การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

Formulation of *Bacillus subtilis* Endospore for Controlling Ginger Wilt

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ในปีที่ 1-3 (ต.ค. 2548 – ก.ย. 2551) ได้ทำการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง เริ่มจากการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B.subtilis* จำนวน 21 สูตร ทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอ็นโดสปอร์ ได้แก่ ทดสอบความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อการบ่มเชื้อ อุณหภูมิ และแสงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ ทดสอบความทนทานของ *B.subtilis* ที่อยู่ในระยะเอ็นโดสปอร์ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ และศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ *B.subtilis* ในรูปเอ็นโดสปอร์ ผลการทดลองพบว่า อาหารสูตร N1 B N2 N5 N4 N3 และ FFS1 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงถึง10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสูตร N3 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงสุดถึง 3.10 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 480 ชั่วโมง (20 วัน) และสูตร FFS1 สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ 2.1 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (5 วัน) การเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิปกติ (26 องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงธรรมดา เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* ในการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ และพบว่าแบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถทนอุณหภูมิได้ต่ำถึง 8 องศาเซลเซียสและสูงถึง 100 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูกปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ที่อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส) ในการทดสอบการแปรรูปผลิตภัณฑ์ในรูปของเหลว ผลการทดลอง พบว่า หลังการทดสอบ 3 เดือน ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารนำพา (หางนม) ลดลงเพียงเล็กน้อย คือจาก 1.1 x 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร เป็น 0.2x 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร แต่หลังเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซลแบคทีเรียที่มีชีวิตเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว จาก 10^7 เป็น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร การทดสอบการแปร

รหัสการทดลอง 07-01-49-06

รูปผลิตภัณฑ์ในรูปผง พบว่า หลังการแปรรูปปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นมีปริมาณเท่ากันคือ10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร แต่การใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารนำพามีข้อเสียคือ การเกาะติดค่อนข้างยาก เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีลักษณะมันลื่น ต้องใช้เวลานานในการคลุกเคล้า ข้อดีคือ ผลิตภัณฑ์ละลายน้ำได้ดี ในขณะที่การใช้สารทัลคัม การละลายน้ำจะมีตะกอนตกค้าง หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือนพบว่า ปริมาณเอ็นโดสปอร์ยังไม่แตกต่างกันและยังไม่ลดลง หลังการเก็บรักษา 7 เดือน พบว่า ปริมาณแบคทีเรียจากทั้งสองผลิตภัณฑ์มีปริมาณเท่ากันแต่ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากการเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร PSA ซึ่งไม่มีการกระตุ้นให้สร้างเอ็นโดสปอร์ ไม่มีแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่มีชีวิตรอด เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตพบว่า ราคาของสารนำพาทั้งสองชนิดที่นำมาใช้แปรรูปไม่แตกต่างกัน ในปี 2550-2551 ได้ทำการปรับวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลวโดยลดปริมาณหางนมซึ่งใช้เป็นสารนำพา ลง 2 เท่า ศึกษาการเก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เหลวในโรงเรือนทดลอง ผลการทดลองพบว่าการปรับวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยลดหางนมลง 2 เท่า พบว่า ปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีค่าไม่คงที่ แต่ปริมาณกลับเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น เมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือน และไม่มีความแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมหางนม แต่จะมีปริมาณมากกว่าในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร PSB เปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติและในตู้เย็นพบว่าเมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือนปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยในสภาพอุณหภูมิปกติมีปริมาณมากกว่าที่เก็บในตู้เย็นแต่สำหรับผลิตภัณฑ์ผงปริมาณเซลBsที่มีชีวิตรอดมีปริมาณลดลงเท่ากันทั้ง2แหล่งเก็บ

ปีที่ 4 (ต.ค. 2551 – ก.ย. 2552) ได้ทำการทดสอบการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลวเอ็นโดสปอร์โดยการเติมและไม่เติมหางนมเป็นสารนำพา เก็บในสภาพอุณหภูมิปกติและอุณหภูมิต่ำ ผลการทดลองพบว่า การแปรรูปผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* จากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 การเติมหางนมลงเป็นสารนำพา ปริมาณการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียไม่แตกต่างกับการไม่เติมหางนม เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติเป็นเวลา 6 เดือน และพบว่า ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 มีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB การเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่า การเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในสภาพโรงเรือน พบว่า การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุด และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ทั้งนี้การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมาก ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา การควบคุมโรคด้วยสารเคมีค่อนข้างยาก และมักก่อให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อมตามมา จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาวิธีควบคุมโรคเหี่ยวที่มีความปลอดภัยหลายวิธี เช่น การเขตกรรม การปรับปรุงพันธุ์ และการควบคุมโรคโดยชีววิธีโดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นantagonist ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย จนกระทั่งแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เช่น เชื้อรา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ณัฏฐิมาและคณะ (2548) จึงได้ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ และพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงถึง 60% แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมาการนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทำโดยใช้สารละลายเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์ และ/หรือราดลงบนดิน ซึ่งวิธีการปฏิบัติเช่นนี้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มักไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลแบคทีเรียตายลง

เนื่องด้วยแบคทีเรียในสกุล*Bacillus* มีคุณสมบัติในการสร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเป็นอวัยวะที่อยู่ในเซลแบคทีเรีย (vegetative cell) โดยเอ็นโดสปอร์จะมีผนังหนาคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น รังสี แรงกระแทก ร้อนจัดหรือเย็นจัดหรือสภาพขาดแคลนอาหาร และเอ็นโดสปอร์จะสามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell ได้ใหม่เมื่อใส่ลงไปในดินและสภาพแวดล้อมเหมาะสมและมีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อโรคได้ทันที (http://www.splammo. net/bact102/102/bacillus.html) โดยมหาวิทยาลัยน้อททิ่งแฮม (University of Nottingham) ของประเทศอังกฤษได้ทำการศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* และรูปแบบผลิตภัณฑ์ในรูปของเอ็นโดสปอร์และได้รับการจดทะเบียนจาก EPA แล้วในชื่อ MBI 600 โดย มีคุณสมบัติทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถเก็บในสภาพแห้งได้ไม่ต่ำกว่า 2 ปี สามารถใช้ร่วมกับสารเคมีชนิดอื่นได้อย่างกว้างขวางและสปอร์สามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell และเข้าครอบคลุม (colonise) รากพืชได้ทันที เมื่อใส่ลงไปในดิน (http://www.microbiogroup.com/BS1.htm)

วาสนา และคณะ, 2547 ได้ศึกษาการยืดอายุผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* TISTR 001 เพื่อใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ พบว่า ถ้าเติมสารตัวพา (carrier) ได้แก่ zeolite, talcum, และ calcium carbonate ลงไปในการรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผง แม้เพิ่มอุณหภูมิถึง 150 องศาเซลเซียสในระหว่างกระบวนการผลิตก็ตาม สปอร์ของแบคทีเรียก็สามารถทนอยู่ได้และจำนวนของเอ็นโดสปอร์ก็ไม่ลดลง และพบว่าความเข้มข้นของเอ็นโดสปอร์จะคงที่กว่าผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของเหลว (http://www.nowledge.biotec.or.th/doc_upload /200411495822 .doc)

เพ็ญจันทร์,2546 ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อขบวนการหมักสปอร์ของ *B.subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก พบว่า การใช้โมลาสและกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้หมัก จะสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* TISTR 001 ได้ถึง 10^9 สปอร์/มิลลิลิตร

งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จของแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้อยู่ในรูปของเอ็นโดสปอร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ให้มีความคงทน เนื่องการมีชีวิตรอดในรูปสปอร์ของเชื้อ และสามารถนำไปใช้ได้ทุกสภาพแม้กระทั่งในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง โดยอาศัยคุณสมบัติความทนทานของเอ็นโดสปอร์และการงอกกลับมาเป็นเซลใหม่ได้โดยง่ายของเอ็นโดสปอร์ดังกล่าว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย *B.subtilis* 1 ไอโซเลท (ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* (ณัฏฐิมาและคณะ, 2547)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA (Potato sucrose agar)
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ เครื่องเขย่า (incubator shaker) ฯลฯ
4. สารเคมีในห้องปฏิบัติการ
5. สารที่ได้จากของเหลือภาคเกษตร เช่น หางนม กากน้ำตาล กากถั่วเหลือง โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก) ฯลฯ

วิธีการ

ปีที่1-3 (ต.ค. 2548 – ก.ย. 2551)

1. การทดสอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

สูตรอาหารทดสอบ (ภาคผนวก) ได้แก่

- **ชุดที่ 1** สูตรอาหารทั่วไป 15 สูตร ได้แก่ : CA MY NGA PSB (Wakimoto'broth) CPG YP NA NTG GMP B N1 N2 N3 N4 และ N5

- **ชุดที่ 2** สูตรอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร ได้แก่ : SM1 SM2 FM1 FM2 FFS1 และ FFS2

ปฏิบัติดังนี้

1.1 การเตรียมหัวเชื้อ : เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B. subtilis* บนอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1 ลูป (loop) มาตรฐานลงในอาหารเหลว PSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 การทดสอบในสูตรอาหารต่างๆ : ถ่ายหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ ซึ่งบรรจุอยู่ในฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 99 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

1.3 การบันทึกผล : ตรวจผลโดยนับจำนวนเอ็นโดสปอร์โดยการย้อมสีและนับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 24 ชั่วโมง

2. การทดสอบความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ปฏิบัติดังนี้

2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารสูตร N3 (Parry,J.M. และคณะ,1988) โดยปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 นำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ ได้แก่ 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 360 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส)

