หัวข้อเค้าโครงเรื่องของผลงาน
(สายงานวิชาการเกษตร)
(กรณีลักษณะงานวิจัย)

๑. ชื่อผลงาน ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และรูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

๒. บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ๒ สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Bacillus megaterium* NW ๗-A๓ และ*B. Subtilis* NT ๒-๒ ทดสอบการขยายเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว ๔ ชนิด ได้แก่ NB TSB MHB และ LB ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง ๒ สายพันธุ์ เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร TSB มีปริมาณเชื้อสูงสุดที่ ๒๔ ชั่วโมง และเมื่อนำจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง ๒ สายพันธุ์มาทดสอบการอยู่ร่วมกันด้วยวิธี cross streak assay พบว่าเชื้อทั้งหมดไม่มีการสร้างสารปฏิชีวนะต่อกัน สามารถอยู่ร่วมกันได้ จึงได้เลือก *B. megaterium* NW ๗-A๓ และ *B. subtilis* NT ๒-๒ ซึ่งมีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีการ subculture มาศึกษาการทำรูปแบบผลิตภัณฑ์ รูปแบบผงแห้งผสมกับวัสดุรองรับทัลคัมและคาโอลิน ส่วนรูปแบบน้ำจะใส่สารปกป้องเซลล์ ประกอบด้วย โพลีไวนิลไพโรลิโดน ๒ เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ๒ เปอร์เซ็นต์ และทรีฮาโรส ๑๐ mM โดยจุลินทรีย์ทั้ง ๒ สายพันธุ์อยู่รอดได้ดีที่สุดรูปแบบผงแห้งผสมกับวัสดุรองรับทัลคัมและคาโอลิน โดย *B. megaterium* NW ๗-A๓ เริ่มต้นมีค่าประมาณ ๕.๑๓ x๑๐^{๑๔} และ ๔.๕ x๑๐^{๑๔} CFUต่อกรัม ตามลำดับ ลดลงเหลือ ๕.๖ x๑๐^{๖} และ ๔.๙x๑๐^{๖} CFUต่อกรัม ตามลำดับในวันที่ ๑๘๐ ส่วน *B. subtilis* NT๒/๒ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น ๔.๔๓ x๑๐^{๑๔} และ๔.๓๗ x๑๐^{๑๔} CFUต่อกรัม ลดลงเหลือ ๓.๕ x๑๐^{๖} และ ๓.๑ x๑๐^{๖} CFUต่อกรัม ตามลำดับ ในวันที่ ๑๘๐ จากนั้นนำมาทดสอบวิธีการใช้เชื้อและอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ทั้งหมด ๑๐ ตำรับทดลอง ได้แก่ ตำรับทดลองที่ ๑ ควบคุม ตำรับทดลองที่ ๒ ไส้เดือนฝอยรากปม ตำรับทดลองที่ ๓ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับอะบาเม็กติน ละลาย ๐.๒ มิลลิลิตรต่อน้ำ ๑๕๐ มิลลิลิตร ใส่รองก้นหลุม ๕๐ มิลลิลิตร ตำรับทดลองที่ ๔ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รองก้นหลุม ๓ กรัม ตำรับทดลองที่ ๕ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รองก้นหลุม ๕ กรัม ตำรับทดลองที่ ๖ ไส้เดือนฝอยรากปม ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รองก้นหลุม ๗ กรัม ตำรับทดลองที่ ๗ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับอะบาเม็กติน ตำรับทดลองที่ ๘ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๕๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร ตำรับทดลองที่ ๙ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๑๐๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร และตำรับทดลองที่ ๑๐ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๒๐๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร โดยตำรับที่ ๗ - ๑๐ ราดลงในดิน ๕๐ มิลลิลิตร ทุก ๒ สัปดาห์ โดยตำรับทดลองที่ ๕ และ ๖ ใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบรองก้นหลุม มีระดับความรุนแรงของการเกิดปมที่ระบบรากระดับ ๐ ซึ่งไม่แตกต่างจากตำรับการทดลองควบคุม ส่วนตำรับการทดลองที่ ๙ และ ๑๐ ใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบราดลงดิน มีระดับความรุนแรงของการเกิดปมที่ระบบรากระดับ ๒ เท่ากับการใช้สารอะบาเม็กตินในตำรับที่ ๗ ซึ่งปริมาณปมที่รากจะมีความสัมพันธ์กับความสูงต้นที่เพิ่มขึ้น และน้ำหนักสด แบบแปรผกผันกัน แต่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักรากแบบแปรผันตามกัน ขณะที่การใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบราดลงดินจะควบคุมปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมระยะเข้าทำลายในดินให้ลดลง

๓. หลักการและเหตุผล

ไส้เดือนฝอยรากปมนับว่าเป็นศัตรูพืชที่สำคัญในพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ เช่น พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชไร่ และทำความเสียหายให้กับพืชมากมายในหลายพื้นที่ทุกภาคของประเทศ ซึ่งในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชดังกล่าว การใช้สารเคมีเป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากกว่าวิธีการอื่นๆ อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปสารเคมีกำจัดศัตรูพืชถ้าเกษตรกรมีการใช้ในปริมาณมากและไม่ถูกวิธี จะส่งผลกระทบต่อผู้ผลิต คือ เกษตรกร และอาจมีการตกค้างในผลผลิตก็จะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และเมื่อตกค้างในสิ่งแวดล้อมก็จะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในระบบนิเวศน์ด้วย นอกจากนี้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเป็นปัจจัยการผลิตซึ่งส่วนใหญ่มีราคาแพง และมีการนำเข้าจากต่างประเทศ สำหรับการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีหลายวิธีการ เช่น การใช้สารเคมี การเขตกรรม และการใช้ชีววิธี อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันกำจัดเพียงวิธีใดวิธีหนึ่งดังกล่าว ยังไม่สามารถควบคุมหรือหยุดการระบาดของไส้เดือนฝอยได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากไส้เดือนฝอยมีพืชอาศัยกว้าง โดยพบว่ามีพืชอาศัยมากกว่า ๒,๐๐๐ ชนิด รวมทั้งมีวงจรชีวิตสั้น และตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถสร้างไข่และฟักเป็นตัวอ่อนได้จำนวนมาก ดังนั้นการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมจึงควรมุ่งเน้นวิธีการจัดการอย่างเป็นระบบ และเลือกวิธีการที่มีประสิทธิภาพในแต่ละชนิดพืชและสภาพแวดล้อม รวมทั้งมีความปลอดภัย และลดต้นทุนการผลิต และสามารถควบคุมให้อยู่ในระดับที่ไม่ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืชได้ (damage threshold)

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมเป็นวิธีการควบคุมศัตรูพืชแบบชีววิธี ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัย โดยปัจจุบันมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งแบคทีเรีย และเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม นอกจากนี้ในการนำมาใช้ในระดับพื้นที่ ได้มีการพัฒนาและผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชรูปแบบต่างๆ เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวก และปลอดภัย แต่การผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เพื่อให้สามารถนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น ต้องคำนึงถึงระยะเวลาการเก็บรักษาและความมีชีวิตของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ รวมถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ด้วย ดังนั้นการเลือกใช้วัสดุรองรับซึ่งเป็นส่วนผสมกับจุลินทรีย์ และวิธีการผลิตที่เหมาะสมจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพต่อการนำไปใช้ประโยชน์ วัสดุรองรับที่นิยมใช้ ได้แก่ ปุ๋ยหมัก พีทมอส เพอร์ไลท์ และซีโอไลท์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการผลิตผลิตภัณฑ์ในรูปแบบตรึงเซลล์โดยใช้สารประกอบแอลจีเนต (alginate) ซึ่งจากการศึกษาของ Lian *et al*. (๒๐๐๓) ทำการห่อหุ้มเซลล์ *B. longum* B๖ และ *B. infantis* CCRC๑๔๖๓๓ ด้วยวัสดุรองรับที่แตกต่างกัน ได้แก่ กัมอารบิก เจลาติน แป้งมันสำปะหลัง และนมขาดมันเนย พบว่าการมีมีชีวิตรอดของ *B. longum* B๖ และ *B. infantis* CCRC๑๔๖๓๓ ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยมันสำปะหลัง มีชีวิตรอดสูงสุด ๙๕.๔๗ และ ๙๒.๗๐ เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นจึงควรศึกษาวัสดุรองรับและวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยที่เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดได้สูง เพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา เพื่อให้มีการนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ในระดับแปลงมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นนวัตกรรมผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอย่างปลอดภัยต่อไป

๔. วัตถุประสงค์

๔.๑ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

๔.๒ ศึกษาวัสดุรองรับและวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ และระยะเวลาในการเก็บรักษา

๔.๓ ศึกษาอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยในมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนทดลอง

๕. ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา ตุลาคม ๒๕๖๒ – กันยายน ๒๕๖๔

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ และโรงเรือนทดลอง กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

๖. ผู้ดำเนินการ

๖.๑ นางสาวดารารัตน์ โฮตาก้า ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ มีหน้าที่ รวบรวมข้อมูล งานวิจัย ดำเนินงานวิจัย รายงานผลการดำเนินงาน ปฏิบัติงานร้อยละ ๘๐

๖.๒ นางนวลจันทร์ ชะบา ตำแหน่ง ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน มีหน้าที่ ช่วยดำเนินงาน และวิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัย ปฏิบัติงานร้อยละ ๑๐

๖.๓ นางสาวพนิดา ปรีเปรมโมทย์ ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ มีหน้าที่ ช่วยดำเนินงาน และวิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัย ร้อยละ ๑๐

๗. อุปกรณ์การทดลอง

๗.๑ อุปกรณ์สำหรับการแยกไส้เดือนฝอยจากดินด้วยวิธี Baermann funnel (Baermann, ๑๙๑๗)

๗.๑.๑ กรวยแก้ว

๗.๑.๒ ซิลิโคนสำหรับสวมปลายกรวยแก้ว

๗.๑.๓ อุปกรณ์สำหรับเปิดปิดซิลิโคน

๗.๑.๔ ขาตั้งกรวยแก้ว

๗.๑.๕ ผ้าขาวบาง

๗.๑.๖ สารละลาย NaCl

๗.๒ อุปกรณ์สำหรับการแยกไส้เดือนฝอยจากดินด้วยวิธี Extraction (Oostenbrink, ๑๙๖๐)

๗.๒.๑ Extraction sieve ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๑๖ ซม. ๒๕๐ ไมครอน ๑๖๕ ไมครอน

๗.๒.๒ บีกเกอร์พลาสติกขนาด ๒ ลิตร

๗.๒.๓ บีกเกอร์แก้วขนาด ๑๐๐ มล. ๕๐ มล. ๒๕ มล.

