การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าและจุลินทรีย์ปนเปื้อน ในการผลิตบัวบกระบบเกษตรอินทรีย์

ROOT AND STEM ROT DISEASE CONTROL AND MICROBIAL CONTAMINATION OF ASIATIC PENNYWORT PRODUCTION IN ORGANIC FARMING SYSTEM

สุนิตรา คามีศักดิ์

SUNITRA KAMEESAK

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

พ.ศ. 2557

KMITL-2014-AG-M-065-172

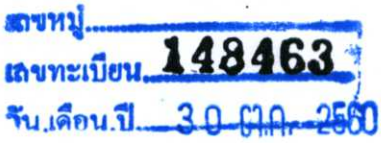
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

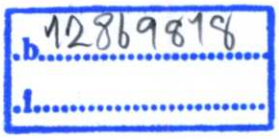
การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าและจุลินทรีย์ปนเปื้อน ในการผลิตบัวบกระบบเกษตรอินทรีย์

ROOT AND STEM ROT DISEASE CONTROL AND MICROBIAL CONTAMINATION OF ASIATIC PENNYWORT PRODUCTION IN ORGANIC FARMING SYSTEM

สุนิตรา คามีศักดิ์

SUNITRA KAMEESAK


สถหมู่
เลขทะเบียน 148463
วัน.เดือน.ปี 30 มิ.ย. 2560


b 12869818
i

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2557

KMITL-2014-AG-M-065-172

ROOT AND STEM ROT DISEASE CONTROL AND MICROBIAL CONTAMINATION OF ASIATIC PENNYWORT PRODUCTION IN ORGANIC FARMING SYSTEM

SUNITRA KAMEESAK

A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2014

KMITL-2014-AG-M-065-172

COPYRIGHT 2014

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าและจุลินทรีย์ปนเปื้อนในการผลิตบัวบกระบบเกษตรอินทรีย์

Root and Stem Rot Disease Control and Microbial Contamination of Asiatic Pennywort Production in Organic Farming System

นักศึกษา นางสาวสุนิตรา คามีศักดิ์

รหัสประจำตัว 55641101

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เกษตรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สุวรินทร์ บำรุงสุข

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.สมยศ	เดชภิรัตนมงคล	
รศ.ภัญชนา	มีแก้วกุญชร	
รศ.ดร.วรเดช	จันทรสร	
ผศ.ดร.พอใจ	ถามากร	
รศ.ดร.สุวรินทร์	บำรุงสุข	สุวรินทร์ บำรุงสุข

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 19 กันยายน 2557

สถานที่สอบ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร (ชั้น 1 ตึกบุนนาค L)

คณบดีรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 6 **เดือน** ตุลาคม **พ.ศ.** 2557

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าและจุลินทรีย์ปนเปื้อนในการผลิตบัวบกระบบเกษตรอินทรีย์
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุนิตรา คามีศักดิ์
รหัสประจำตัว	55641101
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2557
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.สุวรินทร์ บำรุงสุข

บทคัดย่อ

บัวบกเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เป็นไม้ล้มลุกที่ใช้บริโภคภายในประเทศ และส่งออกไปต่างประเทศ สามารถทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างดี และเมื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ จะสามารถเพิ่มมูลค่าของบัวบก แต่ปัญหาที่พบคือ ได้มีการระบาดของโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในบัวบกทำให้บัวบกมีอาการโคนต้นเป็นสีเหลือง ใบเหี่ยว และแห้งตายในที่สุด ทำให้เสียหายต่อผลผลิต และนอกจากนี้พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อป้องกันโรครากเน่าโคนเน่า และวิธีที่เหมาะสมในการลดจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ภายในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี bi-culture พบว่า เชื้อ *Trichoderma harzianum* isolate 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* สูงถึง 71.9 เปอร์เซ็นต์ จึงได้นำไปทดลองในสภาพโรงเรือนทดลอง แผนการทดลองเป็นแบบ Completely randomized design 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้ *Trichoderma harzianum* isolate 3, *Bacillus subtilis* น้ำหมักชีวภาพ สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (etridiazole+quintozene) และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใช้สารเคมี ผลการศึกษาพบว่า ทั้ง 2 ฤดูกาลปลูก การใช้สารเคมีผสมของ etridiazole+quintozene มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่าน้อยที่สุด และให้ผลผลิตมากที่สุด รองลงมาเป็น *B. subtilis* ซึ่งการใช้สารเคมีนั้นจะทำให้เกิดสารพิษตกค้าง อีกทั้งได้มีการรณรงค์ทางด้านสุขภาพให้เกษตรกรลดการใช้สารเคมี ทำการเกษตรแบบระบบอินทรีย์ จึงแนะนำให้ใช้ *B. subtilis* เพื่อใช้ควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าในบัวบก และเมื่อนำไปทดลองในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร อ.ไทรน้อย จ.นครปฐม พบว่า

การใช้เชื้อ *B. subtilis* มีการเกิดโรครากเน่าโคนเน่า 26.55 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตบัวบก 1.10 ตันต่อไร่

ส่วนการวิเคราะห์จุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก จากแหล่งจำหน่ายทั้ง 3 แหล่ง คือ ตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด (ไม่มีการล้างบัวบกก่อนจำหน่ายและทำความสะอาดแผงขายของ) ตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด (ไม่มีการล้างบัวบกก่อนจำหน่ายและมีการทำความสะอาดแผงขายของ มีการจัดการน้ำทิ้งอย่างเป็นระบบ) และห้างสรรพสินค้า (มีการล้างบัวบกและบรรจุหีบห่อ) พบว่า บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีปริมาณจุลินทรีย์รวม ปริมาณเชื้อรา ปริมาณ coliform และปริมาณเชื้อ *E. coli* เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 3.73×10^{5}, 2.88×10^{2} CFU/g log 2.72 และ log 1.30 MPN/g ตามลำดับ ตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2553) พบว่าบัวบกที่นำมาจากแหล่งจำหน่ายทุกๆ แหล่งมีปริมาณจุลินทรีย์รวม และปริมาณเชื้อรายังไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ coliform เกินมาตรฐานทุกแหล่งจำหน่าย ส่วนปริมาณเชื้อ *E. coli* พบว่าบัวบกที่จำหน่ายจากตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด และตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาดมีปริมาณเชื้อเกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ ซึ่งตรงกันข้ามกับบัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าซึ่งมีปริมาณเชื้อไม่เกินมาตรฐานที่กำหนด

การศึกษาวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118 พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ ทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด แต่ทำให้คุณภาพของบัวบกลดลง จึงควรหันมาล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ได้ผลรองลงมา และไม่ทำให้คุณภาพของบัวบกเสียหาย

Thesis	Root and Stem Rot Disease Control and Microbial Contamination of Asiatic Pennywort Production in Organic Farming System
Student	Ms. Sunitra Kameesak
Student ID.	55641101
Degree	Master of Science
Program	Agriculture
Year	2014
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Suvarin Bumroongsook

ABSTRACT

Asiatic pennywort is a plant species of economic importance. It is a herbaceous plant for local consumption and exportation which generate income for the country. When it is processed into various products will be able to increase the value of the asiatic pennywort. The major problem of asiatic pennywort production is the outbreak of root and stem rot diseases caused by *Sclerotium rolfsii* . It is symptoms have yellowed, burnt and wilting leaves and eventually it which results in crop loss. In addition, microbial contamination is also found on asiatic pennywort. Thus, this study was aimed at root and stem rot disease control and optimum methods for eliminate microbial contamination.

The inhibition test of *S. rolfsii* in a laboratory using the bi-culture method showed that *Trichoderma harzianum* isolate 3 had the highest percentage of inhibition, 71.97 percent. Then the experiment under the greenhouse condition was designed in a completely randomized block with 5 treatments and 5 replications: *Trichoderma harzianum* isolate 3, *Bacillus subtilis,* fermented plant, chemical mixture of etridiazole and quintozene and a control treatments. The results showed that in two seasons of asiatic pennywort growing, the use of chemicals mixture had minimum percentage of root and stem rot diseases occurrence and highest of yield ; the next following was *B. subtilis* treatment. Moreover, usage of chemicals can cause toxic residues. Therefore, there should be a health campaigns to induce growers to reduce chemical usage and do more organic farming systems instead

Thus, we recommend the use of *B. subtilis* for controlling root and stem rot disease of asiatic pennywort. When it was applied in the experimental field of farmers at Sai Noi district, Nakhon Pathom Province, the result showed that the *B. subtilis* had minimum percentage of root and stem rot disease (26.55%) and the highest yield production (1.10 tons/rai.)

