีพ.ศ. 2560)

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 4 ขวดฝาเกลียวขนาด 300 กรัม) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรผง ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพา

กรรมวิธีที่ 2 สูตรผง ที่ใช้ซีโอไลท์ เป็นสารพา

กรรมวิธีที่ 3 สูตรผงที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารพา

กรรมวิธีที่ 4 สูตรผงที่ใช้ Kaolin (ดินขาว)เป็นสารพา

กรรมวิธีที่ 5 สูตรผงที่ใช้ ภูไมท์ซัลเฟตเป็นสารพา

ปฏิบัติการทดลอง ดังนี้

<u>การเตรียมสูตรผง</u>

1. เลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอาหารเหลวสูตรกากน้ำตาล +กากถั่วเหลือง + K_2HPO_4 0.5 %W/V
2. เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลว (ข้อ1) อัตรา 10 % ของปริมาตร
3. เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงในสารละลาย (ข้อ1.2)
4. เติมสารพาลงไป 2 เท่า คนให้เข้ากัน
5. นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) หรือ อบด้วย Hot air oven ที่อุณหภูมิ เก็บในถุงพลาสติกใส หรือขวดแก้ว ปิดปาก เก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ (25$\pm$ 3° องศาเซลเซียส) และ ในตู้เย็นธรรมดาที่ 18 องศาเซลเซียส

<u>การทดสอบการละลาย</u>

นำชีวภัณฑ์ทุกสูตรมาทดสอบการละลายโดยชั่งสารปริมาณ 0.2 กรัม ใส่ลงในน้ำ 100 มล. เขย่าในทิศทางเดียวกัน 20 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ 15 นาที เขย่าเช่นเดิม ให้คะแนนการละลาย โดยดูการตกตะกอนในน้ำ

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ในระดับแปลงปลูก (ปีพ.ศ. 2561)

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ มี 10 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W16 สูตรเหลว 1* อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W16 สูตรเหลว 6* อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W33 สูตรเหลว 1* อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W33 สูตรเหลว 6* อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W16 สูตรผง** อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W33 สูตรผง** อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W33 สูตรผง(เชื้อสด) *** อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย mancozeb 80% WP อัตรา 48 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 9 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)

กรรมวิธีที่ 10 ไม่พ่นสาร

*สูตรเหลว 1 : กากน้ำตาล , สูตรเหลว 6 : ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา) + กากถั่วเหลือง + โซเดียมเบนโซเอท 0.05% W/V

** สูตรผง รูปเอ็นโดสปอร์ ที่ใช้สารทัลคัมเป็นสารพา

*** สูตรผง รูปเซลล์ ใช้เกาลินเป็นสารพา

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

<u>การเตรียมพืชและแปลงทดลอง</u>

- เตรียมแปลงขนาดกว้าง 1.5 เมตร ยาว 6 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงประมาณ 80 เซนติเมตร

-ปลูกพริกขี้หนูพันธุ์จินดาที่จะทดสอบโดยวิธีการย้ายกล้า ระยะระหว่างแถวประมาณ 50 ซ.ม. ระหว่างต้น 50 ซ.ม. ปลูก 2 แถวคู่ จนกระทั่งพริกมีอายุประมาณ 30-45 วัน หรือระยะเริ่มติดผล จึงเริ่มดำเนินการทดลอง

<u>การดำเนินการทดลอง</u>

ทำการพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ตามกรรมวิธีต่างๆ 3-5 ครั้ง ในระยะพริกเริ่มติดผล ทุกๆ 5 วัน โดยมีกรรมวิธีพ่นสารเคมี mancozeb 80% WP และกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

บันทึกผลการทดลอง โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยเก็บผลพริกในระยะเก็บเกี่ยวทั้งหมด นำมาตรวจผลโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเปรียบเทียบกับผลพริกทั้งหมด

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

นำข้อมูลค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Analysis of variance เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

เวลาและสถานที่

<u>เริ่มต้น</u>: ตุลาคม พ.ศ. 2558 <u>สิ้นสุด</u> 30 กันยายน พ.ศ. 2561

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>: กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเกษตรกร จ. กาญจนบุรี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ปี พ.ศ. 2559