๗.๒.๔ จานแก้วหรือจานพลาสติกตีตารางที่ก้น

๗.๒.๕ ปิเปต

๗.๓ กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope

๗.๔ อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) และ Nutrient Agar (NA)

๗.๕ อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) และ Tryptic soy agar (TSA)

๗.๖ อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth (MH)

๗.๗ อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

๗.๘ อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB)

๗.๙ เพลทแก้ว (petri-dish)

๗.๑๐ หลอดทดลอง (test tube)

๗.๑๑ ขวดแก้วรูปชมพู่ (erlinmeyer flask)

๗.๑๒ เครื่องผสม (mixer)

๗.๑๓ เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

๗.๑๔ เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge)

๗.๑๕ ผงทัลคัม (talcum)

๗.๑๖ ผงคาโอลิน (kaolin)

๗.๑๗ โพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone)

๗.๑๘ กลีเซอรอล (glycerol)

๗.๑๙ ทรีฮาโรส (trehalose)

๗.๒๐ ถุงเก็บตัวอย่างดินและพืชสำหรับวิเคราะห์

๗.๒๑ กระถาง

๗.๒๒ ช้อนปลูก

๗.๒๓ เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

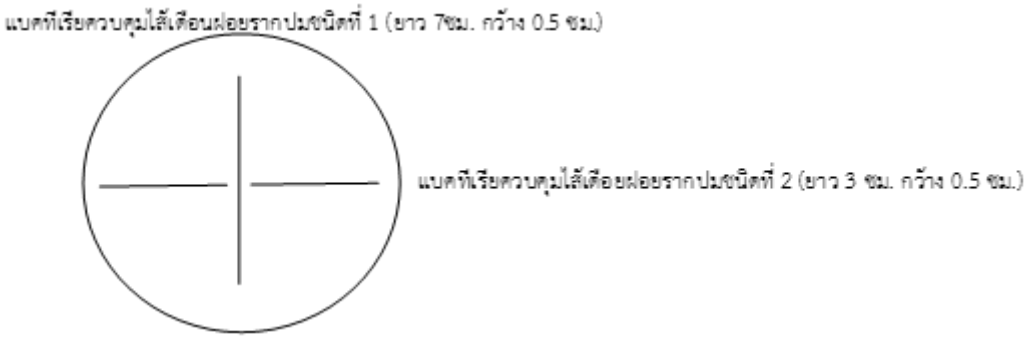
๗.๒๔ ปุ๋ยเคมี

๘. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน

การดำเนินการวิจัย ประกอบด้วย ๔ การทดลอง ดังนี้

๘.๑ การทดลองที่ ๑ ศึกษาการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอย

๑) นำแบคทีเรียที่ได้จากการแยกและคัดเลือกจากโครงการวิจัยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ประกอบด้วย แบคทีเรีย ๒ สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* NT๒/๒ และ *B. megaterium* NW ๗-A๓ มาทดสอบการอยู่ร่วมกัน ด้วยการทดสอบ antibiotic activity หรือการอยู่ร่วมกันได้โดยวิธี cross streak assay บนอาหาร nutrient agar โดยการขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยขีดเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่ ๑ ซึ่งต้องการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒ วัน จากนั้นขีดเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่ ๒ ในแนวขวาง ดังภาพ ที่ ๑



ภาพที่ ๑ การทดสอบการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรีย ๒ สายพันธุ์

๒) การบันทึกข้อมูล สังเกตส่วนใสระหว่าง แบคทีเรียควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง ๒ ชนิด กรณีปรากฏส่วนใสอยู่ระหว่างแบคทีเรียทั้ง ๒ ชนิด แสดงว่าแบคทีเรียชนิดที่ ๑ สร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโต หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ต่อแบคทีเรียชนิดที่ ๒ กรณีไม่ปรากฏส่วนใสแบคทีเรียทั้ง ๒ ชนิดจะสามารถเจริญอยู่ร่วมกันได้ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ในลักษณะเชื้อผสมได้

๘.๒ การทดลองที่ ๒ ศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและขยายเชื้อของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

๘.๒.๑ นำแบคทีเรีย ๒ สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* NT๒/๒ และ *B. megaterium* NW ๗-A๓ โดยการเปรียบเทียบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและขยายเชื้อของจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วย ๔ ตำรับการทดลอง ๕ ซ้ำ ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ ๑ อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

ตำรับการทดลองที่ ๒ อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB)
ตำรับการทดลองที่ ๓ อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth (MHB)
ตำรับการทดลองที่ ๔ อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB)

๘.๒.๒ เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งแบบเอียง nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๒ วัน เขี่ยเชื้อจำนวน ๑ ลูป นำไปเลี้ยงในอาหาร NB บรรจุในขวดรูปชมพู่ (flask) นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว ๑๒๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๘ - ๑๐ ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่น (obtical density/OD) ที่ความยาวคลื่น ๖๐๐ นาโนเมตร ให้ได้ ๐.๓ ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียประมาณ ๑x๑๐^{๖} CFUต่อมิลลิลิตร

๘.๒.๓ นำหัวเชื้อจากข้อ ๘.๒.๒ ปริมาตร ๑.๕ มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารตามนำรับการทดลองข้อ ๘.๒.๑ ปริมาตร ๑๕๐ มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว ๑๒๐ รอบต่อนาที วัดค่าความขุ่น (OD๖๐๐ nm) ที่ความยาวคลื่น ๖๐๐ นาโนเมตร ที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ ๒ ๘ ๑๐ และ ๒๔ ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี dilution spread plate count

๘.๓ การทดลองที่ ๓ ศึกษาวัสดุรองรับและรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอย

๘.๓.๑ วางแผนการทดลองแบบ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี ๕ ตำรับการทดลอง ๔ ซ้ำ

ตำรับการทดลองที่ ๑ รูปแบบผงแห้ง วัสดุรองรับผงทัลคัม (talcum)
ตำรับการทดลองที่ ๒ รูปแบบผงแห้ง วัสดุรองรับผงคาโอลิน (kaolin)
ตำรับการทดลองที่ ๓ รูปแบบน้ำ สารปกป้องเซลล์ โพลีไวนิลไพโรลิโดน ๒ เปอร์เซ็นต์
ตำรับการทดลองที่ ๔ รูปแบบน้ำ สารปกป้องเซลล์ กลีเซอรอล ๒ เปอร์เซ็นต์
ตำรับการทดลองที่ ๕ รูปแบบน้ำ สารป้องกันเซลล์ ทรีฮาโรส ๑๐ mM

๘.๓.๒ การทำผลิตภัณฑ์รูปแบบผงแห้ง เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหาร TSB ตามข้อ ๘.๒.๒ นำหัวเชื้อจากข้อ ๘.๒.๒ ปริมาตร ๒.๐ มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารข้อ TSB ในฟลาสก์ปริมาตร ๒๐๐ มิลลิลิตร ๒ ขวด นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว ๑๒๐ รอบต่อนาที จากนั้นนำสารละลายเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็ว ๑๐,๐๐๐ รอบต่อนาที อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนของแต่ละฟลาสก์มาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จะได้สารละลายเชื้อในน้ำกลั่น ๒๐๐ มิลลิลิตร มาผสมกับวัสดุรองรับผงทัลคัม และผงคาโอลิน แต่ละชนิด นำไปผึ่งให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ ๓๕ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๓ วัน เก็บใส่ถุงซิปล็อค

๘.๓.๓ การทำผลิตภัณฑ์รูปแบบน้ำ เตรียมสารปกป้องเซลล์ตามตำรับการทดลองที่ ๓ – ๕ ดังนี้ โพลีไวนิลไพโรลิโดน ๒ เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่น (v/v) กลีเซอรอล ๒ เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น (v/v) และทรีฮาโรส ๑๐ mM ในน้ำกลั่น ปริมาตร ๒๐๐ มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด ๕๐๐ มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เตรียมเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหาร TSB ตามข้อ ๘.๒.๒ นำหัวเชื้อจากข้อ ๘.๒.๒ ปริมาตร ๒.๐ มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร TSB ในฟลาสก์ปริมาตร ๒๐๐ มิลลิลิตร จำนวน ๒ ขวด นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว ๑๒๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็ว ๑๐,๐๐๐ รอบต่อนาที อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนของแต่ละฟลาสก์มาละลายในสารปกป้องเซลล์ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส

๘.๓.๔ การเก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์จากแต่ละรูปแบบผลิตภัณฑ์ วันที่ ๑๕ ๓๐ และทุก ๑ เดือน เป็นเวลา ๖ เดือน หรือจนกว่าปริมาณเชื้อจะต่ำกว่า ๑x๑๐^{๖} CFUต่อกรัม เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี dilution plate count method ด้วยอาหาร TSA

๘.๔ การทดลองที่ ๔ ศึกษาวิธีและอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในสภาพโรงเรือน

๘.๔.๑ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย ๑๐ ตำรับการทดลอง จำนวน ๓ ซ้ำ โดยการคัดเลือกรูปแบบผลิตภัณฑ์จากผลการทดลองที่ ๓ ในข้อ ๘.๓ ซึ่งใช้ชนิดวัสดุรองรับที่มีผลทำให้จุลินทรีย์อยู่รอด และยังคงประสิทธิภาพได้ดีที่สุด นำมาทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ ๑ ควบคุม (ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยรากปม และผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์)

ตำรับการทดลองที่ ๒ ไส้เดือนฝอยรากปม ไม่ใส่สารเคมีและผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