The microbiological quality of asiatic pennywort from 3 various sources was analysed fromthese different types of markets: 1) conventional markets (without cleaning of both asiatic pennywort. and stalls), 2) hygienic markets (no asiatic pennywort wash, stall and sewage management) and the supermarkets (asiatic pennywort wash and packaged). The studies showed that asiatic pennywort were sold in supermarket had the least numbers of total bacteria count, total fungi, colifrom and *Escherichia coli* at 3.73×10^{5}, 2.88×10^{2} CFU/g, log 2.72 and log 1.30 MPN/g, respectively. According the microbiological standard of Department of Medical Science (2553), asiatic pennywort from all sources had total bacteria count and total fungi not exceed the standards limit but coliform The *E. coli* showed that asiatic pennywort from both conventional markets and hygienic markets were exceed the standards limit not the one from the supermarket.

The study on microbial decontamination of *E. coli* TISTR780 and *S. aureus* TISTR118 was found that wash with water twice and then wash with 1% of lactic acid for 5 seconds produced the best results in decontamination of both species but poor quality in appearance of asiatic pennywort. It is suggested that washing with water twice and in conjunction with 10 ppm of ozonated water for 20 minutes which is a process that results the second best and did not effect the quality of asiatic pennywort.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณแสงมณี ชิงดวง นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ กรมวิชาการเกษตร ที่คอยให้คำปรึกษา และการสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ และคุณอังคณา ทุมดี ที่คอยให้ความรู้และคำปรึกษาในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.ดร.วรเดช จันทรสร รศ.ภัญชนา มีแก้วกุญชร รศ.ดร.สมยศ เดชภิรัตนมงคล และผศ.ดร.พอใจ ถามากร กรรมการสอบหัวข้อและโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สุวรินทร์ บำรุงสุข

ขอขอบคุณ พี่ๆน้องๆ จากสถาบันวิจัยพืชสวน ที่คอยช่วยเหลือในด้านต่างๆ และเจ้าของแผงผักจากตลาดแหล่งต่างๆ ที่อำนวยความสะดวกในการทำงาน

สุดท้ายต้องขอขอบคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และเพื่อนๆ ของข้าพเจ้าที่คอยให้กำลังใจที่ดีตลอดมา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดา ซึ่งเป็นที่เคารพรักยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

สุนิตรา คามีศักดิ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III

กิตติกรรมประกาศ V

สารบัญ VI

สารบัญตาราง IX

สารบัญภาพ X

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

1.3 สถานที่ดำเนินงาน 2

1.4 ขั้นตอนการศึกษา 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบก 3

2.2 การปลูกและการผลิตบัวบกเป็นการค้า 4

2.3 โรคและแมลงศัตรูบัวบก 13

2.4 การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่า 15

2.5 สารที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรค 20

2.5.1 สารเคมี 20

2.5.2 สารธรรมชาติ 21

2.6 เชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก 23

2.7 ปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในบัวบก 25

2.8 วิธีการลดจุลินทรีย์ปนเปื้อน 26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 29

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 29

3.1.1 วิธีการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่า 29

3.1.2 วิเคราะห์จุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก 29

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 30

3.1.4 สารเคมี 30

3.2 วิธีการทดลอง 31

3.2.1 การแยกเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบก 31

3.2.2 การเตรียมเชื้อปฏิปักษ์และน้ำหมักชีวภาพ 32

3.2.3 การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ 34

3.2.4 การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทดลอง 35

3.2.5 การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกแบบอินทรีย์ในสภาพแปลงปลูก 36

3.2.6 การศึกษาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก 37

3.2.7 การศึกษาวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118 39

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 44

4.1 การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ 44

4.2 การทดสอบการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าในสภาพโรงเรือนทดลอง 47

4.3 การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าบัวบกในสภาพแปลงปลูก 50

4.4 การศึกษาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก 52

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 การศึกษาวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118 59

บทที่ 5 สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ 64

บรรณานุกรม 67

ภาคผนวก 75

ภาคผนวก ก 76

ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์ทางสถิติ 84

ผลงานตีพิมพ์

ชื่อเรื่อง การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์ 96

ชื่อเรื่อง คุณภาพทางจุลชีวิทยาของบัวบกจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ 104

ประวัติผู้เขียน 112

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชนิดสารเคมีที่มีการห้ามใช้ในสินค้าเกษตร 11

2.2 พื้นที่การผลิตเกษตรอินทรีย์ของประเทศไทยในแต่ละปี 12

4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ด้วยกรรมวิธีต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการ 45

4.2 การเจริญเติบโตของบัวบก ในสภาพโรงเรือนทดลอง ในฤดูกาลที่1 48

4.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่าและผลผลิตบัวบกในสภาพโรงเรือนทดลอง ในฤดูกาลที่ 1 48

4.4 การเจริญเติบโตของบัวบก ในสภาพโรงเรือนทดลอง ในฤดูกาลที่ 2 49

4.5 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า (%) และผลผลิตบัวบก (ตัน/ไร่) ในสภาพโรงเรือนทดลอง ในฤดูกาลที่ 2 50

4.6 การเจริญเติบโตของบัวบกในสภาพแปลงปลูก 51

4.7 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า (%) และผลผลิตบัวบก (ตัน/ไร่) ในสภาพแปลงปลูก 52

4.8 ปริมาณเชื้อราและจุลินทรีย์รวม (CFU/g) ในบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ เปรียบเทียบกับแปลงปลูกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทดลอง 53

4.9 ปริมาณของเชื้อ coliform และ *E. coli* (log MPN/g) ในบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆเปรียบเทียบกับบัวบกจากแปลงทดลอง 54

4.10 เปอร์เซ็นต์ร้านจำหน่ายผักที่พบการปนเปื้อนของ Total coliform และ *E. coli* ที่เกินมาตรฐาน 55

4.11 ปริมาณ Coliform (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วยน้ำต่างๆ กัน 59

4.12 ปริมาณ *Escherichia coli* TISTR780 (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วยน้ำต่างๆกัน 61

4.13 ปริมาณ *S. aureus* TISTR118 (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วยน้ำต่างๆกัน 62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ไหลหรือลำต้น มาตัดให้ติดราก ยาวประมาณ 10 ซม. ก่อนนำไปปลูก	5
2.2	เตรียมพื้นที่ และรดน้ำเพื่อให้ความชุ่มชื้นก่อนปลูก	5
2.3	นำต้นพันธุ์ที่เตรียมไว้มาปลูกลงแปลง	6
2.4	แปลงปลูกบัวบกเมื่อปลูกเสร็จแล้วก่อนจะทำการพรางแสงด้วยแสลน	6
2.5	สภาพแปลงปลูกบัวบก	7
2.6	ระบบการให้น้ำแบบสปริงเกอร์	7
2.7	การเก็บเกี่ยวใบบัวบก	8
2.8	การล้างใบบัวบกหลังการเก็บเกี่ยว	8
2.9	บรรจุภัณฑ์ของบัวบกก่อนนำออกจำหน่าย	9
2.10	พื้นที่ปลูกเกษตรอินทรีย์ในแต่ละปี	11
2.11	โรคใบจุด ที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* sp ในบัวบก	14
2.12	โรครากเน่าโคนเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *S. roifsii* ในบัวบก	15
2.13	เชื้อ *T. harzianum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 5 วัน	19
2.14	เชื้อ *B. subtilis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เมื่ออายุ 1 วัน	20
2.15	ลักษณะของเชื้อทั้ง 2 ชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ กัน	24
3.1	เชื้อ *Sclerotium roifsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 5 วัน	31
3.2	ลักษณะอาการของโรครากเน่าโคนเน่า เมื่อพิสูจน์การเกิดโรคด้วยเชื้อ *S. roifsii*	32
3.3	การเตรียม *T. harzianum* ในข้าวฟ่าง	33
3.4	การเตรียมน้ำหมักชีวภาพ	34
3.5	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB	39
3.6	บัวบกที่บรรจุในถุงพลาสติก ปิดผนึก เก็บไว้ในตู้เย็น 3 วัน	41
3.7	ตัวอย่างบัวบก 25 กรัม	41
3.8	การทำบัวบกให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Stomacher blender	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

3.9 การถ่ายเชื้อโคโลนี *E. coli* ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient broth 42