2.3 ตรวจผลโดยนับจำนวนเอ็นโดสปอร์โดยการย้อมสีและนับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบความทนทานของเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *B.subtilis* สร้างขึ้น ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ปฏิบัติดังนี้

3.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารเหลว N1 N2 N3 N4 และ N5 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

3.2 นำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 8 40 60 80 และ100 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิปกติ (26 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

3.3 นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA เพื่อนับจำนวนเซลที่มีชีวิตรอด โดยวิธี serial dilution plate method

4. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis*

4.1 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปของเหลว

4.1.1 <u>การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 4 เท่า</u>

1. เลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis*ในอาหารเหลว FFS1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลว (ข้อ1) อัตรา 10 % ของปริมาตร

3. เติมหางนมลงไป 4 เท่า เขย่าให้เข้ากัน

4. บรรจุขวดแก้ว ปิดฝา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.1.2 <u>การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า</u>

ปฏิบัติเช่นเดียวกับ 4.1 แต่ลดปริมาณหางนมลงเหลือ 2 เท่า

ตรวจนับเซลแบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique เปรียบเทียบกับ การเลี้ยงบนอาหารเหลวFFS1 ที่ไม่มีการแปรรูปและในอาหาร PSB

4.2 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

1. ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลอง 4.1 (ข้อ1-2)

2. เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงในสารละลาย (ข้อ1)

3. เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน

4. นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) เก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. ตรวจนับเซลแบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์แปรรูปแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ซึ่งปฏิบัติดังนี้

- เลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* บนอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มิลลิลิตร ขูดเซลแบคทีเรีย
- นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- รินเอาส่วนใสมาผสมกับ Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1
- เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน
- นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท เก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. ศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

5.1. <u>ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เหลว</u>

นำผลิตภัณฑ์เหลวที่ได้แยกเก็บเป็น 2 แหล่ง คือเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิปกติ (อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ตรวจผลจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดโดยวิธี serial dilution plate method ทุก ๆเดือน

5.2 ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ผงที่ปรุงแต่งโดยใช้ทัลคัมเป็นสารนำพา บรรจุในถุงพลาสติกปิดฝา แยกเก็บเป็น 2 แหล่ง คือเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิปกติ (อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ปฏิบัติเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์เหลว (ข้อ 5.1)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ชนิดผง

โดยวิธีการแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูก

วิธีปฏิบัติ

1. นำดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วมาผสมกับ cell suspension ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยใช้ปริมาณความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชม.

2. นำหัวพันธุ์ขิงที่ล้างทำความสะอาดแล้ว แช่ในผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ปริมาณความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชม.

3. ปลูกในดินที่เตรียมไว้ โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบคือ

- ปลูกขิงในดินที่ราดแบคทีเรีย *R. solanacearum* (C+)
- ปลูกขิงในดินอบฆ่าเชื้อ (C-)
- ปลูกขิงที่แช่ในผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ที่แปรรูปจากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PSA ปกติ

4. ตรวจผล โดยเช็คจำนวนต้นเหี่ยว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค

ปีที่ 4 (ต.ค. 2551 – ก.ย. 2552)

1. เปรียบเทียบการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว (Bs)

เปรียบเทียบวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว 3 รูปแบบ คือ

1. FFS1+ Skimmed milk : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร FFS1 บ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 เติมหางนมเป็นสารนำพา
2. PSB + Skimmed milk : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร PSB บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 เติมหางนมเป็นสารนำพา
3. FFS1 : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร FFS1 บ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 แต่ไม่มีการเติมหางนม

2. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในโรงเรือนทดลอง

- เตรียมดินปลูกใส่กระถาง ปริมาณ 700 กรัมต่อกระถาง

- เพาะชำกล้าขิงในกระบะเพาะ ให้มีอายุประมาณ 45 วัน

- ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในสภาพโรงเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ อัตรา 70 กรัมต่อดิน 700 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 ราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร 50 มล. ต่อกระถาง

กรรมวิธีที่ 3 ราดดินด้วยสารละลายเชื้อ Bs* อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร 50 มล.ต่อกระถาง

กรรมวิธีที่ 4 Control + ราดด้วยสารละลายเชื้อ Rs อัตรา 50 มล.ต่อกระถาง (ปริมาณ Rs เท่ากับ 1.8×10^9 cfu/ml.)

กรรมวิธีที่ 5 Control - ราดดินด้วยน้ำเปล่า

* การเตรียมสารละลายเชื้อ Bs ปฏิบัติโดยการเลี้ยง Bs บนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ จากนั้นนำมาทำเป็น cell suspension ด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นจนได้ปริมาณเซล Bs ประมาณ 10^8 cfu/ml.