ตำรับการทดลองที่ ๓ ไส้เดือนฝอยรากปม + อะบาเม็กติน ละลาย ๐.๒ มิลลิลิตรต่อน้ำ ๑๕๐ มล. อัตรา ๕๐ มิลลิลิตรต่อกระถาง รองก้นหลุม

ตำรับการทดลองที่ ๔ ไส้เดือนฝอยรากปม + ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ๓ กรัมต่อกระถาง รองก้นหลุม

ตำรับการทดลองที่ ๕ ไส้เดือนฝอยรากปม + ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ๕ กรัมต่อกระถาง รองก้นหลุม

ตำรับการทดลองที่ ๖ ไส้เดือนฝอยรากปม + ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ๗ กรัมต่อกระถาง รองก้นหลุม

ตำรับการทดลองที่ ๗ ไส้เดือนฝอยรากปม + อะบาเม็กติน ละลาย ๐.๒ มิลลิลิตรต่อน้ำ ๑๕๐ มิลลิลิตร ราดลงดิน รอบโคนต้น ๕๐ มิลลิลิตรต่อกระถาง ทุก ๒ สัปดาห์

ตำรับการทดลองที่ ๘ ไส้เดือนฝอยรากปม + ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๕๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร ราดลงในดิน รอบโคนต้น ๕๐ มิลลิลิตรต่อกระถาง ทุก ๒ สัปดาห์

ตำรับการทดลองที่ ๙ ไส้เดือนฝอยรากปม + ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๑๐๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร ราดลงในดิน รอบโคนต้น ๕๐ มิลลิลิตรต่อกระถาง ทุก ๒ สัปดาห์

ตำรับการทดลองที่ ๑๐ ไส้เดือนฝอยรากปม + ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๒๐๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร ราดลงในดิน รอบโคนต้น ๕๐ มิลลิลิตรต่อกระถาง ทุก ๒ สัปดาห์

๘.๔.๒ การเตรียมดินปลูกสำหรับใช้ในตำรับการทดลอง และสำหรับขยายเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม

๑) นำดินร่อนผ่านตะแกรงขนาด ๒ มิลลิเมตร

๒) นำดินบรรจุในถุง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

๓) บรรจุในกระถาง ๕ กิโลกรัม

๘.๔.๓ การขยายเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม

๑) เก็บตัวอย่างดินจากแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม

๒) แยกไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายออกจากดินด้วยวิธี Extraction (Oostenbrink, ๑๙๖๐)

๓) นำสารละลายไส้เดือนฝอยรากปมระยะเข้าทำลายมานับปริมาณให้ได้ ๔๐๐ ตัวต่อน้ำ ๕๐ มิลลิลิตร

๔) นำดินจากข้อ ๘.๔.๒ ใส่ในกระถาง ปลูกต้นมะเขือเทศอายุ ๑ เดือน ประมาณ ๗ วัน จึงนำสารละลายไส้เดือนฝอยรากปมระยะเข้าทำลายจากข้อ ๓ ราดให้รอบโคนต้นมะเขือเทศ

๕) ดูแลให้น้ำต้นมะเขือเทศตามปกติ ไส้เดือนฝอยรากปมจะเข้าอาศัยในรากเจริญเป็นตัวเต็มวัย สืบพันธุ์ วางไข่ ขยายเพิ่มปริมาณในรากต้นมะเขือเทศ และระยะเข้าทำลายจะออกจากรากลงสู่ดินต่อไป

๘.๔.๔ เตรียมต้นกล้ามะเขือเทศ โดยการนำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ท้อ มาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิว ตามวิธีการของ Mohammmed และคณะ (๒๐๐๘) โดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ๐.๑ เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา ๓ นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ๓ ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะในถาดเพาะขนาด ๓๕x๕๕ เซนติเมตร (๗๒ หลุม) เพื่อเตรียมต้นกล้า หลังเพาะ ๒๑ วัน คัดเลือกต้นกล้าที่มีการเจริญเติบโตสม่ำเสมอ ย้ายมาปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๖ นิ้ว

๘.๔.๕ การใส่สารเคมี ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ และไส้เดือนฝอยรากปม

๑) รองก้นหลุม

- สารเคมีอะบาเม็กติน ละลาย ๐.๒ มิลลิลิตรต่อน้ำ ๑๕๐ มิลลิลิตร ใส่รองรองก้นหลุม หลุมละ ๕๐ มิลลิลิตร ในตำรับการทดลองที่ ๓
- ใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รองก้นหลุมอัตรา ๓ ๕ และ ๗ กรัมต่อกระถาง ในตำรับการทดลองที่ ๔ ๕ และ ๖ ตามลำดับ
- ใส่กล้ามะเขือเทศอายุ ๒๑ วัน ลงในหลุมปลูก
- ใส่ดินที่มีไส้เดือนฝอยรากปมระยะเข้าลายจากข้อ ๘.๔.๓ กระถางละ ๑๐๐ กรัม จำนวน ๘๐๐ ตัว รอบโคนต้น
- ใส่ดินที่ฆ่าเชื้อแล้วจากข้อ ๘.๔.๒ กลบและเกลี่ยดินให้ทั่วโคนต้น

๒) ระหว่างการเจริญเติบโต

- สารเคมีอะบาเม็กติน ละลาย ๐.๒ มิลลิลิตรต่อน้ำ ๑๕๐ มิลลิลิตร ราดรอบโคนต้น ๕๐ มิลลิลิตรต่อกระถาง ทุก ๒ สัปดาห์ ในตำรับการทดลองที่ ๗
- ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ อัตรา ๕๐ ๑๐๐ และ ๒๐๐ กรัมต่อน้ำ ๒๐ ลิตร ราดรอบโคนต้นต่อกระถาง ทุก ๒ สัปดาห์ ในตำรับการทดลองที่ ๘ ๙ และ ๑๐ ตามลำดับ

๘.๔.๖ การใส่ปุ๋ยเคมี

- ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร ๑๕-๑๕-๑๕ อัตรา ๘๐ กิโลกรัมต่อไร่ ที่ ๗ และ ๓๐ วัน
- ใส่ยูเรีย ๔๖-๐-๐ อัตรา ๒๐ กิโลกรัมต่อไร่ ที่ ๓๐ วัน

๘.๔.๗ การเก็บข้อมูล

๑) ข้อมูลดิน

เก็บตัวอย่างดินหลังย้ายปลูกลงกระถาง ๗ วัน (มะเขือเทศอายุ ๓๐ วัน) หลังย้ายปลูกลงกระถาง ๓๐ วัน (มะเขือเทศอายุ ๖๐ วัน) และหลังย้ายปลูกลงกระถาง ๖๐ วัน (มะเขือเทศอายุ ๙๐ วัน) เพื่อนับปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมระยะเข้าทำลาย

เก็บตัวอย่างดินหลังย้ายปลูกลงกระถาง ๖๐ วัน (มะเขือเทศอายุ ๙๐ วัน) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

๒) ข้อมูลพืช

หลังย้ายปลูกลงกระถาง ๗ วัน (มะเขือเทศอายุ ๓๐ วัน) วัดความสูงของต้นมะเขือเทศ แล้วจึงราดผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตามตำรับการทดลองครั้งที่ ๑

หลังย้ายปลูกลงกระถาง ๓๐ วัน (มะเขือเทศอายุ ๖๐ วัน) วัดความสูงของต้นมะเขือเทศ แล้วจึงราดผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตามตำรับการทดลองตามตำรับการทดลองครั้งที่ ๒

หลังย้ายปลูกลงกระถาง ๖๐ วัน (มะเขือเทศอายุ ๙๐ วัน) วัดความสูงของต้นมะเขือเทศ ชั่งน้ำหนักสดของต้นมะเขือเทศ เก็บส่วนรากเพื่อนับจำนวนปมนำมาวิเคราะห์ Gall index และลักษณะความหนาแน่นของการเกิดปมราก เพื่อวิเคราะห์ Zech scale ชั่งน้ำหนักราก ประเมินระดับความรุนแรงของโรค

(disease severity) ที่เกิดขึ้นกับระบบรากแต่ละกระถางโดยแบ่งเป็น ๐-๕ rating scale (Anwar *et al*., ๒๐๐๗) โดยให้คะแนนจำนวนปมต่อระบบรากดังนี้ ๐ = no galls, ๑ = ๑-๒ galls; ๒ = ๓-๑๐ galls; ๓ = ๑๑-๓๐ galls; ๔ = ๓๑-๑๐๐ galls และ ๕ = > ๑๐๐ galls (ตารางที่ ๑)

ตารางที่ ๑ ระดับความรุนแรงของการเข้าทำลายโดย *Meloidogyne* ในระบบราก

ระดับความรุนแรง	Root side secton profile (Zeck scale)	อัตราการเกิดปม	จำนวนปม
๐	0. No knots	๐	๐
๑	1. A few small, difficult-to-find knots 2. Small but clearly visible knots	๑-๒๕%	๑-๒
๒	3. Some visible larger knots but clean main roots 4. Mostly larger knots but clean main roots 5. 50% of roots knotted; knotting on part of main root system	๒๕-๕๐%	๓-๑๐
๓	6. Some knotting on main roots 7. Knotting on majority of main roots	๕๐-๗๕%	๑๑-๓๐
๔	8. Few clean roots visible; main roots knotted 9. Severe knotting on all roots; plant typically dying	๗๕-๙๐%	๓๑-๑๐๐
๕	10. Severe knotting on all roots/no roots left	๙๐-๑๐๐%	>๑๐๐