3.10 การเตรียม egg yolk solution เพื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar (BP) 43

4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ด้วยกรรมวิธีต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการ 46

4.2 ลักษณะอาการโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกในสภาพแปลงปลูก 52

4.3 แสดงลักษณะของตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด 56

4.4 แผงจำหน่ายภายในตลาด 56

4.5 บัวบกที่จำหน่ายอยู่ในตลาด 56

4.6 แสดงลักษณะของตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด 57

4.7 แผงจำหน่ายภายในตลาด 57

4.8 บัวบกที่จำหน่ายอยู่ในตลาด 57

4.9 แสดงลักษณะแผงจำหน่ายบัวบกในห้างสรรพสินค้า 58

4.10 บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า 58

4.11 บรรจุภัณฑ์ของบัวบก 58

4.12 คุณภาพของบัวบกหลังจากเก็บรักษาในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 3 วัน 63

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban.) อยู่ในวงศ์ Apiaceae จัดเป็นพืชที่อยู่ในกลุ่มสาธารณสุขมูลฐาน ซึ่งส่วนที่นำไปใช้ประโยชน์คือ ใบ และทั้งต้น ประกอบด้วยสารสำคัญ asiaticoside acid มีฤทธิ์ช่วยในการสมานแผล และเร่งการสร้างเนื้อเยื่อ ลดการติดเชื้อของแบคทีเรียและเชื้อรา จึงทำให้บัวบกมีสรรพคุณช่วยในการเร่งการเจริญเติบโตของเยื่อบุผิว รักษาแผลให้หายเร็ว ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ปัจจุบันได้มีการนำบัวบกไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ อาทิ คั้นเป็นน้ำบัวบกสดพร้อมดื่ม ยาแคปซูล ไอศกรีมบัวบก ครีมบำรุงหน้าและผิว ครีมบำรุงส้นเท้า ยาสระผม สบู่ น้ำมันบำรุงผม ครีมอาบน้ำ ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าของบัวบกได้เป็นอย่างมาก แต่การผลิตบัวบกเป็นการค้านั้น เกษตรกรส่วนใหญ่ยังมุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตเพื่อการค้าและการส่งออกโดยการใช้สารเคมี หากใช้เป็นระยะเวลานานอาจส่งผลกระทบให้ดินเสื่อมโทรม ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้ผลิต ผู้บริโภค เกษตรกรหลายๆ ครัวเรือน จึงเริ่มที่จะหันมาทำการปลูกบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์ โดยการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในท้องถิ่น เช่น ผักและผลไม้สด สมุนไพร หอยเชอรี่ เศษปลาสด ขี้เถ้าแกลบ กากอ้อย กากน้ำตาล มาผลิตเป็นสารสกัดชีวภาพ ทั้งนี้ยังได้มีการศึกษาการปลูกบัวบกระบบเกษตรอินทรีย์ของอนันต์และคณะ (2552) โดยการใส่ปุ๋ยมูลโคในบัวบก ที่อัตรา 2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ส่งผลให้ต้นมีทรงพุ่มขนาดใหญ่และยาวมากขึ้น ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินทำให้ดินโปร่งร่วน อินทรียวัตถุและธาตุอาหารมากขึ้น แต่การปลูกบัวบกแบบระบบเกษตรอินทรีย์นั้น เป็นการกระตุ้นให้เกษตรกรหันมาใช้ปุ๋ยคอกกันมากขึ้น อาจทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร โดยเชื้อเหล่านี้จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายของสัตว์ บางชนิดเมื่อเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ จะทำให้มีอาการอาเจียน มีไข้ และท้องเสียตั้งแต่อ่อนๆจนถึงรุนแรง อาจทำให้ขาดน้ำอย่างรุนแรงถึงช็อคได้ ซึ่งมีการศึกษาของปิยะมาศและคณะ (2554) กล่าวไว้ว่า การปลูกแบบเกษตรอินทรีย์โดยการใช้มูลวัวที่ไม่ได้มีการหมักนำมาเป็นปุ๋ยอินทรีย์ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E.coli* ในพืชผัก นอกจากนี้กรมการค้าต่างประเทศ (2549) รายงานว่า บัวบกที่ส่งออกไปต่างประเทศในแถบยุโรป ได้ตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ

Salmonella ที่ส่งออกมาด้วย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าบัวบกในระบบการผลิตบัวบกแบบเกษตรอินทรีย์ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต ช่วยให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นและคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของบัวบกพร้อมทั้งวิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118 เพื่อให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและลดการปนเปื้อนเพื่อการส่งออก

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *S. roflsii* ในระบบการผลิตบัวบกแบบเกษตรอินทรีย์

2. เพื่อศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของบัวบก

3. เพื่อศึกษาวิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR780 และ *S. aureus* TISTR118

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1. โรงเรือนทดลอง สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

2. ห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงเกษตรกร อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

เป็นการศึกษาการปลูกบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์ และป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* จากนั้นจึงนำมาลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าบัวบกในระบบการผลิตบัวบกแบบอินทรีย์

2. ทำให้ทราบถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของบัวบกจากแปลงปลูกระบบเกษตรอินทรีย์แหล่งจำหน่ายต่างๆ

3. ได้วิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบก

ชื่อสามัญ	Asiatic Pennywort
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Centella asiatica* (Linn.) Urban.
ชื่อพ้อง	*Hydrocotyle asiatica* L.
วงศ์	Apiaceae
ถิ่นที่อยู่	ชื่อวิทยาศาสตร์มีคำว่า Asia นั้น แสดงถึงถิ่นกำเนิดของบัวบกว่าอยู่ในเขตร้อนชื้นของทวีปเอเชีย โดยเฉพาะเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คาบสมุทรมาเลเซีย และบริเวณประเทศไทย

บัวบกเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก มีลำต้นที่เรียกว่า ไหล ทอดเลื้อยแผ่ไปตามพื้นดิน มีรากแตกฝอยตามข้อ เมื่อเป็นต้นอ่อนจะมีขนประปราย ใบเป็นใบเดี่ยว แตกออกเป็นกระจุกที่ข้อๆ ละ 2-10 ใบ ใบเป็นรูปกลมคล้ายรูปไต ฐานใบโค้งเว้าลึกเข้าหากัน ความกว้างใบประมาณ 1-3 เซนติเมตร ความยาวใบประมาณ 5-7 เซนติเมตร ขอบใบมีรอยหยักมนอย่างสม่ำเสมอ เส้นใบแตกแบบนิ้วมือ มีก้านชูใบยาว ประมาณ 20-30 เซนติเมตร ดอกมีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อตามข้อต่างๆ ช่อละ 3-4 ดอก ดอกกลางจะไม่มีก้านดอก แต่ละดอกมีกลีบดอก 5 กลีบ กลีบดอกมีสีเขียว รูปกลมเกือบไข่ ยาวประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงฝ่อ มีใบประดับรูปไข่ 2 ใบ ก้านช่อดอกยาวประมาณ 0.5-2 เซนติเมตร ดอกมีสีม่วงอมแดงโดยเรียงสลับกับเกสรตัวผู้ ส่วนเกสรเพศเมีย มีก้านเกสรมี 2 อัน รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ มี 2 เซลล์ ผล มี 2 ผล (1 เมล็ดต่อผล) ติดกัน บางส่วนแยกจากกันเมื่อแก่ รูปกลมแป้นแกมกลม ขนาดกว้าง 0.3 เซนติเมตร ยาว 0.3-0.4 เซนติเมตร ผลมีลักษณะแบน ขนาดเล็ก มีเส้นผ่าศูนย์กลางยาว 3-4 มิลลิเมตร มีเปลือกแข็ง สีเขียวหรือม่วง ผลแห้งแตกได้ (กัญจนา ดีวิเศษ และเพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2542; วัชรีพร คงวิลาด และคมสัน หุตะแพทย์. 2550; ชาญชัย สาดแสง จันทร์. 2552)

