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

บุษราคัม อุดมศักดิ์ สุรีย์พร บัวอาจ
ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บูรณี พั่ววงษ์แพทย์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus subtilis* (Bs) ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก สาเหตุจากเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* (Cg) ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2558 ในสภาพแปลงปลูกที่ จ. กาญจนบุรี พบว่าไอโซเลท 20W16 และ 20W33 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรค ดังนั้น ในปี พ.ศ. 2559 จึงได้นำเอา Bs ไอโซเลท 20W16 มาพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในระดับแปลงปลูก โดยทำการผสมปรุงแต่งเป็นชีวภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย Bs ไอโซเลท 20W16 สูตรเหลว โดยเลี้ยง 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 เก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (28$\pm$ 2 องศาเซลเซียส) และในตู้เย็นธรรมดาที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ทำการตรวจนับปริมาณเอ็นโดสปอร์ในอาหารเหลว 6 สูตร ทุกๆ เดือน ด้วยวิธี dilution plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA ผลการทดลอง พบว่า ผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 สูตร มีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้น 10^8 cfu/ml โดยสูตรที่ 3 มีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงสุด คือ 4.9 x 10^8 cfu/ml เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 คือ สูตร ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา) + กากถั่วเหลือง + โซเดียมเบนโซเอท 0.05% W/V ที่เก็บไว้ทั้งในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการและในตู้เย็น มีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงที่สุดคือ 6.2 x 10^8 cfu/ml รองลงมา

คำหลัก : บาซิลลัส ซับทิลิส, พริก, โรคแอนแทรคโนส, เอ็นโดสปอร์

รหัสการทดลอง 03-05-59-02-02-00-01-59

ได้แก่สูตรที่ 5 คือสูตร ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา) + กากถั่วเหลือง มีปริมาณเอ็นโดสปอร์เท่ากับ 5.7 x 10^8 cfu/ml ในปี พ.ศ. 2560 ได้ทำการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ Bs สูตรแข็ง ในรูปผงละลายน้ำ (wettable powder) ได้ผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ Bs สูตรแข็ง 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ใช้ ทัลคัม ซีโอไลท์ แคลเซียมคาร์บอเนต Kaolin (ดินขาว) และภูไมท์ซัลเฟต เป็นสารพา โดยพบว่า สูตรที่ 1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพามีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์สูงสุดคือ 1.7 x 10^8 spores/ml และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง 28$\pm$ 2 องศาเซลเซียส ก็ยังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงที่สุดคือ 1.8 x10^7 spores/ml แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสูตรที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต และสูตรที่ใช้ Kaolin (ดินขาว) เป็นสารพา ซึ่งมีปริมาณเอ็นโดสปอร์เท่ากับ 1.7x10^7 และ9.6 x10^6 spores/ml ตามลำดับ ผลการทดลองเก็บผลิตภัณฑ์ BS ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ทุกสูตรยังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่แตกต่างกับปริมาณเริ่มต้นคืออยู่ระหว่าง 10^6-10^7 spores/ml โดยสูตรที่ 1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพายังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงที่สุดคือ 3.0 x10^7spores/ml จากผลการทดลองนี้ จะนำเอาชีวภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกต่อไป