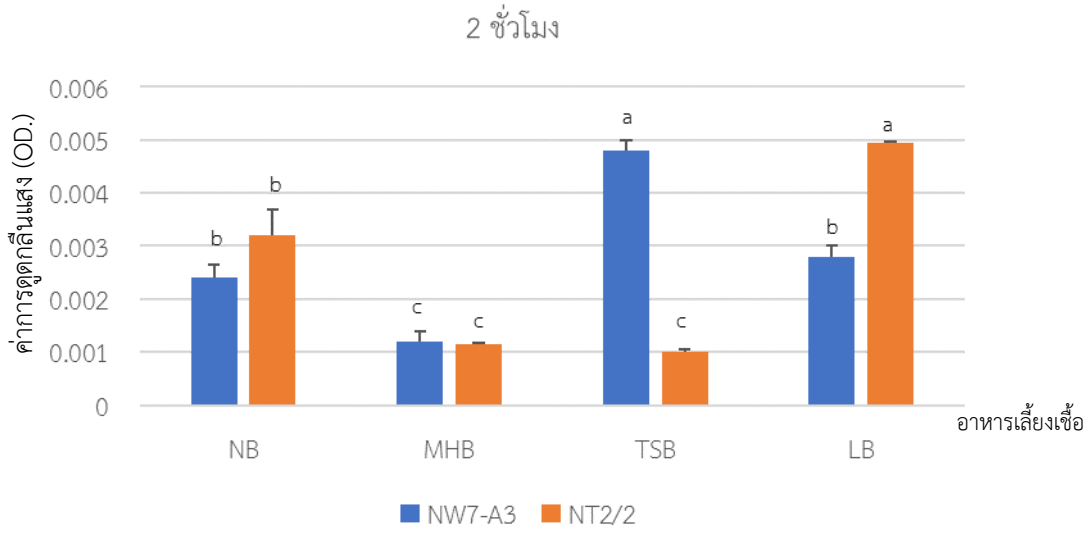
๙. ผลการทดลองและวิจารณ์

๙.๑ ศึกษาการอยู่รวมกันของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอย

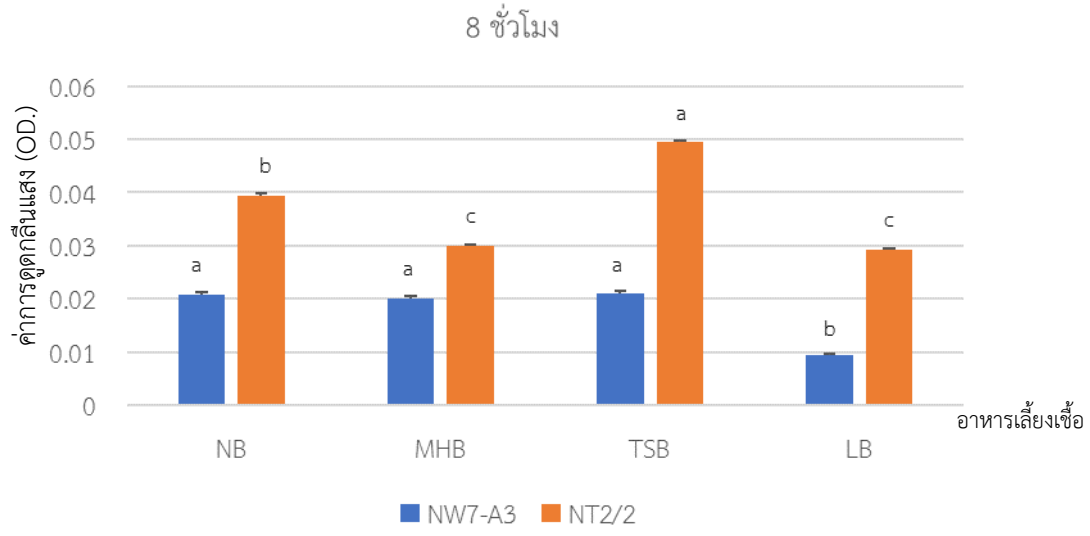
การทดสอบการอยู่รวมกันของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยทั้ง ๒ สายพันธุ์ โดยการตรวจสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic activity) ต่อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี cross streak assay บนอาหาร NA ซึ่งถ้าหากเกิดส่วนใส (clear zone) ระหว่างจุลินทรีย์แต่ละชนิดในแนวนอน แสดงว่ามีการสร้างสารปฏิชีวนะต่อต้านจุลินทรีย์อื่นๆ ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ไม่สามารถอยู่ร่วมกันได้ เช่น แบคทีเรียปฏิบักษ์ ที่ต่อต้านการเจริญของเชื้อโรคต่างๆ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus mutans* (Selthy and Behara, ๒๐๑๒) จากผลการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยทั้ง ๒ สายพันธุ์ ไม่มีการสร้างสารปฏิชีวนะต่อกัน สามารถอยู่ร่วมกันได้

๙.๒ ศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและขยายเชื้อของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ที่มีประสิทธิภาพที่คัดเลือกได้จากโครงการวิจัยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

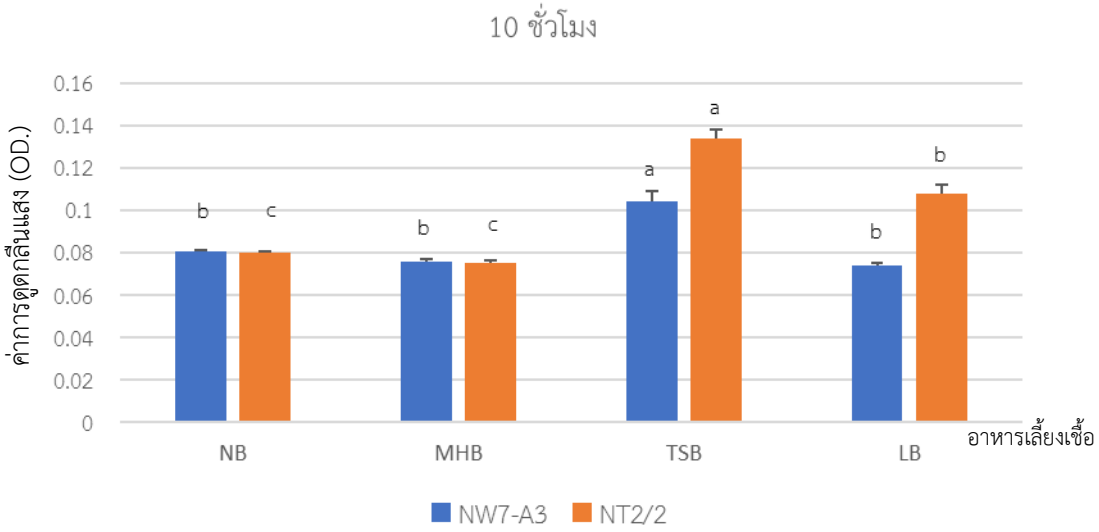
นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณ ๔ สูตรอาหารประกอบด้วย ตามตำรับการทดลอง ซึ่งสูตรอาหารทั้ง ๔ ชนิดนี้เป็นสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรียให้ได้ปริมาณมาก แต่ละสูตรมีส่วนประกอบของสารอาหารที่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะมีสารอินทรีย์ที่ได้จากสารสกัดจากเนื้อเยื่อพืช หรือสัตว์ จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีความต้องการสารอาหาร ตลอดจนสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหารแตกต่างกัน วัดการเจริญเติบโตที่ ๒ ๘ ๑๐ และ ๒๔ ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น ๖๐๐ นาโนเมตร เนื่องจากการวัดค่าความขุ่น (obtical density/OD) ในช่วงความยาวคลื่นนี้จะให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์และ OD เป็นกราฟเส้นตรงในช่วง OD ๐ - ๐.๔ ได้ผลดังภาพที่ ๒ – ๕ โดยพบว่าการเจริญของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ๒ สายพันธุ์ จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<๐.๐๕$) โดยจะเข้าสู่ช่วง log phase ที่ ๑๐ ชั่วโมง ไปจนถึง ที่ ๒๔ ชั่วโมง ซึ่งอาหารที่เชื้อทั้งสองชนิดเจริญได้ดีรองลงมาเรียงตามลำดับคือ MHB NB และ LB *B. megaterium* NW๗-A๓ เริ่มต้นเจริญในอาหาร TSB และ NB ได้ดี ส่วน *B. subtilis* NT๒/๒ เริ่มต้นเจริญในอาหาร LB ได้ดี และยังคงเจริญได้ดีในอาหารดังกล่าวจนถึง ๑๐ ชั่วโมง ที่ ๒๔ ชั่วโมง แบคทีเรียทั้งสองชนิดเจริญในอาหาร TSB ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ อาหาร MHB โดยอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยง *B. subtilis* รหัสเชื้อ NT ๒-๒ คือ TSB มีปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สูงสุด เท่ากับ ๒.๑๓ x๑๐^{๘} CFUต่อมิลลิลิตร ($log_{๑๐}$ = ๘.๓๖) โดย Valentine *et. al*., ๒๐๐๕ ได้รายงานการใช้อาหาร TSB ในการขยายเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* และ Chang, ๒๐๑๒ รายงานการใช้อาหาร TSB เลี้ยงเพิ่มปริมาณ *Bacillus* spp. และเพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ ขณะที่ *B. megaterium* NW๗-A๓ มีปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สูงสุด เท่ากับ ๒.๐๐ x๑๐^{๘} CFUต่อมิลลิลิตร ($log_{๑๐}$ = ๘.๓๐)



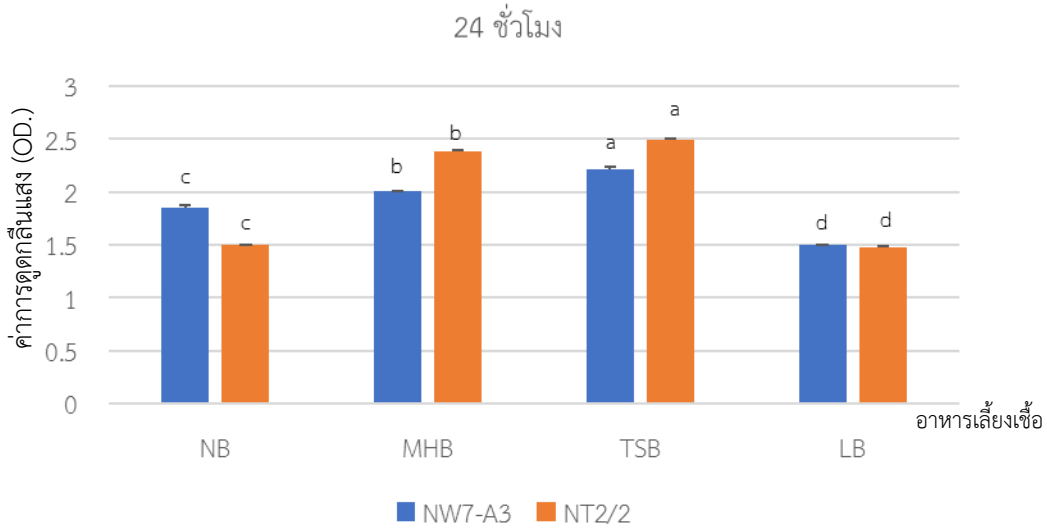
ภาพที่ ๒ วัดค่าการดูดกลืนแสงการเจริญของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่ ๒ ชั่วโมง