2.2 การปลูกและการผลิตบัวบกเป็นการค้า

บัวบกสามารถเจริญเติบโตได้ดี ในพื้นที่ที่มีลักษณะดอน ไม่มีน้ำขัง นำมาขยายพันธุ์ได้ 2 วิธี คือ 1.การใช้เมล็ด ด้วยการนำเมล็ดของบัวบกมาเพาะในกระบะ เมื่อต้นกล้ามีอายุ 15-25 วัน จึงนำกล้าย้ายลงไปปลูกในแปลงปลูก 2.การใช้ไหลหรือลำต้น ด้วยการนำไหลหรือลำต้นมาตัดให้ติดราก (ภาพที่ 2.1) มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร นำลงไปปลูกในแปลงปลูก ซึ่งการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้สามารถเก็บผลผลิตบัวบกได้ดีกว่าการปลูกโดยการใช้เมล็ด (อภิชาต ศรีสอาด และศุภวรรณ์ ใจแสน. 2552) เตรียมพื้นที่แปลงปลูกด้วยการยกแปลงปลูกตากหน้าดินทิ้งไว้ 7 วัน (ภาพที่ 2.2) จากนั้นจึงไถกลับหน้าดินและทิ้งไว้อีก 7 วัน ไถพรวนดินอีกครั้งเพื่อย่อยให้ดินร่วนซุย ซึ่งการตากหน้าดินนั้นสามารถช่วยป้องกันกำจัดการเกิดโรคและแมลงศัตรูพืชที่ฝังตัวอยู่ในดินได้ในระดับหนึ่ง จากนั้นจึงผสมด้วยปุ๋ยคอกและไถพรวนคลุกเคล้าให้เข้ากันอีกครั้ง และยกร่องเป็นแปลงปลูกกว้าง 4 เมตร ความยาวของแปลงปลูกสามารถปล่อยไปตามขนาดความยาวของพื้นที่ ระหว่างแปลงปลูกจัดเป็นร่องน้ำหรือทางเดินกว้าง 1-2 เมตร และมีความลึกประมาณ 1 เมตร สำหรับระยะปลูกปักชำที่เหมาะสม คือ จัดให้หลุมปลูกห่างกันด้านละ 15×15 เซนติเมตร ปลูกโดยการนำเถาบัวบกที่มีข้อวางลง กลบดินตรงเถาที่มีราก รดน้ำให้ชุ่ม (ภาพที่ 2.3 และ 2.4) และพรางแสงให้บัวบกด้วยแสลน 70 เปอร์เซ็นต์ กางให้สูงจากแปลงปลูกประมาณ 160-200 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.5) เนื่องจากแดดร้อนจัดอาจส่งผลให้ต้นกล้าที่ลงแปลงใหม่ๆ แห้งและเฉาตายได้ หลังจากปลูกหรือปักชำ 7 วัน บัวบกจะเจริญแตกยอดใหม่ออกมาประมาณ 1-2 ยอด เมื่อบัวบกแผ่กระจายออกเต็มพื้นที่แปลงปลูก และจะเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่จะให้ผลผลิต ตลอดฤดูกาลที่ปลูกบัวบกจะใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง คือ ครั้งแรกหลังจากปลูก 15-20 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ หรือปุ๋ยสูตร 25-7-7 อัตรา 3-4 กิโลกรัมต่อไร่ ครั้งที่ 2 จะห่างจากการใส่ปุ๋ยครั้งแรก 15-20 วัน โดยใช้ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 3 กิโลกรัมต่อไร่ สำหรับการให้น้ำ สามารถให้น้ำได้ 2 วิธี คือ ให้น้ำโดยการใช้มินิสปริงเกอร์ (ภาพที่ 2.6) โดยวางท่อเอสล่อนที่ติดสปริงเกอร์ลงบนกลางแปลงปลูก เพื่อที่ต้นบัวบกจะได้รับน้ำอย่างทั่วถึง และให้น้ำโดยการใช้สายยาง เดินฉีดจนกว่าจะชุ่ม ซึ่งการให้น้ำควรให้เป็นประจำทุกวัน เช้า-เย็น ครั้งละ 10-15 นาที เก็บเกี่ยวบัวบกหลังจากปลูก 60-90 วัน และครั้งต่อๆไป สามารถเก็บเกี่ยวบัวบกเมื่ออายุ 30-60 วัน (ภาพที่ 2.7) ซึ่งจะเก็บใบและเถาที่สมบูรณ์เต็มที่ (วันดี กฤษณพันธ์. 2538) โดยใช้มีดหรือเคียวตัดห่างจากโคนต้น ประมาณ 10 เซนติเมตร เก็บใบเหลืองและวัชพืชอื่นๆ ออก นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด (ภาพที่ 2.8) จัดเป็นกำๆ บรรจุใส่ถุงพลาสติกใสเพื่อจำหน่าย (ภาพที่ 2.9)

ภาพที่ 2.1 ไหลหรือลำต้น มาตัดให้ติดราก ยาวประมาณ 10 ซม. ก่อนนำไปปลูก

ภาพที่ 2.2 เตรียมพื้นที่ และรดน้ำเพื่อให้ความชุ่มชื้นก่อนปลูก

ภาพที่ 2.3 นำต้นพันธุ์ที่เตรียมไว้มาปลูกลงแปลง

ภาพที่ 2.4 แปลงปลูกบัวบกเมื่อปลูกเสร็จแล้วก่อนจะทำการพรางแสงด้วยแสลน

ภาพที่ 2.5 สภาพแปลงปลูกบัวบก

ภาพที่ 2.6 ระบบการให้น้ำแบบสปริงเกอร์

ภาพที่ 2.7 การเก็บเกี่ยวใบบัวบก

ภาพที่ 2.8 การล้างใบบัวบกหลังการเก็บเกี่ยว

ภาพที่ 2.9 บรรจุภัณฑ์ของบัวบกก่อนนำออกจำหน่าย

บัวบกเป็นพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มสมุนไพรสาธารณสุขมูลฐาน ส่วนที่นำไปใช้คือ ใบ และทั้งต้น ซึ่งมีรสขา หอมเย็น สรรพคุณช่วยในการเร่งการเจริญเติบโตของเยื่อบุผิว รักษาแผลให้หายเร็ว รักษาแผลเป็น ใส่ในเจลรักษาแผลเปื่อยในปาก ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (กมลรัตน์ ณ หนองคาย. 2550; จิตระพี บัวผัน. 2548) ในประเทศบราซิลมีการนำมาใช้รักษามะเร็งมดลูก ซึ่งบัวบกจะช่วยให้แผลเรื้อรังหายเร็วขึ้น และเพิ่มภูมิคุ้มกันแก่ผู้ป่วย (ธวัชชัย กมลธรรม. 2557) บัวบกมีส่วนประกอบของเส้นใย พลังงาน แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามินเอ(มีค่อนข้างมาก) วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอาซิน วิตามินซี สารแอลฟาอไมริน(α-amyrin) สารพวกไตรเทอร์ปีน (triterpene) และไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (triterpene glycoside) หลายชนิด เช่น กรดเอซิอาติก (asiatic acid) กรดมาดิคาสสิก (madecassic acid) เอเชียโคไซด์ (asiaticoside) มาดิคาสซอล (madecassol) สารซาโปนิน (saponins) และสารขมชื่อแวลลารีน (vallarine) (วีณา เชิดบุญชาติ. 2547) ซึ่งสาร asiaticoside acid มีฤทธิ์ช่วยในการสมานแผล และเร่งการสร้างเนื้อเยื่อ ลดการติดเชื้อของแบคทีเรีย และเชื้อรา ทำให้แผลหายเร็วขึ้น และลดการเกิดแผลเป็นชนิดนูน (keloid) ข้อควรระวัง ในการใช้บัวบกก็คือ ไม่ควรใช้กับแผลที่มีขนาดใหญ่และไม่ควรรับประทานบัวบกเป็นประจำ เพราะใบบัวบกมีฤทธิ์เย็น ตามตำราจีนระบุไว้ว่าจะส่งผลกระทบต่อม้ามและอวัยวะภายใน ทำให้ไม่มีเรี่ยวแรง อ่อนเพลีย (จิตระพี บัวผัน. 2548) นอกจากจะนำมารับประทานสดแล้วยังได้มีการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ สามารถ

เพิ่มมูลค่าของบัวบกได้อย่างมากมาย อาทิ คั้นเป็นน้ำบัวบกสดพร้อมดื่ม ยาแคปซูล ไอศกรีมบัวบก ครีมบำรุงหน้าและผิว ครีมบำรุงส้นเท้า ยาสระผม สบู่ น้ำมันบำรุงผม ครีมอาบน้ำ

กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก (2556) รายงานว่า กลุ่มสมุนไพรโปรดักซ์แชมเปี้ยน 5 ชนิด ได้แก่ กระชายดำ กวาวเครือขาว บัวบก ไพล และลูกประคบ เป็นกลุ่มสมุนไพรที่สามารถต่อยอดเชิงธุรกิจนำมาผลิตเครื่องสำอาง ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก ซึ่งในช่วง 5 ปี อัตราการเติบโตของตลาดเครื่องสำอางสูงขึ้นร้อยละ 18 และในปี 2555 มี ยอดส่งออกเครื่องสำอางไปทั่วโลกมูลค่ากว่า 210,000 ล้านบาท จึงเป็นโอกาสอย่างยิ่งในการพัฒนาให้สารสกัดสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสร้างรายได้แก่ชุมชนผู้ปลูก ผู้ผลิต รวมถึงการควบคุมมาตรฐานสร้างความเชื่อมั่นแก่ผู้บริโภค โดยเฉพาะ กวาวเครือขาว บัวบก ซึ่งนอกจากบัวบกจะสมานแผลเป็นส่วนประกอบเครื่องสำอางยังสามารถช่วยในด้านความจำให้ดีขึ้น

ปัจจุบันการผลิตภาคเกษตร มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตเพื่อการอุตสาหกรรมและการส่งออก โดยการใช้สารเคมี ซึ่งเมื่อใช้เป็นระยะเวลานานอาจส่งผลกระทบให้ ดินเสื่อมโทรม ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้ผลิต ผู้บริโภค (อภิชาต ศรีสอาด. 2552) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2557) รายงานว่าได้ตรวจสุ่มหาสารพิษในผักและผลไม้ในปี 2556 พบสารพิษตกค้างในใบบัวบกมากที่สุด สูงถึงร้อยละ 33 รองลงมา คือ ดอกหอม ข่า ผักกาดขาว และกะหล่ำปลี ตามลำดับ และในปี 2555 ได้มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชมากขึ้น มีการนำเข้าสารเคมีสูงถึง 9 เท่า ปริมาณมากกว่า 70,000 ตัน ส่งผลกระทบต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยในกลุ่มสหภาพยุโรป และตัวเลขผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชก็มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งสารเคมีที่ทำให้มีผู้ป่วยมากที่สุดคือ สารออร์แกโนฟอสเฟท (organophosphate) และคาร์บาเมต (carbamate) เป็นสารที่อยู่ในประเภทกำจัดวัชพืชและเชื้อรา ผู้บริโภคมีสารพิษปนเปื้อนอยู่ร้อยละ 32 มากกว่าเกษตรกรผู้ใช้สารเคมีโดยตรงที่มีการปนเปื้อนอยู่ในเลือดเพียงร้อยละ 30 เท่านั้น ซึ่งหลายๆประเทศ ได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกร หันมาทำการเกษตรในระบบเกษตรอินทรีย์ โดยการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในท้องถิ่น เช่น ผักผลไม้สด สมุนไพร หอยเชอรี่ เศษปลาสด ขี้เถ้าแกลบ กากอ้อย กากน้ำตาล มาผลิตเป็นสารสกัดชีวภาพ ซึ่งสามารถใช้ได้ผลดี ลดต้นทุนการผลิต เกษตรกรมีรายได้เพิ่ม คุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

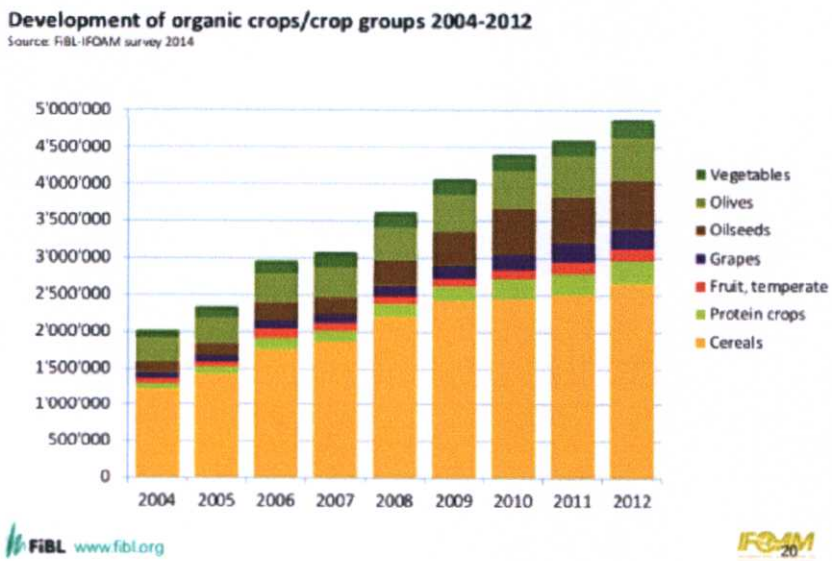
สมาพันธ์เกษตรอินทรีย์นานาชาติ (International Federation of Organic Agriculture Movements) หรือ IFOAM ได้ให้ ความหมายของเกษตรอินทรีย์ไว้ว่า "เป็นระบบเกษตรที่ผลิตอาหารและเส้นใยด้วยความยั่งยืนทางสิ่งแวดล้อม สังคม และเศรษฐกิจ โดยเน้นที่หลักการปรับปรุง

บำรุงดิน การเคารพต่อศักยภาพทางธรรมชาติของพืช สัตว์ และนิเวศการเกษตร เกษตรอินทรีย์จึงลดการใช้ปัจจัยจากภายนอก และหลีกเลี่ยง การใช้สารสังเคราะห์ เช่น ปุ๋ย สารกำจัดศัตรูพืช และเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์ แต่ในขณะเดียวกันก็พยายามประยุกต์ใช้ธรรมชาติในการเพิ่มผลผลิต และพัฒนาความต้านทานต่อโรคของพืชและสัตว์เลี้ยง หลักการเกษตรอินทรีย์นี้เป็นหลักการสากลที่สอดคล้องกับเงื่อนไขทางด้านสภาพภูมิอากาศ เศรษฐกิจ สังคม และวัฒนธรรมท้องถิ่นด้วย" (สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์. 2556) เกษตรอินทรีย์นอกจากจะเป็นเครื่องหมายความปลอดภัยของผลผลิตแล้ว ยังมีมาตรฐานสินค้าเกษตรอื่นๆ ที่มีข้อกำหนดการใช้สารเคมีดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 ชนิดสารเคมีที่มีการห้ามใช้ในสินค้าเกษตร

สินค้าเกษตร/มาตรฐาน	สารเคมี			
	ยาฆ่าแมลง	ปุ๋ยเคมี	ฮอร์โมนเร่ง	พืชตัดแต่งพันธุกรรม
ผักเกษตรอินทรีย์	ห้ามใช้	ห้ามใช้	ห้ามใช้	ห้ามใช้
ผักปลอดสารพิษ	ใช้ได้	ใช้ได้	ใช้ได้	ใช้ได้
ผักไฮโดรโพนิกส์	ไม่บังคับ	ใช้ได้	ใช้ได้	ห้ามใช้
ผักไร้สาร	ห้ามใช้	ห้ามใช้	ห้ามใช้	ไม่ระบุ

ที่มา: ศูนย์สารสนเทศสิ่งแวดล้อม กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม (ม.ม.ป.)