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W16 สูตรเหลว ผลการทดลองพบว่า ชีวภัณฑ์ทั้ง 6 สูตร มีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้นไม่แตกต่างกันคือ 10^8 spores/ml โดยสูตรที่ 3 กากน้ำตาล (cane molasses) +

กากถั่วเหลือง (soybean meal) อัตรา 1: 1 + ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.5 %W/V มีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงสุด คือ 4.9 x 10^8 spores/ml เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (25± 3° C) เป็นเวลา 6 เดือน ทุกสูตรมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ลดลงเหลือ 10^7 spores/ml และเมื่อเก็บเป็นเวลา14 เดือน พบว่า ชีวภัณฑ์ทุกสูรตมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ลดลงเหลือ 10^5 spores/ml (Table1 และFigure 1)

ผลการทดลองเก็บชีวภัณฑ์ 6 สูตรในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บไว้ 6 เดือน ชีวภัณฑ์ทุกสูตรยังมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงจากปริมาณเริ่มต้นคือ 10^8 spores/ml แต่เมื่อเก็บถึง 14 เดือน ปริมาณลดลงเหลือ 10^5 spores/ml ทุกสูตร ยกเว้น สูตรที่ 6 สูตรปลาหมัก (ปุ๋ยปลา: fish fertilizer) + กากถั่วเหลือง (soybean meal) อัตรา 1: 1 + โซเดียมเบนโซเอท (Sodium benzoate) 0.05% W/V ปริมาณเอ็นโดสปอร์ลดลงเหลือ 10^6 spores/ml (Table 2 และFigure 1)

ปีพ.ศ. 2560

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W16 สูตรแข็ง ได้ชีวภัณฑ์สูตรแข็ง ในรูปผงละลายน้ำ 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ใช้ ทัลคัม ซีโอไลท์ แคลเซียมคาร์บอเนต Kaolin (ดินขาว) และภูไมท์ซัลเฟต เป็นสารพา ชุดที่1 โดยพบว่า สูตรที่ 1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพามีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์สูงสุดคือ 1.7 x 10^8 spores/ml และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรที่ 1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพา และสูตรที่ใช้เกาลีน ยังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 10^7 spores/ml แต่เมื่อเก็บไว้ 14 เดือนพบว่า ทุกสูตรมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ลดลงเหลือเพียง 10^5 spores/ml (Table 3 และFigure 2)

การทดลองชุดที่ 2 เมื่อเก็บในตู้เย็น พบว่าสูตรที่ใช้ทัลคัมมีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้นสูงสุดเท่ากับ 3.4 x 10^7 spores/ml ปริมาณเอ็นโสปอร์ในทุกสูตรจะคงที่จนถึงเดือนที่ 8 ปริมาณเอ็นโดสปอร์จะลดลงทุกสูตรคงเหลือ 10^4-10^6 spores/ml และเมื่อเก็บถึง 14 เดือน ปริมาณเอ็นโดสปอร์จะลดลงเหลือ 10^3-10^5 spores/ml (Table 4 และFigure 2)

ผลการทดสอบการละลาย เมื่อเปรียบเทียบการละลายในน้ำธรรมดาพบว่า สูตรเกาลินมีการละลายดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ สูตรทัลคัมและสูตรแคลเซี่ยมคาร์บอเนต แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาชีวภัณฑ์ พบว่า สูตรที่ใช้ทัลคัมมีราคาต่ำสุดคือประมาณ 130 บาท รองลงมาคือสูตรเกาลิน เท่ากับ 165 บาทต่อกิโลกรัม (Table 5)

จากผลการทดลองนี้ จะนำเอาชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพดี มีความเหมาะสม คือการละลายน้ำและวัสดุมีราคาไม่แพง ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกต่อไป

ปี พ.ศ. 2561

<u>ผลการทดลองแปลงที่ 1</u> ดำเนินการทดลอง ที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี

จากผลการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสพริก ก่อนพ่นสาร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค อยู่ระหว่าง 32.48 – 48.86 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพ่น Bs ไป 3 ครั้ง พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการพ่น Bs มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนส ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bs (T9 และ T10) โดยกรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย mancozeb 80% WP อัตรา 48 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุด เท่ากับ 18.13 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W16 สูตรผงรูปเซลล์ ใช้เกาลินเป็นสารพา อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis*