ภาพที่ ๓ วัดค่าการดูดกลืนแสงการเจริญของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่ ๘ ชั่วโมง



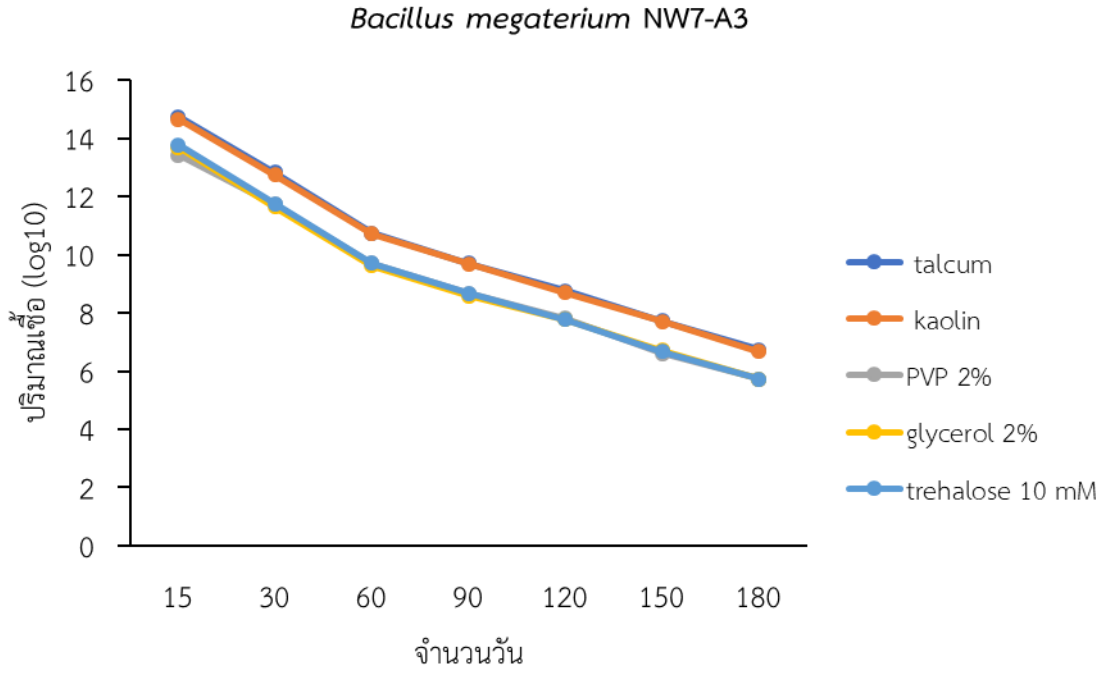
ภาพที่ ๔ วัดค่าการดูดกลืนแสงการเจริญของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่ ๑๐ ชั่วโมง



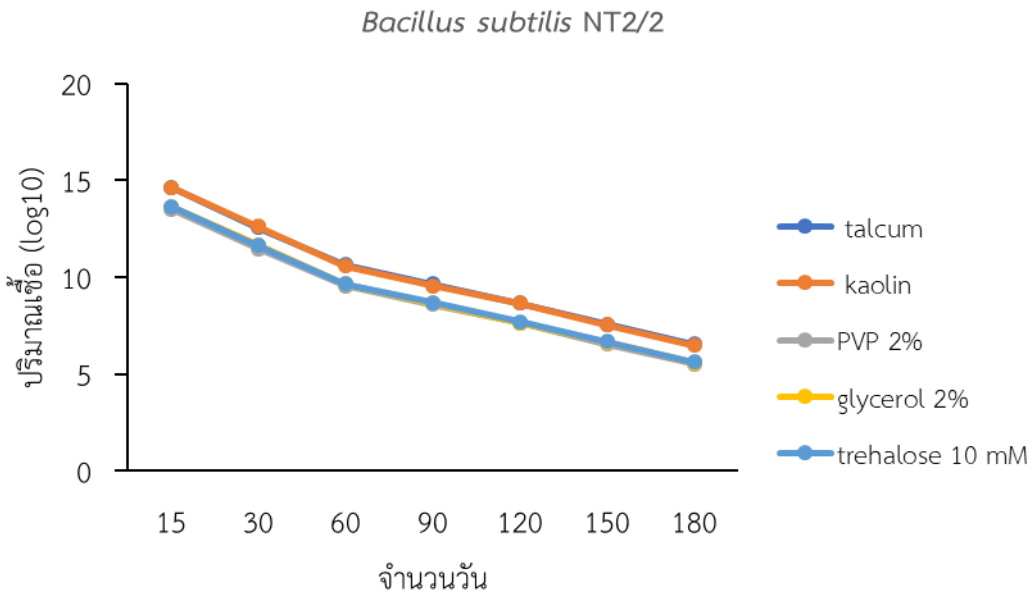
ภาพที่ ๕ วัดค่าการดูดกลืนแสงการเจริญของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่ ๒๔ ชั่วโมง

๙.๓ ศึกษาวัสดุรองรับและรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและขยายเชื้อของจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพที่สามารถขยายเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุด และอยู่ร่วมกันได้จากข้อ ๙.๑ และ ๙.๒

นำเชื้อ *B. megaterium* NW ๗-A๓ และ *B. subtilis* NT ๒-๒ มาทำรูปแบบผลิตภัณฑ์โดยขยายเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเหลว TSB เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง จากนั้นนำมาผสมกับวัสดุรองรับทัลคัมและคาโอลิน อัตราส่วนสารละลายเชื้อ ๔๐ มิลลิลิตร ต่อทัลคัม หรือคาโอลิน ๑๐๐ กรัม ส่วนในรูปแบบน้ำ นำโพลีไวนิลไพโรลิโดน ๒ เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ๒ เปอร์เซ็นต์ และ ทรีฮาโรส ๑๐ mM ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส ตรวจการอยู่รอดของเชื้อทั้ง ๒ ชนิด วันที่ ๑๕ ๓๐ ๖๐ ๙๐ ๑๒๐ ๑๕๐ และ ๑๘๐ วัน ซึ่งได้ผลดังภาพที่ ๗ และ ๘ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถอยู่รอดในรูปแบบผงแห้งได้ดีกว่ารูปแบบน้ำ โดยอัตราการอยู่รอดในการผสมวัสดุรองรับทัลคัม และคาโอลิน มีอัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกัน โดยปริมาณเชื้อ *B. megaterium* NW๗-A๓ ที่ผสมกับวัสดุรองรับทัลคัม และคาโอลิน เริ่มต้นมีค่าประมาณ ๕.๑๓ x๑๐^{๑๔} และ ๔.๕ x๑๐^{๑๔} CFUต่อกรัม ตามลำดับ ลดลงเหลือ ๕.๖ x๑๐^{๖} และ ๔.๙x๑๐^{๖} CFUต่อกรัม ตามลำดับในวันที่ ๑๘๐ ส่วน *B. subtilis* NT๒/๒ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น ๔.๔๓ x๑๐^{๑๔} และ ๔.๓๗ x๑๐^{๑๔} CFUต่อกรัม ลดลงเหลือ ๓.๕ x๑๐^{๖} และ ๓.๑ x๑๐^{๖} CFUต่อกรัม ตามลำดับ ในวันที่ ๑๘๐ ขณะที่ในรูปแบบน้ำ เชื้อทั้ง ๒ ชนิดอยู่รอดในสารละลายเชื้อที่ผสมทรีฮาโรส ๑๐ mM ได้ดีที่สุด



ภาพที่ ๗ ปริมาณเชื้อ *B. megaterium* NW๗-A๓ ที่เก็บในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ



ภาพที่ ๘ ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* NT๒/๒ ที่เก็บในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ

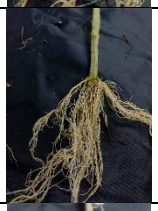
๙.๔ ศึกษาวิธีการใช้เชื้อและอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

การทดสอบวิธีการใช้เชื้อและอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ทั้งหมด ๑๐ ตำรับทดลอง ได้แก่ ตำรับทดลองที่ ๑ ควบคุม (ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยรากปม และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์) ตำรับทดลองที่ ๒ ใส่ไส้เดือนฝอยรากปม ตำรับทดลองที่ ๓ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับอะบาเม็กติน ละลาย ๐.๒ มิลลิลิตรต่อน้ำ ๑๕๐ มิลลิลิตร ใส่รองก้นหลุม กระถางละ ๕๐ มิลลิลิตร ตำรับทดลองที่ ๔ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รองก้นหลุม ๓ กรัม ตำรับทดลองที่ ๕ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รองก้นหลุม ๕ กรัม ตำรับทดลองที่ ๖ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รองก้นหลุม ๗ กรัม ตำรับทดลองที่ ๗ ใส่ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับอะบาเม็กติน ละลาย ๐.๒ มล.ต่อน้ำ ๑๕๐