ภาพที่ 2.10 พื้นที่ปลูกเกษตรอินทรีย์ในแต่ละปี (ที่มา : กรีนเนท. 2557)

สถานการณ์เกษตรอินทรีย์โลก พบว่า ในปี 2555 มีเกษตรกรกว่า 1.9 ล้านครอบครัวที่ทำเกษตรอินทรีย์ใน 164 ประเทศทั่วโลก (เพิ่มขึ้น 1 แสนครอบครัว) โดยมีพื้นที่เกษตรอินทรีย์ 234.4 ล้านไร่ (เพิ่มขึ้น 1.9 ล้านไร่) ประเทศที่มีพื้นที่เกษตรอินทรีย์มากที่สุดคือ ออสเตรเลีย อาร์เจนตินา และสหรัฐอเมริกา แต่ประเทศที่เกษตรกรทำเกษตรอินทรีย์มากที่สุด คือ อินเดีย ยูกันดา และเม็กซิโก ส่วนด้านตลาดเกษตรอินทรีย์โลก พบว่า ปี 2554 มีมูลค่าถึง 63,800 ล้านเหรียญสหรัฐ (เพิ่มขึ้น 800 ล้านเหรียญสหรัฐ) ซึ่งตลาดที่ใหญ่ที่สุด คือ สหรัฐอเมริกา รองลงมาคือ เยอรมัน และฝรั่งเศส ประเทศที่มีสัดส่วนการซื้อสินค้าเกษตรอินทรีย์ต่อประชากรสูงสุด คือ สวิสเซอร์แลนด์ เดนมาร์ค และลักเซมเบิร์ก ในเอเชีย มีเกษตรกรที่ทำเกษตรอินทรีย์มากกว่า 6 แสนครัวเรือน โดยมีพื้นที่รวมกันกว่า 20 ล้านไร่ (10% ของพื้นที่เกษตรอินทรีย์โลก) ประเทศจีนเป็นประเทศที่มีพื้นที่ในการทำเกษตรอินทรีย์มากที่สุดในเอเชีย คือ 11.875 ล้านไร่ รองลงมาคือ อินเดีย (3.125 ล้านไร่) คาซัคสถาน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ส่วนประเทศไทยอยู่อันดับ 8 ของเอเชีย และเนื่องจากกระแสความตื่นตัวในการรักสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้ตลาดเกษตรอินทรีย์ในเอเชียก็เติบโตอย่างต่อเนื่องเช่นกัน (Willer and Lernoud. 2014)

สถานการณ์การผลิตเกษตรอินทรีย์ไทย พบว่า ในปี 2552 มีพื้นที่การผลิตเกษตรอินทรีย์ที่ได้รับการรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ 192,220.03 ไร่ ปี 2553 เป็น 212,995.34 ไร่ และปี 2554 เพิ่มขึ้นเป็น 219,309.66 ไร่ แต่ในปี 2555 กลับมีพื้นที่การผลิตเกษตรอินทรีย์ลดลงเป็น 205,385.81 ไร่ เนื่องจากปัญหาเศรษฐกิจการเมืองภายในประเทศ คือ การลดลงของพื้นที่นาข้าวเกษตรอินทรีย์เป็นหลัก พื้นที่ผักและผลไม้เกษตรอินทรีย์อาจลดลงบ้าง ส่วนพื้นที่ผักและผลไม้ผสมผสานเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 2.2) แต่ก็มีแนวโน้มที่ดีในเรื่องการขยายตัวของตลาดในประเทศ ที่มีสินค้าเกษตรอินทรีย์จำหน่ายหลากหลายเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 2.2 พื้นที่การผลิตเกษตรอินทรีย์ของประเทศไทยในแต่ละปี

ปี พ.ศ.	ข้าว	พืชไร่	ผัก	ผลไม้	ชา/กาแฟ	ผัก/ผลไม้ผสมผสาน	สัตว์น้ำ	อื่นๆ	รวม
2541	6,281.41		-					-	6,281.41
2542	5,510.13		-					-	5,510.13
2543	7,005.26		3,518.75					-	10,524.01
2544	9,900.50		3,518.75					-	13,419.25
2545	32,841.27		22,382.30					768.75	55,992.32
2546	46,719.33		22,260.64					768.75	69,748.72
2547	52,182.75	7,859.79	13,283.60	12,777.00				768.75	86,871.89
2548	108,302.02	6,731.20	14,844.76	4,995.35				761.00	135,634.33
2549	113,213.04	6,546.65	15,121.21	4,981.83				1,077.25	140,939.98
2550	77,005.03	10,103.64	16,503.19	15,907.20				203.75	119,722.81
2551	70,485.67	11,791.13	13,820.39	8,369.92				1,500.00	105,967.10
2552	112,152.27	45,920.63	18,066.51	7,342.20				8,738.43	192,220.03
2553	138,328.03	46,682.07	7,047.70	6,751.33	5,286.00	7,832.88		1,067.34	212,995.34
2554	140,711.61	46,682.07	7,132.83	9,485.50	5,605.00	7,935.13	1,838.52	130.50	219,390.66
2555	124,964.39	46,691.44	4,443.45	7,440.04	6,689.25	12,106.50	1,779.92	1,270.83	205,385.81

ที่มา:วิฑูรย์ ปัญญากุล (2556)

2.3 โรคและแมลงศัตรูบัวบก

ศัตรูบัวบกที่สำคัญคือ หนอนกัดกินใบ ถ้าหนอนชนิดนี้ระบาดมาก จะกัดกินใบ จนเหลือแต่ก้าน หรืออาจทำความเสียหายได้ทั่วทั้งแปลง การป้องกันกำจัด ถ้าพบจำนวนไม่มากให้เก็บตัวออกไปทำลายทิ้ง หรือหากพบว่ามีจำนวนมากอาจต้องใช้สารเคมีกำจัด นอกจากนี้ยังมีโรคที่สำคัญอีก 2 ชนิด คือ

1.โรคใบจุด ที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* sp จะทำให้ใบเป็นจุดแห้งสีน้ำตาลเหลือง กระจายอยู่ทั่วไป ขอบใบเหลือง ใบแห้ง ตายใบเป็นจุดสีน้ำตาล เมื่อระบาดขั้นรุนแรงมากขึ้น แผลอาจจะรวมกันเป็นแผลใหญ่ทำให้เกิดอาการใบไหม้ ใบแห้ง และต้นตายในที่สุด (ภาพที่ 2.11) ซึ่งเชื้อ *Cercospora* sp สามารถอยู่ข้ามฤดูได้โดยการสร้าง stroma ที่เกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใยที่มีผนังหนากลายเป็นแผ่นหรือก้อนแข็ง จะเกาะติดตามใบพืชที่เป็นโรคใบแห้งฟุบอยู่ตามพื้นดิน จนถึงฤดูปลูกใหม่ในช่วงที่ความชื้นเหมาะสมอย่างฤดูฝนก็จะงอกออกมาเป็นเส้นใยและสร้างสปอร์ปลิวไปตามลมตกลงบนใบพืชก่อให้เกิดโรคต่อไปได้อีก

2.โรครากเน่าโคนเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเชื้อจะเข้าทำลายรากและโคนต้น โดยอาการเริ่มแรก จะพบเส้นใยสีขาว จากนั้นสร้างเม็ด sclerotium บริเวณโคนต้นบัวบก ทำให้โคนต้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและน้ำตาล เมื่ออาการรุนแรงขึ้น ใบจะเหี่ยว และแห้งตายในที่สุด บัวบกที่ถูกเชื้อเข้าทำลายเป็นโรคจะตายบริเวณกว้างเป็นหย่อมๆ อยู่ทั่วแปลงปลูก (ภาพที่ 2.12) สามารถแพร่ระบาดในเขตที่มีอากาศร้อนชื้น แพร่ระบาดมากในช่วงฤดูฝนหรือบริเวณโคนต้นพืชที่ชื้นแฉะ ซึ่งเชื้อจะแพร่กระจายไปกับลมและน้ำ และเม็ด sclerotium ของเชื้อราสามารถทนทานต่อการทำลายของสารเคมีและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้มีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลานาน และอาศัยอยู่ในพื้นดินหรือติดไปกับต้นพันธุ์ได้

เชื้อ *S. rolfsii* มีลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA ดังนี้ เชื้อราสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่ออายุ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เส้นใยมีขนาดใหญ่ สีขาว และสร้าง sclerotium ลักษณะเป็นเส้นใยมาพันรวมกันเป็นเม็ดกลมบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนมาก โดยเริ่มสร้างจากบริเวณขอบโคโลนีก่อน เม็ด sclerotium รูปร่างกลม หรือเกือบกลม ผนังเรียบ ระยะแรกมีสีครีมและสีเข้มขึ้นจนมีสีน้ำตาลเมื่อแก่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร (พิศวาท บัวรา และคณะ. 2554)

โรครากเน่าโคนเน่า เป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งของการปลูกบัวบกเป็นการค้า ซึ่งเชื้อรา *S. rolfsii* มีพืชอาศัยมากกว่า 500 ชนิด Farr *et al.* (1989) รายงานว่ามีพืชมากกว่า 270 สกุลใน