คำนำ

โรคแอนแทรคโนสของพริก นับว่าเป็นโรคที่สำคัญของเกษตรกรผู้ปลูกพริกเป็นอย่างมาก โรคนี้เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum* sp. ที่พบเข้าทำลายพริกก็มีอยู่ 3 ชนิดด้วยกัน *C. gloespoloides* *C. capcisi* และ *C. piperatum* ผลพริกที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลายจะมีอาการตามชนิดของเชื้อรา โดยปกติในพริกผลใหญ่เชื้อราสาเหตุที่เข้าทำลายคือ *C. gloespoloides* อาการของโรคมักพบบนผลพริกที่เริ่มสุก หรือระยะก่อนที่ผลพริกจะเปลี่ยนสี อาการเริ่มแรกจะประกฏเป็นวงกลมช้ำสีน้ำตาล เนื่อเยื่อบุ๋มลึกลงไปจากระดับเดิมเล็กน้อย และจะค่อย ๆ ขยายกว้างออกไปเป็นวงกลมหรือวงรีรูปไข่ ซึ่งมองเห็นลักษณะของเชื้อราที่เจริญภายใต้เนื้อเยื่อของพืชขยายออกไปในลักษณะที่เป็นวงกลมสีดำซ้อนกันเป็นชั้น เมื่อมีความชื้นจะเห็นเป็นเมือกเยิ้มสีส้มอ่อน ๆ บริเวณแผลบนผลพริก ทำให้แผลขยายตัวและผลพริกจะเน่าและร่วงก่อนเก็บเกี่ยว ผลพริกนี้เมื่อนำไปตากแห้งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีด โดยโรคนี้มักระบาดมากในสภาพความชื้นสูง โดยเฉพาะในช่วงที่พริกกำลังให้ผลผลิต และเชื้อราสามารถติดไปกับเมล็ด (ศิริพงษ์ และพรพิมล, 2554) เกษตรกรส่วนใหญ่มักเลือกใช้วิธีการควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายสะดวก และได้ผลรวดเร็ว ซึ่งผลจากการใช้สารเคมีที่ไม่ถูกวิธี หรือใช้มากจนเกินไป ส่งผลเสียตามมาหลายประการ เช่น เกิดการดื้อยาของเชื้อโรค มีสารตกค้างในผลิตผล ตลอดจนเกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในสภาพธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เกิดผลเสียโดยตรงต่อผู้ใช้ได้แก่ตัวเกษตรกรเองและผู้บริโภค นอกจากนี้โดยทางอ้อม ส่งผลถึงการกีดกันทางการค้า เนื่องมาจากภายใต้เงื่อนไขข้อตกลงขององค์การการค้าโลก (WTO) สินค้าทางการเกษตรที่จะส่งไปขายยังประเทศคู่ค้าจะต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้น การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมโรคพืชทั้งในปัจจุบันและอนาคต เพื่อลดปัญหาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชดังกล่าวที่นับวันจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ

ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศ ที่จะนำจุลินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า “จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist)” ในธรรมชาติมาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และในปัจจุบันก็เป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปเป็นกลยุทธ์ป้องกันกำจัดโรคพืช เนื่องจากมีการนำไปใช้อย่างได้ผลดีและสามารถพัฒนาเป็นการค้าได้หลายชนิด

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วๆ 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

ณัฏฐิมา และคณะ (2548) ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากดิน, รากพืชและปุ๋ยคอก ได้จำนวน 525 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ประมาณ 70-100%

บุษราคัม และณัฏฐิมา (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 ซึ่งทุกกรรมวิธี จะมีระดับความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบอย่างนัยสำคัญทางสถิติซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคสูงถึง 65.46 เปอร์เซ็นต์

ได้มีการศึกษาความปลอดภัยของ *B. subtilis* ต่อคน โดย อมรรัตน์ และมณจันทร์ (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 มี

อัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และจากการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบลักษณะรอยโรคที่อวัยวะภายใน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใดๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้เกิดขึ้น

B. subtilis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และมีการสร้างสปอร์ที่ทนทานกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell) จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย และกากน้ำตาลได้ ส่วนเกลือแร่ต่างๆ มักต้องการในปริมาณน้อย การเติมเกลือแร่บางชนิด เช่น แคลเซียมและแมงกานิส จะเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ได้ โดย ไวรุจน์ และคณะ (2550) ได้รายงานไว้ว่า ในการผลิตสปอร์ของ *B. subtilis* นั้น สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตได้ดี แต่อาจเกิดปัญหาเรื่องฟองในการผลิตระดับใหญ่ กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสม และบุษราคัม และคณะ (2553) ได้รายงานไว้ว่า สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูป *B. subtilis* คือสูตร FFS1 ซึ่งเป็นส่วนผสมของ โปรตีนปลา (เศษปลาหมักหรือปุ๋ยปลา) 10 ม.ล. ผสมกากถั่วเหลือง 10 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 ม.ล.เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด และการเลี้ยงแบคทีเรีย ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B. subtilis*

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

<u>ศึกษาการผสมปรุงแต่งผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* สูตรเหลว</u> (ปีพ.ศ. 2559)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 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 (28$\pm$ 2 องศาเซลเซียส) และ ในตู้เย็นธรรมดาที่ 18 องศาเซลเซียส

7. ตรวจเช็คการมีชีวิตรอด (Viability) ของเซลล์ *B. subtilis* ในผลิตภัณฑ์ โดยตรวจนับปริมาณเซลล์จากเดือนเริ่มต้นและทุกๆ เดือน โดยวิธี dilution plate techniqueและนับความเข้มข้นของสปอร์โดยแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (ไวรุจน์ และคณะ, 2550) หรือที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชม. เพื่อฆ่าเซลล์ปกติ และเหนี่ยวนำให้สปอร์งอกก่อนโดยการย้ายลงอาหาร PSB เขย่าเป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA โดยวิธี dilution plate technique