มล. ราดลงดิน รอบโคนต้น ๕๐ มล. ทุก ๒ สัปดาห์ ตำรับทดลองที่ ๘ ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๕๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร ราดลงในดิน รอบโคนต้น ๕๐ มล. ทุก ๒ สัปดาห์ ตำรับทดลองที่ ๙ ใส่ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๑๐๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร ราดลงในดิน รอบโคนต้น ๕๐ มล. ทุก ๒ สัปดาห์ และตำรับทดลองที่ ๑๐ ใส่ไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๒๐๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร ราดลงในดิน รอบโคนต้น ๕๐ มิลลิลิตร ทุก ๒ สัปดาห์ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ ๙๐ วันหลังย้ายปลูก เก็บผลผลิตโดยวัดความสูงของต้นมะเขือเทศ น้ำหนักสด ตัดส่วนรากเพื่อชั่งน้ำหนัก และประเมินระดับความรุนแรงของโรค (disease severity) ที่เกิดขึ้นกับระบบรากแต่ละกระถาง โดยการนับจำนวนปมที่ระบบรากซึ่งเกิดจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* เข้าไปอยู่อาศัย หลั่งสารที่ทำให้เซลล์รากพืชขยายขนาด และประเมินให้คะแนนจากปริมาณปมที่ระบบราก แบ่งเป็น ๐-๕ rating scale (Anwar et al., ๒๐๐๗) โดยให้คะแนนจำนวนปมต่อระบบรากดังนี้ ๐ = no galls, ๑ = ๑ - ๒ galls; ๒ = ๓ - ๑๐ galls; ๓ = ๑๑ - ๓๐ galls; ๔ = ๓๑ - ๑๐๐ galls และ ๕ = > ๑๐๐ galls ดังตารางที่ ๓

ตารางที่ ๓ การประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดปมรากจากจำนวนปม อัตราการเกิดปม และลักษณะปริมาณของปมที่ระบบราก (Zeck scale)

ตำรับทดลอง	ระดับความรุนแรง	Root side secton profile (Zeck scale)	อัตราการเกิดปม	จำนวนปมเฉลี่ย
๑	๐		๐%	๐.๐๐
๒	๓		๕๐-๗๕%	๒๑.๐๐
๓	๒		๑-๒๕%	๑๐.๙๔
๔	๐		๐%	๐.๘๐
๕	๐		๐%	๐.๕๖

๖	๐		๐%	๐.๑๑
๗	๒		๒๕-๕๐%	๕.๐๐
๘	๓		๕๐-๗๕%	๑๙.๐๐
๙	๒		๒๕-๕๐%	๑๐.๑๗
๑๐	๒		๒๕-๕๐%	๕.๐๐

จากตารางที่ ๓ พบว่า ตำรับทดลองที่ ๒ ซึ่งไม่มีการใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มีระดับความรุนแรงที่ ๓ มีจำนวนปมเฉลี่ย ๒๑ รองลงมาคือ ตำรับทดลองที่ ๘ ใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อัตรา ๕๐ กรัม ละลายน้ำ ๒๐ ลิตร ราดลงดิน ซึ่งปริมาณที่ใส่จะมีความเข้มข้นของเชื้อน้อยที่สุด ประมาณ ๑x๑๐^{๗} CFUต่อมิลลิลิตร ขณะที่ตำรับทดลองที่ ๙ และ ๑๐ ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ ๑x๑๐^{๘} CFUต่อมิลลิลิตร และ ๑x๑๐^{๙}CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานของ Ozdemir and Gozel, ๒๐๑๘ ซึ่งได้ทดสอบการใช้ essential oil ซึ่งสกัดจากพืชชนิดต่างๆ โดยเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นระดับความรุนแรงจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมจึงจะลดลง ในตำรับทดลองที่ ๔ ๕ และ ๖ ที่มีการรองก้นหลุมด้วยผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ อัตรา ๓ ๕ และ ๗ กรัมตามลำดับ พบระดับความรุนแรงของการเกิดปมที่ระบบรากเท่ากับ ๐ ซึ่งน้อยกว่าการใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบราดลงดิน แสดงว่าการควบคุมการเกิดปมรากจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* ควรจัดการเริ่มจากการป้องกันการเข้าทำลาย โดยการใส่ชีวภัณฑ์รองก้นหลุมเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของระยะเข้าทำลาย หลังจากนั้นหากยังพบการระบาดสามารถควบคุมกำจัดได้โดยการใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบราดลงดิน สำหรับการใส่สารเคมีอะบาเม็กตินแบบรองก้นหลุมในตำรับทดลองที่ ๓ และแบบราดลงดินในตำรับทดลองที่ ๗ มีระดับความรุนแรงของการเกิดปมเท่ากับการใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบรองก้นหลุมตำรับทดลองที่ ๔ และแบบราดลงดินในตำรับทดลองที่ ๙ และ ๑๐ แต่รุนแรงมากกว่าการใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบรองก้นหลุมตำรับทดลองที่ ๕ และ ๖ ในตำรับทดลองที่ ๑ ที่เป็นตำรับควบคุมนั้นไม่พบการเกิดปมที่ระบบราก

จำนวนปม และค่า Gall index (ตารางที่ ๔) ของแต่ละตำรับการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<๐.๐๕) โดยตำรับการทดลองที่ ๔ ๕ และ ๖ ไม่แตกต่างจากตำรับการทดลองที่ ๑ ที่ไม่ได้ใส่ไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งแสดงว่าการใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบรองก้นหลุมตั้งแต่ตอนเตรียมดินก่อน

ปลูก สามารถป้องกันการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในรากต้นมะเขือเทศได้ ส่วนการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบราดลงดินที่ความเข้มข้นสูงสุด (ตำรับการทดลองที่ ๑๐) มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมได้รองลงมาจากการใช้แบบรองก้นหลุม และไม่แตกต่างจากการใช้สารอะบาเม็กตินแบบราดลงดิน ความสูงของต้นมะเขือเทศที่เพิ่มขึ้น และน้ำหนักสดในตำรับการทดลองที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบรองก้นหลุมที่อัตรา ๕ และ ๗ กรัม จะมีความสูงเพิ่มขึ้นแตกต่างจากตำรับการทดลองอื่นๆ ส่วนน้ำหนักรากในแต่ละตำรับการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ ๔ ความสูงต้นที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักสด และน้ำหนักราก

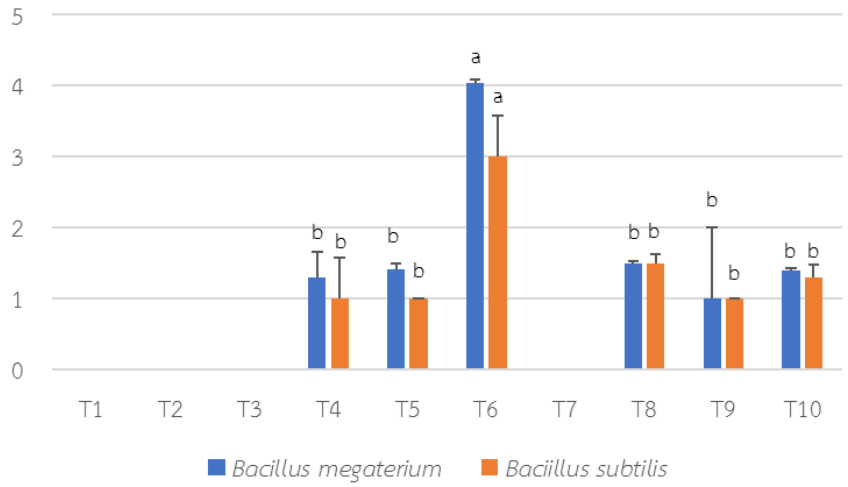
ตำรับการทดลอง	ความสูงต้นที่เพิ่มขึ้น (ซม.)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักราก (กรัม)	จำนวนปม (ปม)	Gall index
๑	๒๐.๔๐ bc	๙.๘๖ ab	๒.๒๔	๐.๐๐ a	๐.๐๐ a
๒	๑๕.๐๓ c	๑๐.๐๒ ab	๔.๓๒	๒๑.๐๐ c	๓.๐๐ c
๓	๒๔.๑๐ abc	๙.๐๔ ab	๒.๕๓	๑๐.๙๔ b	๒.๖๗ bc
๔	๑๓.๘๑ c	๕.๖๑ b	๒.๒๖	๐.๘๐ a	๐.๓๓ a
๕	๒๖.๘๖ abc	๑๐.๑๗ ab	๒.๘๒	๐.๕๖ a	๐.๐๐ a
๖	๓๘.๐๒ a	๑๕.๕๑ a	๓.๒๑	๐.๑๑ a	๐.๐๐ a
๗	๓๙.๗๐ a	๑๕.๑๐ a	๓.๔๑	๕.๐๐ ab	๒.๐๐ b
๘	๒๗.๑๒ abc	๑๑.๐๐ ab	๒.๘๗	๑๙.๐๐ c	๒.๖๗ bc
๙	๓๔.๑๑ ab	๑๒.๒๗ ab	๓.๕๙	๑๐.๑๗ b	๒.๓๓ bc
๑๐	๓๕.๓๙ ab	๑๓.๗๖ ab	๕.๐๗	๕.๐๐ ab	๒.๐๐ b
F-test	*	*	ns	*	*
%CV	๑๒๕.๔๒	๒.๒๐	๑๗.๖๑	๖๘.๓๕	๑.๕๗

สำหรับปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมที่เป็นระยะเข้าทำลาย ซึ่งเป็นระยะที่อาศัยเป็นอิสระอยู่ในดินระยะเก็บผลผลิต ตำรับทดลองที่ ๒ ซึ่งไม่มีการใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมที่เป็นระยะเข้าทำลายเพิ่มมากขึ้นกว่าก่อนการฉีดพ่นครั้งที่ ๑ เช่นเดียวกันกับตำรับทดลองที่ ๗ ซึ่งใช้สารเคมีอะบาเม็กตินแบบราดลงดิน พบปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมที่เป็นระยะเข้าทำลายเพิ่มมากขึ้นกว่าก่อนการฉีดพ่นครั้งที่ ๑ และ ๒ ขณะที่ตำรับทดลองที่ ๔ ๕ ๖ ที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบรองก้นหลุม และตำรับทดลองที่ ๘ ๙ ๑๐ ที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบราดลงดิน และการใช้สารเคมีอะบาเม็กตินแบบรองก้นหลุม ในตำรับทดลองที่ ๓ พบปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมที่เป็นระยะเข้าทำลายลดลงจากก่อนการฉีดพ่นครั้งที่ ๒ ดังตารางที่ ๕