ประเทศสหรัฐอเมริกาที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ *S. rolfsii* และพืชบางชนิดอ่อนแอต่อเชื้อชนิดนี้ เช่น ฟักทอง (pumpkin) ข้าวฟ่าง (sorghum) มันเทศ (sweet potato) ข้าวโพด (corn) ถั่วลิสง (peanut) นาซีซัส (narcissus) ไอริส (iris) ลิเลี่ยม (lilium) บานชื่น (zinnia) และเบญจมาศ (chrysanthemum) เป็นต้น และ Aycock (1966) รายงานถึงความเสียหายของผลผลิตถั่วลิสงที่ปลูกในพื้นที่ราบทางตอนใต้ของรัฐ North Carolina ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1959 ว่ามีความเสียหาย 1-60 เปอร์เซ็นต์ เป็นมูลค่า 10-20 ล้านดอลลาร์ สอดคล้องกับรายงานของ Mukherjee and Raghu (1997a) รายงานว่ามีการเกิดโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* ในแครอทซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในตระกูลเดียวกันกับบัวบก ทำให้พืชมีอาการต้นเหลือง ใบเหลือง รากเน่า และตายในที่สุด หรือสามารถขยายเป็นบริเวณกว้าง เช่น โรค root and stem rot ของพริก โรค damping-off ของมะเขือเทศ ซึ่งเป็นพืชทางเศรษฐกิจของประเทศไทยอย่างหนึ่ง (Haywared. 1991) และเข้าทำลาย ขิง บุก แครอท กระเจี๊ยบเขียว ฟักทอง และมะระ หลังการเก็บเกี่ยวด้วยโดยอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว ยังมีผลการต่อเจริญเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้เช่นกัน (Dasgupta and Mandal. 1989)

ภาพที่ 2.11 โรคใบจุด ที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* sp ในบัวบก

ภาพที่ 2.12 โรครากเน่าโคนเน่า ที่เกิดจากเชื้อ *S. roifsii* ในบัวบก

2.4 การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่า

การควบคุมและป้องกันกำจัดโรคพืช หมายถึง วิธีการใดๆ ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อลด หรือขัดขวางเชื้อสาเหตุที่จะก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตทางการเกษตร ให้อยู่ในระดับต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจ หรือหมดไปโดยสิ้นเชิง ซึ่งการใช้วิธีการต่างๆนั้นขึ้นอยู่กับ ชนิดของเชื้อสาเหตุ ปริมาณการระบาดของโรค และชนิดของพืชปลูก ซึ่งวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชมีวิธีการหลักๆ 6 ข้อ ดังนี้

1. วิธีกล (mechanical method) เป็นวิธีการอย่างง่ายๆ เพื่อทำลายหรือป้องกันการระบาดของเชื้อสาเหตุ ซึ่งวิธีการนี้เหมาะกับการเกษตรขนาดเล็ก หรือการระบาดของโรคยังไม่รุนแรงมาก เช่น การเก็บทำลายเชื้อสาเหตุด้วยแรงคน การเผาทำลายส่วนของพืชที่เป็นโรค

2. วิธีทางฟิสิกส์ (physical method) เป็นการใช้ อุณหภูมิ รังสี ความร้อนหรือไฟฟ้าในการทำลายเชื้อสาเหตุ

3. วิธีทางเขตกรรม (cultural method) เป็นวิธีการจัดสภาพแวดล้อมไม่ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุ โดยอาศัยวิธีการต่างๆ เช่น

- ไถพรวนดิน ตากหน้าดินก่อนการปลูกพืช แสงแดดและความร้อนจะช่วยทำลายเชื้อสาเหตุให้ลดน้อยลง
- ปลูกพืชหมุนเวียน (crop rotation) ช่วยป้องกันการสะสมของโรคพืช และเชื้อสาเหตุ
- กำจัดวัชพืชที่อาจเป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุ ด้วยการถางหรือพรวน
- เลือกพื้นที่ปลูก ที่ไม่เคยมีการระบาดของโรคมาก่อน
- เลือกฤดูปลูกที่เหมาะสม เพื่อหลีกเลี่ยงช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการระบาดของโรค

- ดูแลต้นพืช ให้มีความอุดมสมบูรณ์ ทนทานต่อการทำลายเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ เช่น การใส่ปุ๋ย การตัดแต่ง

- ใช้พันธุ์ต้านทานต่อโรคพืช (resistant variety) โดยการคัดเลือกหรือการผสมพันธุ์เพื่อหาพันธุ์ที่แข็งแรง ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุ

4. วิธีทางกฎหมาย (legal control) เป็นวิธีการห้าม และระบุโทษสำหรับผู้ฝ่าฝืน เช่น กฎหมายกักกันพืช และพระราชบัญญัติกักกันพืช ซึ่งการนำเข้าพืชบางชนิดจากต่างประเทศจะต้องปฏิบัติตามกฎหมาย เพื่อตรวจสอบโดยผ่านด่านกักกันพืช ให้แน่ใจว่าไม่มีโรคพืชที่สามารถแพร่ระบาดและสร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตทางการเกษตรของไทย

5. การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (chemical method) เป็นวิธีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดทำลาย หรือป้องกันศัตรูพืชโดยตรง

6. วิธีทางชีววิธี (biological method) เป็นการลดปริมาณ หรือลดกิจกรรมเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช หรือปรสิตที่อยู่ในระยะเจริญเติบโตหรือระยะพักตัวโดยการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่ามาช่วยในการป้องกันกำจัด ร่วมกับการจัดการสิ่งแวดล้อม พืชอาศัย และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (เกษม สร้อยทอง. 2532) ซึ่งกลไกในการป้องกันกำจัดโรคพืชของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้น มีอยู่ด้วยกันหลักๆ 3 วิธี คือ

- การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) หรือสารจำพวกเอนไซม์ (extracellular enzymes) ซึ่งสารดังกล่าวจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชให้ตายได้

- การแข่งขันซึ่งกันและกัน (competition) เชื้อจุลินทรีย์และเชื้อสาเหตุเมื่ออาศัยอยู่ด้วยกัน จะพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการแย่งอาหารและเจริญเติบโตครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืช

- การเป็นปรสิตของเชื้อราปฏิปักษ์ (parasitism) ที่เชื้อราปฏิปักษ์จะสร้างเส้นใยแทงทะลุ เข้าไปในเส้นใย และดูดของเหลว หรือพันรัดเส้นใย ก่อนการเข้าทำลาย ทำให้เชื้อสาเหตุ แห้งเหี่ยวและตายในที่สุด

ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี สามารถควบคุมโรคได้ดี อีกทั้งยังลดการใช้สารเคมีไม่ทำลายสภาพแวดล้อม และสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้ ทำให้เป็นที่ยอมรับเป็นอย่างมาก จึงได้มีการนำไปเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า เช่น เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นต้น

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *T. harzianum*

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Euascomycetes

Order Hypocreales

Family Hypocreaceae

Genus *Trichoderma*

Species *T. harzianum*

เชื้อ *T. harzianum* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มีสีเขียว (ภาพที่ 2.13) เจริญเติบโตได้ดีในดิน บนเศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต และซากอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ ชอบสภาพดินที่ชื้นแต่ไม่แฉะ สามารถเป็นปรสิต (Parasite) โดยการพันรัด เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้วสร้างเอนไซม์ เช่น ไคติเนส (chitinase) เบต้า-1,3 กลูคาเนส (β-1,3glucanase) และเซลลูเลส (cellulose) ย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยโรคพืช ทำให้สูญเสียความมีชีวิตลง นอกจากนี้ยังสามารถแย่งอาหารของเชื้อโรคพืชได้ดี จะเจริญเติบโตสร้างเส้นใยและสปอร์ได้อย่างรวดเร็ว บางสายพันธุ์สามารถสร้างปฏิชีวนสาร (antibiotics) เพื่อยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคจนเกิดการเหี่ยวสลายและตายได้ (ศูนย์บริหารศัตรูพืชขอนแก่น. ม.ม.ป)

