

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No.4 แบบเม็ดเพื่อ
ควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิง

Development of tablets product of *Bacillus subtilis* Tobacco root No.4
strain for controlling Ginger bacterial wilt disease

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล บุรณี พัววงศ์แพทย์ ทิพวรรณกันหาญาติ รุ่งนภา ทองเครื่อง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 โดยการทดสอบการสร้างสปอร์บนอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ TSB, NB และ YT พบว่า อาหารสูตร YT สามารถทำให้เชื้อ BS สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ 4 สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

การเตรียมผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ No. 4 แบบเม็ด โดยใช้เกล็ดหินหรือดินขาวเป็นสารพา มีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และ กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวพบว่ามีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 อยู่ที่ นาทีละ 10^9 cfu/g ทดสอบการปลดปล่อยของแบคทีเรีย *B. subtilis* พบว่า สามารถปล่อยเชื้อได้ 10^6 cfu/min นำสูตรเม็ดมาทดสอบความอยู่รอดและระยะเวลาการเก็บรักษาโดยทดสอบการเก็บรักษาที่ 2 อุณหภูมิได้แก่ อุณหภูมิห้องและ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอยู่ในการทดสอบ และนำสูตรเม็ดไปทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงทดลอง อยู่ในการหว่างการทดสอบในสภาพแปลงทดลอง

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-02-54

คำนำ

โรคเหี่ยวของพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* Syn. (*Pseudomonas solanacearum*) เป็นโรคที่ทำให้ความเสียหายอย่างสูงต่อการผลิตและการส่งออก การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานาน และมีพืชอาศัยกว้าง เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวกับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น ปทุมมา มันฝรั่ง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเกษตรกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค 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 สปอร์ของแบคทีเรียก็สามารถทนอยู่ได้และจำนวนของเอนโดสปอร์ก็ไม่ลดลง และพบว่าความเข้มข้นของเอนโดสปอร์จะคงที่กว่าผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของเหลว

ณัฐธิดา et al. (2547) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพืชและมะเขือเทศ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพืชถึง 60% แต่การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการทดลองนี้เตรียมในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์และราดลงบนดินซึ่งเป็นการไม่สะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในสภาพแปลงและทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลล์แบคทีเรียตายลง

ณัฐธิดา et al. (2551) ศึกษาการเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัคซ์ *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) ได้ปริมาณแบคทีเรียในผงเชื้อ คือ 1.1×10^{10} และ 0.7×10^{10} CFU/กรัม ตามลำดับ นำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรกายาสูบ no. 4 ที่ได้ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 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 หม้อนึ่งความดัน ไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน ทราย ถังต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ชิง
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบ No.4
โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบ No. 4 บนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวอายุ 18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ทำการเก็บสปอร์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำไปหมนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสปอร์ที่ได้ไปปั่นล้าง 2-3 ครั้ง เก็บเชื้อไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปเตรียมสูตรสำเร็จต่อไป

2. การเตรียมสูตรสำเร็จแบบเม็ด

นำสารประกอบต่างๆ ได้แก่ kaolin, talcum, alginate, lactose, hydrogenated vegetable oil (HVO) และกากน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ ผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบ no. 4 จำนวน 1.0×10^{12} หน่วยโคโลนี ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง

ผสม จนได้เป็นก้อนหมาด นำส่วนผสมที่ได้ใส่ในแม่พิมพ์ยาเม็ด (triturate mold) จากนั้นกดเม็ดยาออกจากแม่พิมพ์ แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3. ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyat ยาสูบ no.4

โดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyat ยาสูบ no.4 โดยสุ่มจากเม็ดที่ผลิตได้ จำนวน 3 ครั้ง มาวัดความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyat ยาสูบ no.4 โดยนำสูตรสำเร็จแบบเม็ดที่ผสมเข้ากันดีจนเป็นก้อนหมาดๆ เล็กๆ มา drop plate บนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติทั้งหมดในสูตรสำเร็จ (cfu/g)

4. การทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyat ยาสูบ no.4 ที่เวลาต่างๆ

โดยทำการชั่งสูตรสำเร็จ สูตรละ 1 กรัม ใส่ขวดที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 99 มิลลิลิตร แล้วเก็บเม็ดยาที่ลอยน้ำที่เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ออก โดยเตรียมตัวอย่างแต่ละเวลาแยกกัน เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ ณ เวลาต่างๆ มานับจำนวนแบคทีเรียปฏิบัติ โดยวิธีการ drop plate บนอาหาร TSA คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการปลดปล่อยเชื้อที่เวลาต่างๆ จากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการปลดปล่อยเชื้อ} = n \times 100 / N$$

n = ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติในสารละลายที่เวลาต่างๆ

N = ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติเริ่มต้นในสูตรสำเร็จ

5. ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรakyat ยาสูบ no.4 และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

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

6. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในโรงเรือนทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 4 กรรมวิธี ได้แก่ สูตรชนิดเม็ดที่ผลิตได้ จำนวน 5 กรัม, 7 กรัม, 10 กรัม และ 12 กรัม พร้อมกรรมวิธีเปรียบเทียบ จำนวน 4 ซ้ำ

7. ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในแปลงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 4 กรรมวิธี ได้แก่ สูตรชนิดเม็ดและอัตราการใช้ที่ให้ผลควบคุมโรคเหี่ยวดีที่สุด ในโรงเรือนทดลอง ในการระยะเวลาในการใช้ได้แก่ทุก 7 วัน, ทุก 15 วัน, ทุก 30 วัน และกรรมวิธีเปรียบเทียบ จำนวน 4 ซ้ำ

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ แปลงปลูกพืชของ
เกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบ No. 4 โดยการทดสอบการสร้างสปอร์บนอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ TSB, NB และ YT พบว่า อาหารสูตร YT สามารถทำให้เชื้อ BS สายพันธุ์ ดินรกายาสูบ 4 สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

การเตรียมผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบ No. 4 แบบเม็ด โดยใช้ เกลือหินหรือดินขาวเป็นสารพา มีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และ กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวพบว่ามีค่าสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรกายาสูบ no.4 อยู่ที่ นาที่ละ 10^9 cfu/g ทดสอบการปลดปล่อยของแบคทีเรีย *B. subtilis* พบว่า สามารถปล่อยเชื้อได้ 10^6 cfu/min นำสูตรเม็ดมาทดสอบความอยู่รอดและระยะเวลาการเก็บรักษาโดยทดสอบการเก็บรักษาที่ 2 อุณหภูมิได้แก่ อุณหภูมิห้องและ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอยู่ในระหว่างการทดสอบ และนำสูตรเม็ดไปทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงทดลอง อยู่ในระหว่างการทดสอบในสภาพแปลงทดลอง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเตรียมผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรกายาสูบ No. 4 แบบเม็ด โดยใช้ เกลือหินหรือดินขาวเป็นสารพา มีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และ กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร มีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรกายาสูบ no.4 อยู่ที่ นาที่ละ 10^9 cfu/g สามารถปล่อยเชื้อได้ 10^6 cfu/min นำสูตรเม็ดมาทดสอบความอยู่รอดและระยะเวลาการเก็บรักษาโดยทดสอบการเก็บรักษาที่ 2 อุณหภูมิได้แก่ อุณหภูมิห้องและ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอยู่ในระหว่างการทดสอบ และนำสูตรเม็ดไปทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงทดลอง อยู่ในระหว่างการทดสอบในสภาพแปลงทดลอง

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 และบุษราคม 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>)