20W33 สูตรเหลว 6*อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตรกรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W16 สูตรเหลว 1* อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร และกรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* 20W33 สูตรเหลว 1*อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 18.75 23.00 24.38 และ 25.87 โดยที่กรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bs (กรรมวิธี ที่ 9 และ 10) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 89.25 และ 86.63 ตามลำดับ (Table 6)

<u>ผลการทดลองแปลงที่ 2</u> แปลงที่ 2 ดำเนินการทดลอง ที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี

จากผลการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสพริก ก่อนพ่นสาร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค อยู่ระหว่าง 19.38 – 46.75 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพ่น Bs ไป 3 ครั้ง พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการพ่น Bs มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนส ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bs (T9 และ T10) โดยกรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย mancozeb 80% WP อัตรา 48 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุด เท่ากับ 8.12 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับทุกกรรมวิธีที่พ่น Bs (กรรมวิธีที่ 1-7) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 12.50 13.87 13.50 13.00 10.50 11.87 และ15.87 โดยที่กรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bs (กรรมวิธี ที่ 9 และ 10) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ ตามลำดับ 48.00 และ 49.75 (Table 7)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า ในการผลิตชีวภัณฑ์ Bs สูตรเหลวทั้ง 6 สูตร มีปริมาณอ็นโดสปอร์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์ที่ปรุงแต่งไม่แตกต่างกันคือ 10^8 spores/ml หลังการเก็บรักษาชีวภัณฑ์เหลวในสภาพอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (25$\pm$ 3° C) เป็นเวลาเกิน 3 เดือน ปริมาณเอ็นโสปอร์ในผลิตภัณฑ์จะเริ่มลดลง และลดลงต่ำสุดเหลือ 10^5 spores/ml เมื่อเก็บเป็นเวลา 14 เดือน สำหรับการเก็บในสภาพอุณหภมิต่ำ (ตู้เย็นธรรมดา 18 องศาเซลเซียส) ปริมาณเอ็นโดสปอร์จะเริ่มลดลงหลังการเก็บเกิน 6 เดือน โดยสูตรที่ 1 3 4 และ 5 สามารถเก็บได้ถึง 8 เดือน ทั้งนี้เมื่อเก็บถึง 14 เดือน ชีวภัณฑ์ทุกสูตรจะมีปริมาณเอ็นโสปอร์ลดลงเหลือ 10^5 spores/ml

ดังนั้นชีวภัณฑ์สูตรเหลวควรเก็บในสภาพเย็นจะช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์ได้ และสูตรที่น่าจะแนะนำให้เกษตรกรนำไปทดลองใช้ควรเป็นสูตรที่หาวัสดุได้ง่าย ราคาไม่แพง ได้แก่ สูตรที่ใช้กากน้ำตาลเป็นส่วนผสม

การพัฒนารูปแบบชีวภัณฑ์สูตรผงละลายน้ำ พบว่า การใช้สารทัลคัมและเกาลินเป็นสารพาที่เหมาะสมในการนำมาเป็นวัตถุดิบผลิตชีวภัณฑ์สูตรผงละลายน้ำ เนื่องจากมีปริมาณ Bs ในชีวภัณฑ์สูง เก็บรักษาปริมาณเซลล์ให้อยู่รอดได้ดีเมื่อเก็บชีวภัณฑ์เป็นเวลา 8 เดือน และมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคในแปลงปลูก ทั้งนี้แปลงที่มีการระบาดของโรคกุ้งแห้งรุนแรง ชีวภัณฑ์สูตรผงที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพาจะมีประสิทธิภาพสูงสุด และมีข้อดีคือมีราคาถูกที่สุด โดยเมื่อนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์คิดเป็นต้นทุนประมาณ 130 บาทต่อกิโลกรัม แต่ข้อเสีย คือ การละลายน้ำ การกระจายตัวและการติดยึดบนพืชน้อยกว่าการใช้สารเกาลินเป็นสารพา ดังนั้นในแปลงที่มีความชื้นสูง ควรเติมสารจับใบเพื่อช่วยในการเกาะยึดบนพืชลงไปก่อนการพ่นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ เนื่องจากจะช่วยให้ชีวภัณฑ์กระจายตัวและติดยึดบนพืชได้ดีขึ้น สำหรับแปลงพืช