- ตรวจผลโดยนับจำนวนต้นที่เป็นโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเปรียบเทียบกับจำนวนต้นทั้งหมด

3. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในแปลงปลูก

ทดสอบผลิตภัณฑ์ผงในแปลงปลูกที่ศูนย์วิจัยพืชสวนลำปาง อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง โดยวิธีรองก้นหลุมและแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกวางแผนการทดลองแบบ RCBD 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่หัวพันธุ์ขิงก่อนปลูกอัตรา 15 กรัม/น้ำ 10 ลิตร 30 นาที

กรรมวิธีที่ 2 แช่หัวพันธุ์ขิงก่อนปลูกอัตรา 30 กรัม/น้ำ 10 ลิตร 30 นาที

กรรมวิธีที่ 3 หยอดก้นหลุมก่อนปลูกอัตรา 15 กรัม/หลุม

กรรมวิธีที่ 4 หยอดก้นหลุมก่อนปลูกอัตรา 30 กรัม/หลุม

กรรมวิธีที่ 5 Control

เวลาและสถานที่ **เริ่มต้น** ตุลาคม 2548 **สิ้นสุด** กันยายน 2552

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปีที่ 1-3 **(ต.ค. 2548 – ก.ย. 2551)**

1. การทดสอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ผลการทดลองพบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อ 240 วัน มีอาหาร 8 สูตรได้แก่ YP NB NTG GMP N1 B N2 และ N5 ที่แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ประมาณ 10^2สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 360 ชั่วโมง พบว่า *B.subtilis* สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ในอาหารทั้ง 15สูตร โดยที่ในสูตร N3 และ N4 แบคทีเรียสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุด เท่ากับ 2.13×10^6 และ2.34×10^6สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อจนครบ 480 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุดถึง10^8ในอาหาร 6 สูตร ได้แก่ N1 B N2 N5 N4 และ N3 โดยมีปริมาณเอ็นโดสปอร์เท่ากับ 1.10×10^8 1.38×10^8 1.40×10^8 1.43×10^8 2.48×10^8 และ 3.10×10^8สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การทดสอบสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร 6 สูตร พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารที่มีส่วนผสมของเศษปลาหมักผสมกับกากถั่วเหลืองอัตรา 1:1 (FFS) แบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ปริมาณสูงภายใน 5 วัน คือสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ถึง 2.1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

ดังนั้นสูตรอาหารทีเหมาะสมในการนำไปแปรรูปคือ สูตร FFS1 ซึ่งมีส่วนผสมที่ราคาถูก หาง่าย และใช้เวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียไม่นานมาก

2. การทดสอบความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ผลการทดลอง พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อในอาหาร N3 เป็นเวลา 360 วัน การเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 7.1×10^8 และ 9.7×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทั้งนี้โดยพบว่า การเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่ามากขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็จะทำให้ปริมาณการสร้างเอ็นโดสปอร์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ (ตารางที่ 3)

3. การทดสอบความทนทานของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทดสอบสามารถทนทานทั้งในสภาพอุณหภูมิต่ำ 8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร 5 สูตร โดยพบว่า เมื่อแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส แบคทีเรียยังคงมีชีวิตรอดถึงประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลดปริมาณลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจากการทดสอบการทนทานในสภาพอุณหภูมิสูง พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิซึ่งใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูก แบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยที่ปริมาณไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^7โคโลนีต่อมิลลิลิตร และในสภาพอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส แบคทีเรียก็ยังคงมีชีวิตรอดถึง 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4)

จากการทดลองนี้ การตรวจผลจำเป็นต้องใช้วิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี serial dilution plate method เพื่อตรวจสอบเซลที่มีชีวิตรอดเท่านั้น และจากลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ถ้าแบคทีเรียอยู่ในสภาพเป็นเซลและยังไม่สร้างเอ็นโดสปอร์ แบคทีเรียสามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส (http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/MM_404652038_12.doc) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเซลแบคทีเรียจะตายลงจนไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ โดยเฉพาะถ้าอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นการที่โคโลนีแบคทีเรียยังสามารถเจริญอยู่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส แสดงว่า เอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* เท่านั้นที่ยังทนต่อความร้อนและเจริญกลับมาเป็นเซลปกติได้ตามเดิม

4. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis*

4.1 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปของเหลว

4.1.1 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 4 เท่า

การทดลองแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยเติมหางนมลงไป 4 เท่า พบว่า หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลา 2-3 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง ปริมาณเซลมีชีวิตของ Bs ลดลงไม่มากนัก แต่หลังจาก 3 เดือน ปริมาณเซลแบคทีเรียที่มีชีวิตเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซลแบคทีเรียลดลงจาก 10^7 เป็น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร FFS1 ซึ่งไม่มีการแปรรูป พบว่า ปริมาณเซลแบคทีเรียยังมีปริมาณถึง 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