<u>ศึกษาการผสมปรุงแต่งผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* สูตรแข็ง</u> (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 (28± 2 องศาเซลเซียส) และ ในตู้เย็นธรรมดาที่ 18 องศาเซลเซียส

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น: 1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 สิ้นสุด 30 กันยายน พ.ศ. 2560

สถานที่ดำเนินการทดลอง: ที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปี พ.ศ. 2559

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W16 สูตรเหลว ผลการทดลองพบว่า ชีวภัณฑ์ทั้ง 6 สูตร มีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้น 10^8 cfu/ml โดยสูตรที่ 3 มีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงสุด คือ 4.9 x 10^8 cfu/ml เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า ชีวภัณฑ์สูตรที่ 6 คือสูตร ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา) + กากถั่วเหลือง + โซเดียมเบนโซเอท 0.05% W/V ที่เก็บไว้ทั้งในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และในตู้เย็น มีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงที่สุดคือ 6.2 x 10^8 cfu/ml รองลงมาได้แก่สูตรที่ 5 คือสูตร ปลาหมัก (ปุ๋ยปลา) + กากถั่วเหลือง มีปริมาณเอ็นโดสปอร์เท่ากับ 5.7 x 10^8 และ 4.6 x 10^8 cfu/ml ตามลำดับ (Table 1และ Figure 1)

ปีพ.ศ. 2560

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W16 สูตรแข็ง ได้ชีวภัณฑ์สูตรแข็ง ในรูปผงละลายน้ำ 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ใช้ ทัลคัม ซีโอไลท์ แคลเซียมคาร์บอเนต Kaolin (ดินขาว) และภูไมท์ซัลเฟต เป็นสารพา โดยพบว่า สูตรที่ 1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพามีปริมาณเอ็นโดสปอร์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์สูงสุดคือ 1.7 x 10^8 spores/ml และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง 28± 2 องศาเซลเซียส พบว่า สูตรที่ 1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพา ยังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงที่สุดคือ 1.8 x10^7 spores/ml แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสูตรที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต และสูตรที่ใช้ Kaolin (ดินขาว) เป็นสารพา ซึ่งมีปริมาณเอ็นโดสปอร์เท่ากับ 1.7x10^7 และ9.6 x10^6 spores/ml ตามลำดับ (Table 2และ Figure 2)

ผลการทดลองเก็บผลิตภัณฑ์ BS ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ทุกสูตรยังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่แตกต่างกับปริมาณเริ่มต้นคืออยู่ระหว่าง 10^6-10^7 spores/ml โดยสูตรที่ 1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพายังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์สูงที่สุดคือ 3.0 x10^7 spores/ml (ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองนี้ จะนำเอาชีวภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า การพัฒนาชีวภัณฑ์ Bs สูตรเหลว หลังการเก็บรักษาชีวภัณฑ์เป็นเวลา 4 เดือน ผลิตภัณฑ์เหลวทุกสูตรยังคงมีปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่เปลี่ยนแปลงมากจากปริมาณเริ่มต้น คือ อยู่ในระดับ 10^8 cfu/ml และพบว่าการเก็บผลิตภัณฑ์เหลวในตู้เย็นธรรมดาที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ยังไม่มีความแตกต่างกับการเก็บสภาพอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (28$\pm$ 2 องศาเซลเซียส)

สำหรับการพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรแข็ง พบว่า การใช้ทัลคัมเป็นสารพา เป็นสูตรที่เหมาะสมเนื่องจากมีปริมาณเอ็นโสปอร์สูงที่สุด อีกทั้งทัลคัมเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี มีราคาถูก หาซื้อได้ง่าย

อย่างไรก็ตาม ควรจะต้องพัฒนาปรับปรุง หาสูตรและวิธีการที่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์หรือเอ็นโดสปอร์ของ Bs ในชีวภัณฑ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในแปลงปลูก ต่อไป

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 : คู่มือโรคผักและการป้องกันกำจัด.* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อมรรัตน์ ทัศนกิจ และมณจันทร์ 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 4 months preservation at 18° c and 28 ± 2° c temperature