อินทรีย์ที่ไม่สามารถเติมสารจับใบได้ การใช้สารเกาลินเป็นสารพาจะมีความเหมาะสมกว่าทัลคัมเนื่องจากมีความละเอียดสามารถกระจายตัวและติดยึดบนพืชได้ดี

ชีวภัณฑ์ Bs สูตรผงละลายน้ำ สามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่า 75 % การพ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรเหลวสูตรที่ใช้กากน้ำตาลสามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่า70% เมื่อพ่นเมื่อเริ่มพบโรคระบาดในแปลงปลูก จำนวน 3 ครั้ง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาเป็นต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์บีเอส เพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดโรคกุ้งแห้งพริก หรือ ในโรคพืชอื่นๆ

2. นักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้กับการพัฒนาชีวภัณฑ์อื่น ทางด้านชีววิธีป้องกันกำจัดโรคพืชอื่นๆ ได้

3. เกษตรกรนำไปปรับใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์บีเอสควบคุมโรคพืช เพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

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

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช : ศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ. หน้า 896-913. *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 988 -1005 . *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พากเพียร อรัญนารถ นงรัตน์ นิลพานิชย์ วิชิต ศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2544. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว.*วารสารวิชาการเกษตร*.ม.ค.- เม.ย. 2544, 19(1) : 4-12

ศิริพงษ์ คุ้มภัย และพรพิมล อธิปัญญาคม.2554. โรคแอนแทรคโนสพริก. หน้า 3-4. *ใน: คู่มือ*

โรคผักและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อมรรัตน์ ทัศนกิจและมณจันทร์ เมฆธน. 2539. การศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย*Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ B. subtilis AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชในหนูถีบจักร. หน้า 99-104. *ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34.* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ.

Table 1 The survival of *Bacillus subtilis* 20W16 in 6 types of liquid solution bioproducts, after 14 months preservation at 25± 3° C temperature.

	number of *Bacillus subtilis* colonies (spores/ml)					
	0	1	3	6	8	14
cane molasses	3.0×10^8	5.0×10^7	3.4×10^8	6.0×10^7	1.6×10^7	3.7×10^5
cane molasses + sodium benzoate 0.05% W/V	1.0×10^8	4.5×10^8	1.8×10^8	5.0×10^7	4.8×10^7	4.0×10^5
cane molasses +soybean meal + K_2HPO_4 0.5 %W/V	4.9×10^8	5.6×10^7	1.0×10^8	3.5×10^7	1.7×10^6	6.2×10^5
cane molasses + soybean meal + Sodium benzoate 0.05% W/V	1.4×10^8	7.0×10^8	1.2×10^8	2.1×10^7	6.6×10^7	1.8×10^5
fish fertilizer + soybean meal	1.3×10^8	5.0×10^7	2.6×10^8	1.6×10^7	8.3×10^6	4.7×10^5
fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate 0.05% W/V	4.5×10^8	7.5×10^8	1.4×10^8	1.6×10^7	8.1×10^7	6.1×10^5

Table 2 The survival of *Bacillus subtilis* 20W16 in 6 types of liquid solution bioproducts, after 14 months preservation at 18^0 C temperature.

	number of *Bacillus subtilis* colonies (spores/ml)					
	0	1	3	6	8	14
cane molasses	3.0×10^8	1.0×10^8	6.6×10^8	3.1×10^8	1.3×10^8	5.7×10^5
cane molasses + sodium benzoate 0.05% W/V	9.0×10^8	2.0×10^8	8.3×10^8	1.3×10^8	3.3×10^7	8.0×10^5
cane molasses +soybean meal + K_2HPO_4 0.5 %W/V	4.9×10^8	4.0×10^8	3.4×10^8	1.2×10^8	1.3×10^8	5.5×10^5
cane molasses + soybean meal + Sodium benzoate 0.05% W/V	1.4×10^8	3.5×10^8	2.1×10^8	4.5×10^8	1.5×10^8	4.8×10^5
fish fertilizer + soybean meal	1.3×10^8	4.5×10^8	6.6×10^8	4.1×10^8	8.3×10^7	1.3×10^5
fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate 0.05% W/V	4.5×10^8	1.0×10^8	5.1×10^8	5.0×10^8	1.1×10^8	1.0×10^6

Table3 The survival of *Bacillus subtilis* 20W16 in 5 types of wettable powder bioproducts , after 14 months preservation at 25± 3° C temperature.