4.1.2 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า

การทดลองแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยลดปริมาณหางนมลง 2 เท่า ผลการทดลอง พบว่า หลังการเก็บ 1 เดือน ปริมาณเซลมีชีวิตของแบคทีเรีย Bs ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วเพิ่มปริมาณเป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 จากนั้นลดลง เหลือ10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเดือนที่ 3 และ4 และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าปริมาณเซลที่มีชีวิตของ Bs กลับเพิ่มขึ้นเป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณเท่ากับในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร FFS1 ที่ไม่มีการเติมหางนม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยง Bs ในอาหารPSB ที่เติมหางนมลงไป 2 เท่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ครบ 5 เดือนปริมาณ Bs ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร(ตารางที่ 7)

4.2 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

จากการทดลอง พบว่า การแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยใช้ ทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารพาหะ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมคือผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากแบคทีเรียที่ล้างบนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ พบว่า ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นไม่แตกต่างกัน คือเท่ากับ 10^8 cfu/ml. แต่เมื่อเก็บไว้ 5 เดือน พบว่า ไม่พบปริมาณเซลแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่กรรมวิธีที่แปรรูปจากการกระตุ้นเอ็นโดสปอร์ในอาหาร FFS1 ที่ใช้ทัลคัมและแป้งข้าวโพด ลดลงเหลือ 10^7 cfu/ml. (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการผลิต พบว่า การใช้แป้งข้าวโพดจะค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีความมันลื่น การเกาะติดในขั้นตอนการผสมเชื้อค่อนข้างยาก ใช้เวลานาน แต่ข้อดีคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ละลายน้ำได้ดีกว่าการใช้สารทัลคัม ไม่เหลือตะกอน และราคาไม่ต่างกัน

5. ศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

5.1. <u>ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เหลว</u>

ผลการทดลองเปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์เหลวที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs จากทั้ง 2 แหล่งเก็บ มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตรเป็น10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร และ10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิห้องและในตู้เย็น ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

5.2 <u>ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผง</u>

ผลการทดลองเปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ผงที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ผงเป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs จากทั้ง 2 แหล่งเก็บ ลดลงเท่า ๆ กัน คือ จากปริมาณเริ่มต้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เหลือ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 8)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ชนิดผง

<u>โดยวิธีการแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูก</u>

ในการทดสอบประสิทธิภาพผง ในโรงเรือน พบว่า ในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (C-) ปริมาณต้นขิงที่ปลูกเปรียบเทียบงอกเจริญเป็นต้นไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ทำการทดสอบอีก 2 ครั้ง ก็ยังประสบปัญหาเดิม จึงไม่สามารถตรวจผลได้ ในปีพ.ศ.2551 จะทำการทดสอบอีกครั้งโดยปรับวิธีการ โดยเพาะหัวพันธุ์ขิงให้งอกก่อนทดสอบ และ อีกส่วนหนึ่งจะไปทำการทดสอบในระดับแปลงปลูกที่จังหวัดลำปาง

ปีที่4 (ต.ค. 2551 – ก.ย. 2552)

1. เปรียบเทียบการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว (Bs)

ผลการทดลอง พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เหลวในสภาพอุณหภูมิปกติ เป็นเวลา 6 เดือน ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1ทั้งที่เติมหางนม (FFS1+SM)

และไม่เติมหางนม (FFS) ในการแปรรูป มีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB (PSB+SM) และพบว่า ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เหลว ของกรรมวิธีที่เลี้ยงในอาหาร FFS1 นั้นการเติมหางนมลงไปในการแปรรูป จะมีปริมาณแบคทีเรีย Bs ที่มีชีวิตรอดเท่ากับกรรมวิธีที่ไม่เติมหางนม เมื่อเก็บไว้ 6 เดือนในสภาพอุณหภูมิปกติ และการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่า การเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ (ตารางที่ 10)

2. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดลอง พบว่า หลังการทดสอบ 60 วัน กรรมวิธีการคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุดคือ 46.94% รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ และราดดินด้วย cell suspension ของ Bs โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 62.74 และ65.26 ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Control+) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 83.72 ทั้งนี้การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ (ตารางที่ 11)

3. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในแปลงปลูก

ผลการทดลอง พบว่า หลังการตรวจผลที่ 2 เดือนหลังการทดสอบ พบว่า กรรมวิธีที่แช่หัวพันธุ์ก่อนปลูก มีอัตราการเกิดโรคเหี่ยวต่ำ โดยการแช่หัวพันธุ์ในอัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 15.7 แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์สถิติ พบว่าทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ทั้งนี้การตรวจผลยังไม่สิ้นสุด และจะสรุปรวบรวม และวิเคราะห์ผลอีกครั้งหลังจากสิ้นสุดการเก็บเกี่ยวผลผลิต ประมาณเดือนกุมภาพันธ์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ปีที่ 1-3 (ต.ค. 2548 – ก.ย. 2551)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มีอาหารที่ช่วยกระตุ้นการการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B.subtilis* สูงสุด ได้แก่ N1 B N2 N5 N4 N3 และ FFS1 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงถึง10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสูตร N3 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงสุดถึง 3.10×10^8 แต่สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูปคือสูตร FFS1 เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด การเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็น

สภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรียทดสอบ และพบว่า แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถทนอุณหภูมิได้ต่ำถึง 8 องศาเซลเซียสและสูงถึง 100 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูกปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือที่อุณหภูมิห้อง 25±2 องศาเซลเซียส

การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงโดยใช้สารทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพาปริมาณเซลแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดหลังการเก็บ 7 เดือนไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณลดลงประมาณ 10 ล้านเซล ในขณะที่การแปรรูปจากแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ ไม่พบการรอดของเซลแบคทีเรีย *B.subtilis* หลังการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ 5 เดือน

การปรับวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยลดหางนมลง 2 เท่า พบว่า ปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีค่าไม่คงที่ แต่ปริมาณกลับเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น เมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือน และไม่มีความแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมหางนม แต่จะมีปริมาณมากกว่าในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร PSB

เปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติและในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยในสภาพอุณหภูมิปกติมีปริมาณมากกว่าที่เก็บในตู้เย็น แต่สำหรับผลิตภัณฑ์ผงปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอด มีปริมาณลดลงเท่ากันทั้ง 2 แหล่งเก็บ

การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผง จะทำการปรับวิธีการทดสอบในระดับโรงเรือนใหม่ในและจะทดสอบในระดับแปลงปลูกในปี พ.ศ.2551

ปีที่4 (ต.ค. 2551 – ก.ย. 2552)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* จากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 นั้น การเติมหางนมลงไปเป็นสารนำพาในผลิตภัณฑ์ ปริมาณการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียไม่แตกต่างกับการไม่เติมหางนม เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติเป็นเวลา 6 เดือน และพบว่า ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 มีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB การเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่า การเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในโรงเรือนทดลอง พบว่าการคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุด รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ และราดดินด้วย cell suspension ของ Bs และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

ทั้งนี้การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ

คำขอบคุณ

-

เอกสารอ้างอิง

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

Parry, J.M., P.C.B. Turnbull, and J.R. Gibson .1988. A Colot Atlas on Bacillus species. Wolfe Medical Publication Ltd. (http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_3_002c.asp?info_id=237)

Norris J.R., R.C.W. Berkeley, N.A. Logan, and A.G. O'Donnell. 1981. The genera *Bacillus* ana *Sporolactobacillus,* p. 1711-1742. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, vol. 2. Springer-Verlag, New York

Retrieve by http://www.splammo. net/bact102/102/bacillus.html

Retrieve by http://www. microbiogroup.com/BS1.htm

Retrieve by วาสนา กิตติกนกรัตน์, ไวรุจ เดชมหิธกุล และเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง, 2547, "*Study of Formulation and Shelf-life of Bacillus subtilis TISTR 001 Product*", The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, "Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology http://www.nowledge.biotec.or.th/doc_upload /200411495822 .doc

Retrieve by http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/MM_404652038_12.doc

Retrieve by เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง,2546 การปรับปรุงผลผลิตของกระบวนการหมักสปอร์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก http://dcms.thailis.or.th/dcms/basic.php?institute_code=54&option=show&bib=193&query=Bacteria%20&doc_type=0

ปีที่ 1-3 (**ต.ค.** 2548 – **ก.ย.** 2551)

ตารางที่ 1 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหาร 15 สูตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 240 360 และ 480 ชั่วโมง ตามลำดับ

สูตรอาหาร	ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่เวลาต่างๆ (สปอร์/มิลลิลิตร)		
	240 ชั่วโมง (10 วัน)	**360 ชั่วโมง (15 วัน)**	480 ชั่วโมง (20 วัน)
CA	0	1.02×10^{2}	**1.42×10^{2}**
MY	0	3.36×10^{2}	**5.70×10^{3}**
NGA	0	7.28×10^{3}	**2.60×10^{5}**
PSB	0	8.48×10^{3}	**3.00×10^{5}**
CPG	0	8.97×10^{3}	**7.00×10^{5}**
YP	0	1.36×10^{4}	**1.04×10^{6}**
NB	1.3×10^{2}	6.45×10^{4}	**1.46×10^{6}**
NTG	1.27×10^{2}	8.38×10^{4}	**2.00×10^{6}**
GMP	1.63×10^{2}	3.94×10^{5}	**1.04×10^{7}**
N1	2.23×10^{2}	7.33×10^{5}	**1.10×10^{8}**
B	2.46×10^{2}	8.26×10^{5}	**1.38×10^{8}**
N2	3.34×10^{2}	8.28×10^{5}	**1.40×10^{8}**
N5	3.36×10^{2}	8.63×10^{5}	**1.43×10^{8}**
N4	0	2.13×10^{6}	**2.48×10^{8}**
N3	**0**	**2.34×10^{6}**	**3.10×10^{8}**

ตารางที่ 2 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร 6 สูตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 72 และ120 ชั่วโมง ตามลำดับ