ตารางที่ ๕ จำนวนไส้เดือนฝอยรากปมระยะเข้าทำลายในดิน (ตัว ต่อ ๑๐๐กรัมดิน)

ตำรับทดลอง	จำนวนไส้เดือนฝอยรากปมระยะเข้าทำลายเฉลี่ย (ตัว ต่อ ๑๐๐กรัมดิน)		
	ก่อนฉีดพ่นครั้งที่ ๑	ก่อนฉีดพ่นครั้งที่ ๒	เก็บผลผลิต
๑	๐.๐๐ a	๐.๐๐ a	๐.๐๐ a
๒	๙๘๙ g	๑,๗๘๔ d	๔,๗๕๐ c
๓	๒๘๖ b	๓,๔๔๒ h	๑,๗๕๙ ab
๔	๘๑๙ e	๑,๗๑๐ c	๑,๑๕๖ a
๕	๖๓๙ c	๕,๙๘๗ i	๓,๔๓๑ bc
๖	๖๓๓ c	๒,๓๐๓ e	๓,๓๐๗ bc
๗	๗๐๐ d	๒,๖๖๗ f	๘,๗๐๘ d
๘	๘๗๒ f	๑,๒๒๒ b	๖๘๑ a
๙	๒,๑๗๗ h	๑,๗๗๘ d	๗๗๘ a
๑๐	๔,๙๖๗ i	๒,๗๖๔ g	๑,๑๓๙ a
F-test	*	*	*
%CV (log๑๐)	๑.๐๙	๐.๙๓	๑.๑๕

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ประกอบด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* รหัสเชื้อ NW ๗-A๓ และ *Bacillus subtilis* รหัสเชื้อ NT ๒-๒ ซึ่งพบอยู่ในตำรับทดลองที่มีการใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังเก็บผลผลิต โดยพบมากที่สุดในตำรับทดลองที่ ๖ ซึ่งใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบรองก้นหลุม ๗ กรัม มีปริมาณ *Bacillus megaterium* รหัสเชื้อ NW ๗-A๓ เท่ากับ ๔x๑๐^{๕} CFU/g soil และมีปริมาณ *Bacillus subtilis* รหัสเชื้อ NT ๒-๒ เท่ากับ ๓x๑๐^{๕} CFU/g soil ดังภาพที่ ๙



ภาพที่ ๙ แสดงปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมวันที่เก็บผลผลิต

อย่างไรก็ตาม ในตำรับทดลองที่ ๔ ๕ และ ๖ ซึ่งเป็นการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแบบรองก้นหลุม มีจำนวนปมที่พบที่รากระดับ ๐ เท่านั้น แต่กลับพบไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายในดินจำนวนมากกว่าตำรับทดลองที่ ๘ - ๑๐ ซึ่งใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแบบราดลงดิน และมีจำนวนปมที่พบที่รากระดับ ๒ ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติของการเป็นจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยเฉพาะ *B. megaterium* และ *B. subtilis* ที่นอกจากจะมี

คุณสมบัติเป็น plant growth promoting bacteria และ biological control against plant pathogens (Ashraf et al., ๒๐๑๔) แล้วยังมี รายงานว่า แบคทีเรียทั้ง ๒ ชนิดมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ซึ่งจะช่วยกระตุ้นภูมิต้านทานของพืชต่อโรคและแมลงศัตรูพืช (Ashraf *et. al*., ๒๐๑๔ ; Bolivar-Anillo *et. al.,* ๒๐๒๑)

๑๐. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. megaterium* NW๗-A๓ และ *B. subtilis* NT ๒-๒ จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง ๒ สายพันธุ์ จะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเรียงตามลำดับดังนี้ TSB มีปริมาณเชื้อสูงสุดที่ ๒๔ ชั่วโมง โดย *B. subtilis* NT ๒-๒ มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ ๒.๑๓ x๑๐^{๙} CFU/ml (log๑๐ = ๘.๓๖) ส่วน *B. megaterium* NW๗-A๓ มีปริมาณ เท่ากับ ๒.๒๙ x๑๐^{๙} CFUต่อมิลลิลิตร (log๑๐ = ๘.๓๓) จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยทั้ง ๒ สายพันธุ์ ไม่มีการสร้างสารปฏิชีวนะต่อกัน สามารถอยู่ร่วมกันได้ จึงสามารถนำเชื้อทั้ง ๔ ชนิด มาทำรูปแบบผลิตภัณฑ์ร่วมกันได้ โดยรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ทำให้แบคทีเรียทั้ง ๒ ชนิดอยู่รอดได้ระยะเวลานานคือ รูปแบบผลิตภัณฑ์ผงแห้ง ปริมาณเชื้อ *B. megaterium* NW๗-A๓ ที่ผสมกับวัสดุรองรับทัลคัม และคาโอลิน เริ่มต้นมีค่าประมาณ ๕.๑๓ x๑๐^{๑๔} และ ๔.๕ x๑๐^{๑๔} CFU ต่อกรัม ตามลำดับ *B. subtilis* NT๒/๒ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น ๔.๔๓ x๑๐^{๑๔} และ๔.๓๗ x๑๐^{๑๔} CFUต่อกรัม ตามลำดับ

การศึกษาอัตราและวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในโรงเรือนทดลอง เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สูงสุดที่ใช้ราดลงดินด้วยอัตรา ๒๐๐ กรัม ต่อน้ำ ๕๐ ลิตร พบระดับความรุนแรงของการเกิดปมที่ระบบรากจะลดลงจากระดับ ๓ เป็นระดับ ๒ และเมื่อรองก้นหลุมด้วยผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไม่พบความรุนแรงของการเกิดปม (ความรุนแรงของการเกิดปม เท่ากับ ๐) ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมีอะบาเม็กตินแบบรองก้นหลุม

๑๑. ประโยชน์ที่ได้รับ

๑๑.๑ ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม วิธีการขยายเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

๑๑.๒ ได้วัสดุรองรับและวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ และระยะเวลาในการเก็บรักษา

๑๑.๓ ได้อัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยในมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนกระจก

๑๒. ข้อเสนอแนะ

๑๒.๑ พัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ช่วยให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยรากปมให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อม และมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงเกษตรกรกับพืชชนิดต่างๆ

๑๒.๒ ควรมีการทดสอบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยรากปมกับจำนวนไส้เดือนฝอยในดินที่มีปริมาณต่างกัน เพื่อให้ได้ศักยภาพของผลิตภัณฑ์ในระดับการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม

ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ.....
(นางสาวดารารัตน์ โฮตาก้า)
ผู้เสนอผลงาน
วันที่ ๒๕ / ก.พ / ๒๕๖๖

ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริงทุกประการ

ลงชื่อ.....
(นางนวลจันทร์ ชะบา)
ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน
วันที่ ๒๕ / ก.พ. / ๒๕๖๖

ลงชื่อ.....
(นางสาวพนิดา ปรีเปรมโมทย์)
นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ
วันที่ ๒๖ / ก.พ / ๒๕๖๖

ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

ลงชื่อ.....
(นางสาวพิมพ์ธิดา เรืองไพศาล)
ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี
การผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์
วันที่ ๒๖ / ก.พ / ๒๕๖๖
(ผู้บังคับบัญชาที่ควบคุมดูแลการดำเนินการ)

ลงชื่อ.....
(นางนวลจันทร์ ชะบา)
ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน
รักษาราชการแทน
ผู้อำนวยการกองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน
วันที่ ๒๕ / ก.พ. / ๒๕๖๖

ข้อเสนอแนวคิดการพัฒนาหรือปรับปรุงงาน

ของนางสาวดารารัตน์ โฮตาก้า

เพื่อประกอบการแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ ตำแหน่งเลขที่ ๑๔๔

กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน

๑. เรื่อง วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สำหรับเคลือบเมล็ด เพื่อเพิ่มคุณภาพเมล็ดพันธุ์ การเจริญเติบโต ผลผลิต และควบคุมโรคของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และพริก