Treatments	number of *Bacillus subtilis* colonies (spores/ml)					
	0 month	1 month	3 months	6 months	8 months	14 months
talcum	1.7×10^{8}a[1/]	2.7×10^{8}a	1.8×10^{7}a	3.0×10^{7}	1.2×10^{7}	5.0×10^{5}
zeolite	5.0×10^{7}b	3.8×10^{7}b	7.3×10^{6}b	1.1×10^{6}	2.9×10^{6}	6.7×10^{5}
calcium carbonate	5.5×10^{7}b	5.7×10^{7}b	1.7×10^{7} ab	1.7×10^{6}	1.5×10^{6}	8.6×10^{5}
kaolin	3.5×10^{7}b	2.5×10^{7}b	9.6×10^{6} ab	1.0×10^{7}	1.0×10^{7}	2.5×10^{5}
phumai sulfate	1.4×10^{7}b	3.5×10^{7}b	3.9×10^{6}b	1.5×10^{6}	6.7×10^{6}	3.8×10^{5}
CV (%)	38.25	62.77	49.15	-	-	-

[1/]Means followed by a common letter(s) in the same column are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 4 The survival of *Bacillus subtilis* 20W16 in 5 types of wettable powder bioproducts, after 14 months preservation at 18 ^{0}C temperature.

Treatments	number of *Bacillus subtilis* colonies (spores/ml)					
	0 month	1 month	3 months	6 months	8 months	14 months
talcum	3.4×10^{7}a[1/]	3.0×10^{7}a	7.4×10^{7}	6.4×10^{7}	4.5×10^{6}	1.5×10^{5}
zeolite	9.4×10^{6}b	8.5×10^{6}b	2.2×10^{6}	5.6×10^{6}	2.9×10^{5}	1.2×10^{4}
calcium carbonate	9.7×10^{6}b	8.9×10^{6}b	2.5×10^{6}	2.6×10^{6}	1.5×10^{5}	3.3×10^{3}
kaolin	8.3×10^{6}b	7.9×10^{6}b	1.4×10^{6}	5.5×10^{6}	2.7×10^{5}	1.0×10^{4}
phumai sulfate	3.4×10^{6}b	3.4×10^{6}b	4.2×10^{5}	1.8×10^{6}	6.7×10^{4}	1.7×10^{3}
CV (%)	39.25	74.56	-	-	-	-

[1/]Means followed by a common letter(s) in the same column are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 5 The solubility of five bioproducts wettable powder formulation in water and their unit cost.

Treatments	**Dissolve in water** (15 mins)	Unit Cost (Baht)
talcum	++++*	130
zeolite	++	170
calcium carbonate	++++	170
kaolin	+++++	165
phumai sulfate	+++	150

* +++++ = excellent: completely solubility, ++++ = good: have 1% precipitate, +++= medium : have 5% precipitate, ++ = bad: have more than 5% precipitate

Table 6 Anthracnose disease incidences (%) on chilli fruits after15 days sprayed with Bs bioproducts under field condition at Tha Ma Kha district, Kanchanaburi province.

Treatments	**Disease Incidences (%)**			
	BA*	**5DAA1**	**10DAA1**	**15DAA1**
T1: Bs20W16 with cane molasses	48.86	49.50 a[1/]	26.38 a	24.38 ba
T2: Bs 20W16 with fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate	40.40	59.38 a	28.75 a	32.38 b
T3: Bs 20W33 with cane molasses	48.34	38.88 a	31.38 a	25.87 ba
T4: Bs 20W33 with fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate	37.25	45.00 a	21.63 a	23.00 ba
T5: Bs 20W16 with talcum carrier	34.66	44.88 a	34.25 a	18.75 a
T6: Bs 20W33 carrier with talcum	45.57	56.75 a	35.38 a	31.13 b
T7: Bs 20W33 with kaolin	37.32	47.13 a	26.50 a	32.13 b
T8: mancozeb	29.25	47.88	31.75 a	18.13 a

T9: inoculated	32.48	81.25 b	75.50 b	89.25 c
T10: Water sprayed	33.67	85.50 b	73.88 b	86.63 c
CV (%)	**27.46**	**23.03**	**26.56**	**16.35**

[1/]Means followed by a common letter(s) in the same column are not significantly different at 5% level by DMRT

* BA is before application

Table 7 Anthracnose disease incidences (%) on chilli fruits after15 days sprayed with Bs bioproducts under field condition at Tha Muang district, Kanchanaburi province.