สูตรอาหาร	ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่เวลาต่างๆ (สปอร์/มิลลิลิตร)	
	72 ชั่วโมง (3 วัน)	120 ชั่วโมง (5 วัน)
FFS1	1.9×10^6	**2.1×10^8**
FFS2	1.1×10^6	**9.6×10^7**
FM1	1.2×10^6	**7.3×10^7**
FM2	8.5×10^5	**8.2×10^6**
SM1	8.1×10^5	**2.0×10^6**
SM2	**2.8×10^5**	**1.9×10^6**

ตารางที่ 3 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหาร N3 (Parry,J.M. และคณะ,1988) ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ เป็นเวลา 360 วัน ณ อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส)

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	**ปริมาณเอ็นโดสปอร์ (สปอร์/มิลลิลิตร)**
50	4.10×10^6
100	5.60×10^6
150	7.10×10^8
200	9.70×10^8

ตารางที่ 4 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอด ในอาหาร N3 (Parry,J.M.และคณะ,1988) ที่แช่ในน้ำอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

อุณหภูมิ (^{0}C)	**ปริมาณเอ็นโดสปอร์ (สปอร์/มิลลิลิตร)**
8	9.20×10^6
26	1.60×10^7
40	1.90×10^7
60	1.38×10^6
80	1.43×10^4
100	1.38×10^4

ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลวที่ใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงในอาหารเศษปลาหมักผสมกากถั่วเหลือง (FFS1) ที่ไม่มีการแปรรูป เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 5 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	ในอาหาร FFS1 +หางนม 4 เท่า	**ในอาหารFFS1**
0 [1/]	1.1×10^8	1.0×10^8
1	0.7×10^8	5.3×10^8
2	0.2×10^8	5.9×10^7
3	5.3×10^6	8.0×10^7
4	2.8×10^6	8.6×10^7
5	3.3×10^5	8.3×10^7

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 6 ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารทัลคัม และแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ก่อนแปรรูป เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 7 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**		
	ทัลคัม (อาหาร FFS1)[2/]	**แป้งข้าวโพด (อาหาร FFS1)**[2/]	**ทัลคัม (อาหาร PSA)**[3/]
0 [1/]	1.2×10^8	1.5×10^8	2.1×10^8
1	0.9×10^8	0.6×10^8	1.5×10^8
2	1.7×10^7	1.5×10^7	2.0×10^8
3	2.2×10^7	1.7×10^7	1.5×10^7
4	1.3×10^7	1.5×10^7	4.3×10^7
5	3.2×10^7	3.0×10^7	0
6	1.0×10^7	9.0×10^7	0
7	1.5×10^7	2.5×10^7	0

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป [2/] ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เลี้ยงบนอาหาร FFS1 ก่อนแปรรูป

[3/] ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ก่อนแปรรูป

ตารางที่ 7. ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลวที่ใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงในอาหารเศษปลาหมักผสมกากถั่วเหลือง (FFS1) ที่ไม่มีการแปรรูป และในอาหาร PSB เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 5 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**		
	ในอาหารFFS1 + หางนม 2 เท่า	**ในอาหารFFS1**	**ในอาหาร PSB + หางนม 2 เท่า**
0[1/]	5.3×10^8	5.5×10^8	8.5×10^8
1	1.0×10^7	8.3×10^8	1.0×10^6
2	7.5×10^8	4.0×10^8	2.0×10^5
3	1.0×10^7	5.0×10^9	4.0×10^6
4	5.0×10^7	1.1×10^{10}	1.0×10^7
5	6.1×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^7

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลว ที่เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) โดยใช้หางนม 2 เท่าเป็นสารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	อุณหภูมิปกติ (25±2 °C)	**อุณหภูมิตู้เย็น** (4 °C)
0[1/]	5.3×10^8	5.3×10^8
1	1.0×10^7	2.5×10^8
2	7.5×10^8	1.5×10^{10}
3	1.0×10^7	2.6×10^5
4	5.0×10^7	4.9×10^{10}
5	6.1×10^{10}	6.5×10^9

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดผง ที่

เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) โดยใช้ทัลคัมเป็นสารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	อุณหภูมิปกติ (25±2 °C)	**อุณหภูมิตู้เย็น** (4 °C)
0[1/]	6.7×10^8	6.7×10^8
1	6.0×10^8	1.2×10^8
2	7.5×10^7	1.5×10^8
3	2.2×10^7	1.7×10^7
4	4.3×10^7	1.1×10^7
5	1.0×10^7	1.7×10^7

