

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุมโรค
เหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง

Development of Powder Formulation of *Bacillus subtilis* DOA-WB4 Strain for
Controlling Potato Bacterial Wilt Disease

บุรณี พัวพงษ์แพทย์ ญัฐริมา โฆษิตเจริญกุล
ทิพวรรณ กันหาญาติ รุ่งนภา ทองเคิ่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 โดยการเตรียมอาหารสูตร TSB, TSA, NA และ NB เพื่อทำการทดสอบการเพิ่มปริมาณ พบว่า เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 สามารถสร้างสปอร์ในอาหารทุกชนิดได้ใกล้เคียงกัน

ทดสอบวัสดุรองรับเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 โดยใช้ผง Tacumc เป็นวัสดุรองรับ ทำผลิตเป็นสูตรผง จำนวน 5 กิโลกรัม จากการตรวจปริมาณเชื้อที่อยู่ในผลิตภัณฑ์พบปริมาณ 2.0×10^9 cfu/กรัม

ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 ในผงแป้งและระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่า 6 เดือน ผงเชื้อมีปริมาณของเชื้อ *B. subtilis* อยู่ 1×10^9 cfu/g พร้อมทั้งติดต่อขอทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ผงของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 ในระดับเรือนปลูกทดลองที่ ศูนย์วิจัยเกษตรจังหวัดเชียงใหม่

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-01-54

คำนำ

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

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

จิระเดช (2534) ได้รายงานว่าการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแอนทาโกนิสต์ ไม่ว่าจะอยู่ในรูปสปอร์ผสมน้ำหรือในรูปผงฝุ่นก็ตาม นับเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดที่สุดเนื่องจากใช้เชื้อปริมาณน้อยและวิธีการไม่ยุ่งยาก

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

ณัฐริมา *et al.* (2547) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus spp.* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงถึง 60% แต่การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการทดลองนี้เตรียมในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์และราดลงบนดินซึ่งเป็นการไม่สะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในสภาพแปลงและทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลล์แบคทีเรียตายลง

วงศ์ *et al.* (2548) ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ถึง 60%

ณัฐริมา *et al.* (2551) ศึกษาการเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar และ บนอาหารเหลว Tryptic Soy Broth ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, methylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และผง talcum 1:4 (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียในผงเชื้อคือ 1.1×10^{10} และ 0.7×10^{10} CFU/กรัม ตามลำดับ นำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4°C มีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน และ 15 เดือน ตามลำดับ เมื่อนำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของชิงพบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60 % ในเรือนทดลองและ 30-37 % ในแปลงทดลองปีที่ 1 และ 67.5-72.5% ในปีที่สอง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระจ่างต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์มันฝรั่ง
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

1. ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4

โดยใช้สูตรอาหารชนิดต่างๆ จำนวน 5 สูตร ได้แก่ TSA TSB NA NB และ NGB มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

3. ศึกษาวัสดุรองรับเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่มีประสิทธิภาพ

เพื่อให้เชื้อมีชีวิตได้เป็นเวลานาน โดยศึกษาวัสดุรองรับ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ แป้งทาคัม แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว และ ดินผสม มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

4. ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆของผลิตภัณฑ์ชนิดผง

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

5. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรผงในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 5 กรรมวิธี ได้แก่ สูตรผงจาก แป้งทาคัม แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว และ ดินผสม จำนวน 4 ซ้ำ

6. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรผงในสภาพแปลงทดลอง

โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 4 กรรมวิธี ได้แก่ สูตรผงที่ให้ผลการควบคุมที่ดีที่สุดจากการทดลองในเรือนปลูกพืชทดลองในอัตรา 1% WP, 5% WP, 7% WP และ กรรมวิธีเปรียบเทียบ จำนวน 4 ซ้ำ

7. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรผงในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร

โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 4 กรรมวิธี ได้แก่ สูตรผงและอัตราการใช้ที่ให้ผลควบคุมโรคเหี่ยวดีที่สุด ในระยะเวลาทุก 7 วัน, ทุก 15 วัน, ทุก 30 วัน และ กรรมวิธีเปรียบเทียบ จำนวน 4 ซ้ำ

เวลาและสถานที่

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

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 โดยการเตรียมอาหารสูตร TSB, TSA, NA และ NB เพื่อทำการทดสอบการเพิ่มปริมาณ พบว่า เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 สามารถสร้างสปอร์ในอาหารทุกชนิดได้ใกล้เคียงกัน

ทดสอบวัสดุรองรับเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 โดยใช้ผง Tacumc เป็นวัสดุรองรับ ทำผลิตเป็นสูตรผง จำนวน 5 กิโลกรัม จากการตรวจปริมาณเชื้อที่อยู่ในผลิตภัณฑ์พบปริมาณ 2.0×10^9 cfu/กรัม

ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 ในผงแป้งและระยะเวลาการเก็บรักษาพบว่า 6 เดือน ผงเชื้อมีปริมาณของเชื้อ *B. subtilis* อยู่ 1×10^9 cfu/g พร้อมทั้งติดต่อขอทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ผงของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA WB4 ในระดับเรือนปลูกทดลองที่ ศูนย์วิจัยเกษตรจังหวัดเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2534. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการหลักสูตร การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. หน้า 1-13. ระหว่างวันที่ 13-17 พฤษภาคม 2534 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม.
- ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล, วงศ์ บุญสืบสกุล, อรพรรณ วิเศษสังข์ และ ทศนาพร ทศคร. 2547. การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2547 . กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 115-126.
- ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ และบุษราคัม อุดมศักดิ์ 2551. พัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวในขิง. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)
- วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภาณุอำไพ, ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณและปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.
- Wassana Kittikanokrat, Wairuj Dechmahitkul and Phenjun Mekvijitsaeng. 2005. Formulation of *Bacillus subtilis* TISTR 001 for Increasing Probiotic Shelf-life (http://www.knowledge.biotech.or.th/doc_upload/200411495822.doc) (<http://www.splammo.net/bact102/102/bacillus.html>)