Treatments	amount of *Bacillus subtilis* colonies (spores) (cfus/ml)		
	0 month	4 months (18° c)	4 months (28 ± 2° c)
1. cane molasses	0.3×10^8	1.0×10^8	3.5×10^8
2. cane molasses + sodium benzoate 0.05% W/V	0.9×10^8	2.2×10^8	3.2×10^8
3. cane molasses +soybean meal + K_2HPO_4 0.5 %W/V	4.9×10^8	4.2×10^8	1.3×10^8
4. cane molasses + soybean meal + Sodium benzoate 0.05% W/V	1.4×10^8	1.6×10^8	2.5×10^8
5. fish fertilizer + soybean meal	1.3×10^8	4.6×10^8	5.7×10^8
6. fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate 0.05% W/V	4.5×10^8	6.2×10^8	6.2×10^8

Table2 The survival of *Bacillus subtilis* 20W16 in 5 types of wettable powder bioproducts, after 3 months preservation at 28± 2° c temperature

Treatments	amount of *Bacillus subtilis* colonies (spores) (cfus/ml)			
	0 month	1 months	2 months	3 months
1. talcum	1.7×10^8 a	2.7×10^8 a	2.7×10^7 a	1.8×10^7 a
2. zeolite	5.0×10^7 b	3.8×10^7 b	6.9×10^6 bc	7.3×10^6 b
3. calcium carbonate	5.5×10^7 b	5.7×10^7 b	1.2×10^7 b	1.7×10^7 ab
4. kaolin	3.5×10^7 b	2.5×10^7 b	5.2×10^6 bc	9.6×10^6 ab
5. phumai sulfate	1.4×10^7 b	3.5×10^7 b	3.4×10^6 c	3.9×10^6 b
CV (%)	38.25	62.77	41.57	49.15

Table 3 The survival of *Bacillus subtilis* 20W16 in 5 types of wettable powder bioproducts , after 1 months preservation at 18°C temperature

Treatments	amount of *Bacillus subtilis* colonies (spores) (cfus/ml)	
	0 month	1 month
1. talcum	3.4×10^{7}a	3.0×10^{7}a
2. zeolite	9.4×10^{6}b	8.5×10^{6}b
3. calcium carbonate	9.7×10^{6}b	8.9×10^{6}b
4. kaolin	8.3×10^{6}b	7.9×10^{6}b
5. phumai sulfate	3.4×10^{6}b	3.4×10^{6}b
CV (%)	39.25	74.56

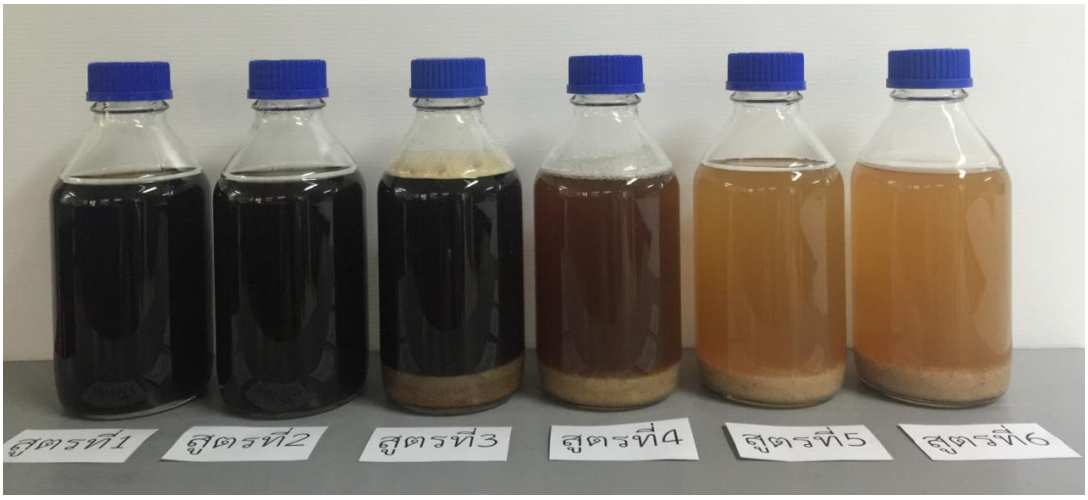

Figure 1 liquid solution bioproducts; cane molasses, cane molasses + sodium benzoate 0.05% W/V, cane molasses +soybean meal + K_2HPO_4 0.5 % W/V , cane molasses + soybean meal + Sodium benzoate 0.05% W/V, fish fertilizer + soybean meal and fish fertilizer + soybean meal + sodium benzoate 0.05% W/V, respectively

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