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลว ที่เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) ที่เติมและไม่เติมหางนมเป็นสารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณเซล** *Bacillus subtilis* (cfu/ml.)					
	อุณหภูมิปกติ (25±2 °C)			**อุณหภูมิตู้เย็น** (4 °C)		
	FFS1+SM	FFS1	PSB+SM	FFS1+SM	FFS1	PSB+SM
0	1.4×10^9	1.7×10^9	1.0×10^9	1.4×10^9	1.7×10^9	1.0×10^9
1	4.0×10^8	2.0×10^8	1.0×10^7	1.0×10^7	6.0×10^6	3.6×10^7
2	1.0×10^7	9.0×10^7	5.0×10^6	4.0×10^7	1.1×10^7	2.1×10^7
3	5.0×10^7	2.0×10^7	5.0×10^6	1.0×10^7	3.0×10^6	1.2×10^7
4	2.0×10^7	7.0×10^8	8.0×10^6	9.0×10^6	8.0×10^7	3.2×10^6
5	5.0×10^7	8.2×10^8	4.0×10^6	8.5×10^6	3.0×10^7	2.0×10^6
6	1.5×10^7	9.0×10^7	5.0×10^6	2.0×10^6	1.0×10^7	2.0×10^6

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่ทดสอบการควบคุมด้วยผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ ที่ 15 30 45 และ60 วัน หลังการทดสอบ

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**			
	15 DAI	30 DAI	45 DAI	60 DAI
T1	34.88	44.44	45.83	46.94
T2	42.50	65.85	67.39	67.74
T3	43.53	56.32	67.77	68.26
T4	52.08	68.75	76.19	83.72
T5	0.00	0.00	0.00	0.00

ภาคผนวก

สูตรอาหารทดสอบ 15 สูตร

Malt-yeast extract (MY)

Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Peptone-calcium carbonate

Peptone	5	กรัม
$CaCO_3$	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

CPG

Casamino acid	1	กรัม
Peptone	10	กรัม
Glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NGA

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

PSB (wakimoto'broth)

Potato	300	กรัม
Sucrose	20	กรัม
$Ca(Na_3)_2 4H_2O$	0.5	กรัม
$NaHPO_4 . 12H_2O$	2	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

B

Yeast extract	1	กรัม
Beef extract	3	กรัม

Peptone	5	กรัม
$MnSO_4 . H_2O$	50	มิลลิกรัม
$CaCl_2 . 2H_2O$	100	มิลลิกรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	500	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

GMP

Glucose	15	กรัม
Peptone	6	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

YP

Yeast extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NB

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NTG

Glucose	20	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

N1 :Norris J.R และคณะ (1981)

Peptone	5	กรัม
Meat extract	3	กรัม
$Mn_2SO_4 . H_2O$	0.005	กรัม

	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
N2 : Parry J.M และคณะ (1988)			
	$Mn_2SO_4.H_2O$	0.03	กรัม
	KH_2PO_4	0.25	กรัม
	Beef extract	3	กรัม
	Peptone	5	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
N3 : Parry J.M และคณะ (1988)			
	Peptone	15	กรัม
	Yeast extract	3	กรัม
	NaCl	6	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
N4			
	$Ca(Na_3)_24H_2O$	0.5	กรัม
	$NaHPO_4.12H_2O$	2	กรัม
	Peptone	15	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
N5			
	$Ca(Na_3)_24H_2O$	0.5	กรัม
	$NaHPO_4.12H_2O$	0.5	กรัม
	Peptone	5	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
SM1	กากถั่วเหลือง	10	กรัม
	กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	10	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
SM2			
	กากถั่วเหลือง	10	กรัม
	กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	5.0	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
FM1			
	ปลาป่น	10	กรัม
	กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	10	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FM2

ปลาป่น	10	กรัม
โมลาสส์ (cane molass)	5.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FFS1

โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก)	10	มิลลิลิตร
กากถั่วเหลือง	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FFS2

โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก)	10	มิลลิลิตร
กากถั่วเหลือง	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

.....

Figure 1 *Bacillus subtilis* , on potato sucrose agar**,** 48 hours

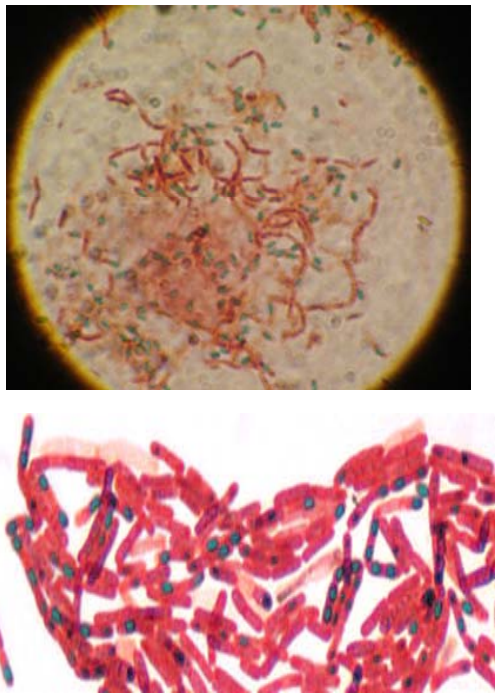

Figure 2 Endospore of *Bacillus subtilis* , malachite green stained (green color), 100 X

Figure 3 Liquid products of *Bacillus subtilis* endospore, skim milk added use for carrier

Figure 4 Wettable powder products of *Bacillus subtilis* endospore, talcum added use for carrier