๒. หลักการและเหตุผล

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และพริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย สำหรับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ใช้เป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ทั้งตลาดในประเทศ และต่างประเทศมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปีการผลิต ๒๕๖๓/๖๔ มีพื้นที่ปลูกทั้งประเทศไทย ๗.๐๙ ล้านไร่ ผลผลิต ๗๐๕ กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, ๒๕๖๓) ดังนั้นการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้ในการเพาะปลูกจึงตองมีคุณภาพสูง ทั้งความงอกและความแข็งแรง สำหรับการปลูกข้าวโพดยังพบปัญหาที่สำคัญก็คือการเกิดโรค โดยเฉพาะโรคราน้ำค้าง ที่เกิดจากเชื้อรา *Peronosclerospora sorghi* ที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอยางรายแรงและมีการระบาดอย่างกว้างขวาง ทำใหผลผลิตขาวโพดลดลง ๓๐ - ๘๐ เปอรเซ็นต์ นอกจากนี้ข้าวโพดยังมีความต้องการธาตุอาหารสูงทั้งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม จึงมีการใช้ปุ๋ยเคมีในปริมาณมาก สำหรับพริกเป็นเครื่องเทศที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก ปัจจุบันมีการส่งออกผลิตภัณฑ์พริกไปต่างประเทศหลายรูปแบบ เช่น ซอสพริก พริกสดแช่แข็ง พริกแห้ง เป็นต้น มูลค่าการส่งออกปี๒๕๖๓ ประมาณ ๑,๖๗๕.๙๖ ล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, ๒๕๖๔) และปัญหาสำคัญของการปลูกพริก คือ โรคเหี่ยว และเน่าที่เกิดจาก เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ดังนั้นในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด และพริกเชิงการค้าจึงมีการเคลือบเมล็ดด้วยสารเคมีเพื่อป้องการการเกิดโรค และยืดอายุการเก็บรักษา แต่อย่างไรก็ตามการเคลือบเมล็ดด้วยสารเคมียังมีข้อจำกัดในการใช้สำหรับการผลิตแบบเกษตรอินทรีย์ และเกษตรปลอดภัย รวมทั้งเมื่อใช้อย่างไม่ถูกต้องอาจส่งผลกระทบต่อเกษตรกรได้ ดังนั้นการใช้เมล็ดพันธุ์พืชที่เคลือบเมล็ดด้วยสารชีวภาพหรือจุลินทรีย์ จึงเป็นทางเลือกสำหรับการผลิตที่มีความปลอดภัย แต่ยังคงรักษาคุณภาพของเมล็ดพันธุ์พืชได้ รวมทั้งช่วยในการเจริญเติบโตและผลผลิตพืชด้วย งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการนำจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช จำนวน ๓ ชนิด ประกอบด้วย *Azotobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ *Burkholderia* แบคทีเรียละลายฟอสฟอรัส และ *Bacillus* แบคทีเรียควบคุมโรคพืช ร่วมกับเทคนิคการเคลือบเมล็ดพันธุ์พืช (seed coating) โดยศึกษาชนิดของสารเคลือบ และพัฒนาเครื่องเคลือบเมล็ดที่ใช้กับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเป็นตัวแทนเมล็ดพันธุ์พืชขนาดใหญ่ และพริกที่เป็นเมล็ดเล็ก โดยเครื่องต้นแบบนี้สามารถนำไปใช้ในระดับครัวเรือนและชุมชน เพื่อนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต เพิ่มผลผลิต และป้องกันโรคของข้าวโพดและพริก ในแปลงปลูกต่อไป นอกจากนี้ในการนำจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรชนิดต่างๆ มาวิจัย และพัฒนาการใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน และควบคุมโรคพืชมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง (Karlidag *et al*., ๒๐๐๗) กรมพัฒนาที่ดินเป็นหน่วยงานหนึ่งที่มีการผลิตผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ และผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมโรค ซึ่งมีจุลินทรีย์แบบผสม (mix culture) ในแต่ละผลิตภัณฑ์ แต่การใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อต่อพื้นที่ หรือต่อพืชที่ปลูกจำเป็นต้องใช้ในปริมาณมาก เช่น คำแนะนำการใช้ปุ๋ยชีวภาพของกรมพัฒนาที่ดิน ๓๐๐ กิโลกรัมต่อไร่ (กรมพัฒนาที่ดิน, ๒๕๕๐) การนำผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์มาใช้ในรูปแบบการเคลือบเมล็ดนอกจากจะใช้ในปริมาณน้อยแล้ว ยังเป็นการทำการเกษตรแบบแม่นยำ จุลินทรีย์จะมีการเจริญบริเวณรอบรากพืช ทำให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น สำหรับการเคลือบเมล็ดพันธุ์พืช โดยทั่วไปจะเป็นการปฏิบัติกับเมล็ดพันธุ์โดยการใช้ร่วมกับสารออกฤทธิ์ชนิดต่างๆ เช่น สารเคมี ธาตุอาหารพืช ฮอร์โมนพืช สารเร่งการเจริญเติบโตพืช และจุลินทรีย์ชีวภาพ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีระดับสูงที่พัฒนามาจากอุตสาหกรรมการเคลือบ

เม็ดยา โดยเป็นการนำสารสะสมที่มีลักษณะบางเบาฉาบยึดเกาะให้สม่ำเสมอไปบนผิวของเมล็ดพันธุ์ ปัจจุบันได้พัฒนาการเคลือบเมล็ดแบบเป็นแผ่นฟิล์มบางๆจำพวก thin polymer ห่อหุ้มที่ผิวของเมล็ด (บุญมี, ๒๕๕๘) จากคุณสมบัติที่ดีดังกล่าวนักวิจัยหลายท่านได้นำสารเคลือบ (polymer) มาประยุกต์สร้างสูตรสารเคลือบร่วมกับแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชีวภาพชนิดต่างๆเพื่อนำไปเคลือบร่วมกับเมล็ดพันธุ์เพื่อให้สารชีวภาพเหล่านี้ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ขณะทำการเพาะปลูก ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าขณะงอกและมีพัฒนาการเป็นต้นกล้าที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง (ธิดารัตน์, ๒๐๑๗) รวมทั้งการเคลือบเมล็ดร่วมกับจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชเพื่อป้องกันการเกิดโรคในพืช ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาการนำจุลินทร์กลุ่มส่งเสริมการเจริญเติบโต และควบคุมโรคพืชมาศึกษารูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อในปริมาณมาก และศึกษาการนำมาเคลือบเมล็ดโดยเปรียบเทียบชนิดของสารยึดเกาะ และศึกษาในการเคลือบเมล็ดพันธุ์พืชขนาดใหญ่ คือ ข้าวโพด และเมล็ดขนาดเล็ก คือ พริก ซึ่งจะได้ได้เทคโนโลยีในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรค ราน้ำค้างในข้าวโพดและโรคเหี่ยวในพริก ในรูปแบบการเคลือบเมล็ด รวมทั้งพัฒนาเครื่องต้นแบบในการเคลือบเมล็ดข้าวโพด และพริกที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในระดับครัวเรือน และชุมชนได้

๓.บทวิเคราะห์/แนวความคิด/ข้อเสนอ และข้อจำกัดที่อาจเกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือ พีจีพีอาร์ มีการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งการเพิ่มธาตุอาหารและควบคุมโรคพืช โดยมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบต่างๆ และนำไปใช้ประโยชน์กับพืชได้หลายชนิด ซึ่งกรมพัฒนาที่ดินมีการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ และส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ โดยนำไปขยายเชื้อในปุ๋ยหมักเป็นเวลา ๔ – ๗ วัน แล้วนำไปหว่านหรือโรยเป็นแถวตามลักษณะของการปลูกพืชแต่ละชนิด ในอัตรา ๑๐๐ – ๓๐๐ กิโลกรัมต่อไร่ นอกจากนี้ประสิทธิภาพของเชื้อยังขึ้นอยู่กับการอยู่รอดของเชื้อ และสภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่ด้วย ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเคลือบเมล็ดเพื่อให้จุลินทรีย์ยึดเกาะกับเมล็ดพันธุ์พืชก่อนนำไปปลูก จะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีในบริเวณรากพืช ทั้งในระยะการงอก ระยะต้นกล้า ระยะการเจริญเติบโต และการติดดอกออกผลผลิตของพืชได้ การใช้กลุ่มจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน และการปรับปรุงวิธีการใช้จุลินทรีย์ร่วมกับเมล็ดพันธุ์ หรือต้นพืชด้วยวิธีการทำ การเคลือบเมล็ดพันธุ์ หรือ seed coating จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการปรับปรุงคุณภาพการงอก และการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้อีกด้วย ทั้งนี้งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการดำเนินการวิจัย เพื่อยกระดับคุณภาพเมล็ดพันธุ์พืชร่วมกับแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโต และจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชด้วยวิธีการทำ Seed coating สารเคลือบเมล็ดพันธุ์ถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันโรคจากเชื้อราและแมลงที่สามารถทำลายเมล็ดและต้นกล้าในช่วงของการเจริญเติบโตจะนิยมใช้สารกลุ่มของสารออกฤทธิ์ (active ingredient) ต่างๆ เช่น สารป้องกันโรคจากเชื้อราและแมลงที่มีผลต่อการเจริญของพืช ธาตุอาหารที่จำเป็น ฮอร์โมนพืช และสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีการใช้พอลิเมอร์ที่มีความเหนี่ยวร่วมกับสารออกฤทธิ์ต่างๆ วิธีนี้ได้มีการพัฒนาขั้นตอนและเครื่องมือที่ใช้จากอุตสาหกรรมการเคลือบยาหรือ film coating (McDonald and Kwong, ๒๐๐๕) สารเคลือบที่ดีควรมีลักษณะเหนียวข้น เมื่อเคลือบบนผิวเมล็ดต้องมีการกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วเมล็ด ไม่ทำให้เมล็ดเกาะติดกัน และสามารถละลายน้ำได้ง่าย (บุญมี, ๒๕๔๖) ขั้นตอนการวิจัย

๑. ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในถังหมักแบบกึ่งกะ (fed - batch culture) และรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการอยู่รอด และประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ ในการนำไปเคลือบเมล็ดข้าวโพด และพริก

๒. ศึกษาชนิดของสารยึดเกาะ และรูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ ที่เหมาะสมต่อการเคลือบเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และพริก

๓. พัฒนาเครื่องต้นแบบในการเคลือบเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และพริก ด้วยผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

๔. ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่เคลือบเมล็ด ต่อการเจริญเติบโต ผลผลิตและควบคุมโรคในการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และพริก

๕. ศึกษาประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เคลือบเมล็ด ต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของพริกขี้หนูหัวเรือ ที่ปลูกในชุดดินต่างๆ ในสภาพแปลง

๔. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

๑) ได้วิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ *Azotobacter* sp., *Burkholderia* sp. *Bacillus subtillis* ที่มีประสิทธิภาพ

๒) เทคโนโลยีการเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลี้ยงสัตว์ และพริก ด้วยผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืช

๓) เครื่องต้นแบบการเคลือบเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และพริก ด้วยผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืชของพืช

๔) ข้อมูลการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืช ที่เคลือบเมล็ด ต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต และควบคุมโรค

๕) ข้อมูลผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืช ที่เคลือบเมล็ด

๕.ตัวชี้วัดความสำเร็จ

๑. เพิ่มผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และพริกขี้หนูหัวเรือ

๒. เพิ่มความต้านทานของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และพริกพันธุ์พริกขี้หนูหัวเรือ ต่อโรครานำ้ค้าง และโรคเหี่ยว

ลงชื่อ.....
(นางสาวดารารัตน์ โฮตาก้า)
ผู้ขอประเมิน
วันที่ ๒๕ / ก.พ. / ๒๕๖๖

ความเห็นของผู้บังคับบัญชาระดับกอง หรือสำนัก
(ระบุความเห็น) เป็นแนวคิดที่ดีมากเพื่อพัฒนาการผลิตจุลินทรีย์ เพื่อใช้ประโยชน์ในการผลิตพืช.....

ลงชื่อ.....
(นางนวลจันทร์ ชะบา)
ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน
รักษาราชการแทน
ผู้อำนวยการกองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน
วันที่ ๒๕ / ก.พ. / ๒๕๖๖