Treatments	Disease Incidences (%)			
	BA*	5DAA1	10DAA1	15DAA1
T1: Bs20W16 with cane molasses	35.75	35.33 a[1/]	26.66 a	12.50 a
T2: Bs 20W16 with fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate	24.25	30.91 a	20.78 a	13.87 a
T3: Bs 20W33 with cane molasses	30.25	27.98 a	24.94 a	13.50 a
T4: Bs 20W33 with fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate	19.38	28.10 a	24.13 a	13.00 a
T5: Bs 20W16 with talcum carrier	33.65	27.87 a	23.33 a	10.50 a
T6: Bs 20W33 carrier with talcum	38.25	29.49 a	25.00 a	11.87 a
T7: Bs 20W33 with kaolin	21.25	35.83 a	31.11 a	15.87 a
T8: mancozeb	21.00	16.67 a	11.75 a	8.12 a
T1: Bs20W16 with cane molasses	46.75	67.03 b	66.36 b	48.00 b
T2: Bs 20W16 with fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate	37.24	**83.39 b**	76.46 b	49.75 b
CV (%)	**46.71**	**33.68**	**44.53**	**28.41**

[1/]Means followed by a common letter(s) in the same column are not significantly different at 5% level by DMRT

* BA is before application

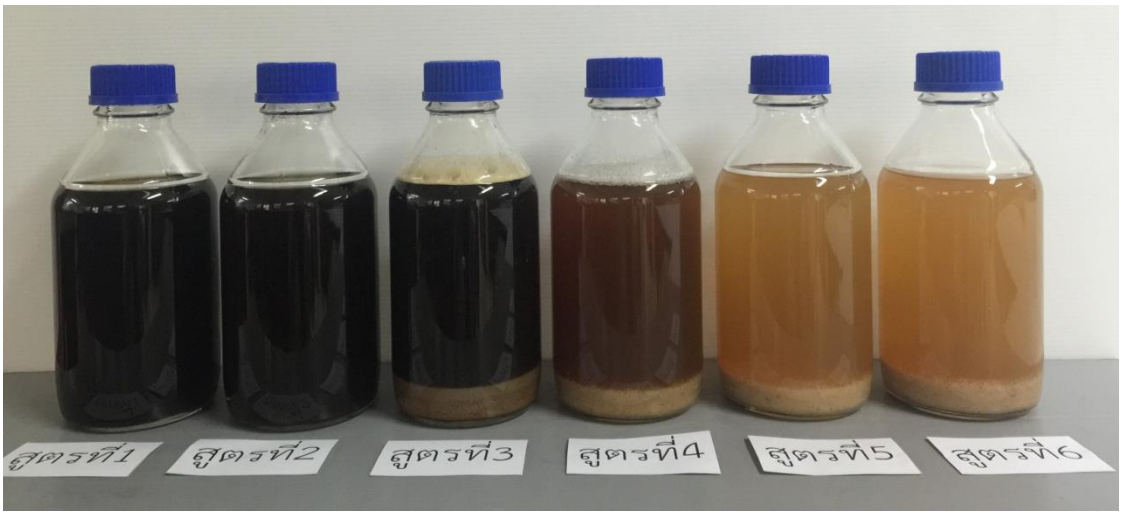

Figure 1 liquid solution bioproducts with cane molasses, cane molasses + sodium benzoate 0.05% W/V, cane molasses +soybean meal + K_2HPO_4 0.5 %W/V , cane molasses + soybean meal + Sodium benzoate 0.05% W/V, fish fertilizer + soybean meal and fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate 0.05% W/V, respectively

Figure 2 wettable powder bioproducts with talcum, zeolite, calcium carbonate, kaolin and phumai sulfate carriers, respectively