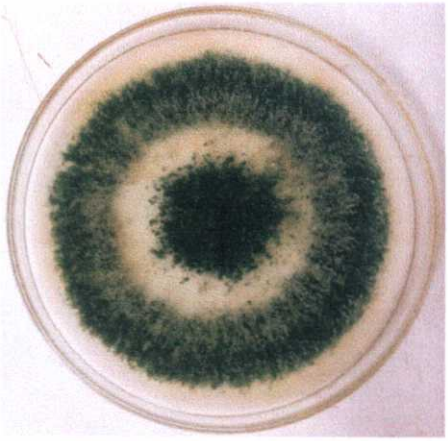
เชื้อ *T. harzianum* สามารถลดการเกิดโรครากเน่าและโรคเน่าคอดิน ที่เกิดจาก *S. rolfsii* และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในดินชนิดต่างๆได้ดี (Abada. 1994; Ansari. *et al.* 2011) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของจิระเดช แจ่มสว่าง และคณะ (ม.ม.ป.) ได้ทำการศึกษาการควบคุมโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* ในกล้าของมะเขือเทศที่เพาะในพีท โดยชุดแรกจะฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* ชนิดสด อัตราดิน 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 200 ลิตร กระถางละ 200 มิลลิลิตร หลังย้ายกล้าปลูก ชุดที่ 2 จะไม่ฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* แต่จะใช้น้ำสะอาดฉีดพ่นแทน และกรรมวิธีควบคุม พบว่าทุกกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ชนิดสดหลังย้ายกล้าลงปลูก มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย 55.6-88.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ถ้าในสภาพแปลงปลูกมีการระบาดของโรคโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* หลังย้ายกล้าลงแปลงปลูก ควรใช้เชื้อรา *T. harzianum* ชนิดสดผสมน้ำฉีดพ่น ซึ่งจะสามารถควบคุมการเกิดโรคได้นานกว่า 30 วัน หลังย้ายกล้าลงปลูก

Tsahouridou and Thanassoulopoulos (2002) ได้ศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma koningii* ในการควบคุมโรค damping-off ที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* ในมะเขือเทศ นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร PDA

148463

เมื่ออายุ 14 วัน เติมน้ำกลั่นใส่ลงไปในจานเลี้ยงเชื้อ *T. koningii* และขูดเชื้อบริเวณด้านบนของอาหาร กรองด้วยผ้าขาวบาง (cheese cloth) ก็จะได้เป็น conidia suspension เจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^6 conidia ml^{-1} และต้องมีเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้ออยู่ที่ 96% บนอาหาร WA นำเมล็ดของมะเขือเทศมาฆ่าเชื้อด้วย 5% hypochlorite นาน 10 นาที ตามด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำเมล็ดจำนวน 1 กรัม มาจุ่มลงใน conidia suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ 10 มิลลิลิตร นาน 30 นาที จุ่ม conidia suspension ร่วมกับ Tween-20 จุ่มด้วย Tween-20 อย่างเดียว และจุ่มด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอย่างเดียว (control) เก็บที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-4 เดือน พบว่า การใช้เชื้อ *T. koningii* อย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับ Tween-20 มีเปอร์เซ็นต์การงอก จำนวนต้นที่สามารถมีชีวิตอยู่รอด ความสูง และน้ำหนักสดของต้น มากกว่ากรรมวิธีควบคุม

Mukherjee and Raghu (1997a) ได้ศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp ในการควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ของพืชผักหลังการเก็บเกี่ยว โดยนำบีท แครอท บุก และมะระ จุ่มด้วยเชื้อ *Trichoderma* suspension วางบนกระดาษ Whatman เบอร์ 42 ที่ชุบด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร อยู่ภายในจานเลี้ยงเชื้อ กรรมวิธีควบคุมคือ การชุบด้วยน้ำกลั่นอย่างเดียว จากนั้นนำเชื้อ *S. rolfsii* ที่เจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางบนผักที่ชุบด้วย *Trichoderma* suspension และน้ำกลั่นเรียบร้อยแล้ว บรรจุลงในถุง polyethylene บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเส้นใย *S. rolfsii* เมื่อครบ 36 ชม. พบว่า กรรมวิธีที่ชุบด้วย *Trichoderma* sp. สามารถลดการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ในบีท บุก และมะระ ได้ 100% คือ ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ชุบด้วย *S. rolfsii* เพียงอย่างเดียว และในปีเดียวกันได้ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อเชื้อรา *Trichoderma* sp ในการควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ของพืชผักหลังการเก็บเกี่ยว โดยเลือกขิงหัวที่สมบูรณ์จุ่มลงไปใน conidia suspension ของเชื้อ *Trichoderma* sp ที่ความเข้มข้น 10^8 spores ml^{-1} วางบนกระดาษกรองที่ชุบด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร นำเชื้อ *S. rolfsii* มาวาง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 25 30 33 35 และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 7 วัน วัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. rolfsii* พบว่า เมื่อนำขิงมาชุบด้วย conidia suspension ของเชื้อ *Trichoderma* sp และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 30 และ 33 องศาเซลเซียส ไม่มีการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส (Mukherjee and Raghu. 1997b)



ภาพที่ 2.13 เชื้อ *T. harzianum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 5 วัน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

Domain Bacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Bacillales

Family Bacillaceae

Genus *Bacillus*

Species *B. subtilis*

เชื้อ *B. subtilis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งตรง ขนาด 0.5-2.5×1.2-7.0 ไมโครเมตร มี flagella รอบเซลล์ เรียงตัวกันเป็นคู่หรือเป็นสาย มี endospore รูปไข่หรือกลม เป็นพวกหายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) หรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (facultative anaerobic bacteria) เชื้อมีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม ขอบหยัก ผิวหน้าไม่เรียบ (ภาพที่ 2.14) ไม่สามารถสร้างอาหารได้เอง จึงต้องการอินทรีย์สารเป็นอาหาร (chemoorganotrophs) และยังสร้าง hydrolytic enzyme ที่สลาย polysaccharide, nucleic acid, lipid และสามารถปล่อยเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีน ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญมากที่สุด คือ 25-35 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5-8.5 (Sneath *et al.* 1986) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี จึงเป็นคุณสมบัติพิเศษที่แตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกัน เช่น สามารถทนความร้อนและความเค็มได้ดี (Holt *et al.* 1994)

B. subtilis เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่มีพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด Rasu *et al.* (2013) รายงานว่า เชื้อ *B. subtilis* สามารถควบคุมการเกิดโรครากเน่าของ Sugar beet ที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Nalisha *et al.* (2006) รายงานว่า การใช้เชื้อ *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ในสภาพอุณหภูมิต่างๆกันได้ เช่นเดียวกับ มัทนา ศรีหัตถกรรม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์ (ม.ม.ป.) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *B. subtilis* ให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* โดยใช้แสงยูวีขนาด 30 วัตต์ ฉายลงบนเซลล์ของ *B. subtilis* เป็นเวลา 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 และ 170 นาที จากนั้นนำ *B. subtilis* ที่รอดตายไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* โดยวิธี Dual Culture Plate Technique พบว่า เชื้อ *B. subtilis* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ไม่แตกต่างกันกับเชื้อที่ไม่ได้กลายพันธุ์ สอดคล้องกับการรายงานของ Allah (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* ในถั่ว พบว่า เชื้อ *B. subtilis* สามารถลดการเกิดโรคใบไหม้ได้

ภาพที่ 2.14 เชื้อ *B. subtilis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เมื่ออายุ 1 วัน

2.5 สารที่ใช้ในการป้องกันโรค

2.5.1 สารเคมี

การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช เป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้กันมากที่สุด เพราะมีประสิทธิภาพสูง สามารถแก้ปัญหาเฉพาะหน้าได้ดี สะดวกรวดเร็ว แต่ก็เป็นวิธีการที่มีอันตรายต่อผู้ใช้ และสิ่งแวดล้อมมากถ้าหากใช้อย่างไม่ถูกต้อง ใช้ผิดวิธีหรือขาดความรู้ความเข้าใจในสารเคมีและวิธีการใช้ ตลอดจนการขาดความระมัดระวังในการใช้สารเคมี สามารถแบ่งตามชนิด

เชื้อที่เป็นสาเหตุ ดังนี้ สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (Fungicides) สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (Bactericide or Bacteriocide) และสารเคมีกำจัดไส้เดือนฝอย (Nematicide) เมื่อแบ่งตามคุณสมบัติการเข้าสู่พืช

1. สารเคมีที่ออกฤทธิ์แบบสัมผัส (contact fungicide) สารเคมีกลุ่มนี้เมื่อฉีดพ่นลงบนต้นพืชแล้วจะปกคลุมผิวพืชภายนอก ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา หรือยับยั้งการสร้างสปอร์บริเวณที่สัมผัสโดยตรง เป็นสารที่ใช้แบบป้องกัน (protectant) ก่อนที่พืชจะติดเชื้อ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคได้กว้างขวาง

2. สารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) สารเคมีชนิดนี้เมื่อฉีดพ่นลงบนพืชแล้วจะถูกดูดซึมเข้าไปภายในเนื้อเยื่อพืช และสามารถเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ได้ เหมาะสำหรับการรักษาพืชที่เพิ่งเริ่มเป็นโรค หรือเมื่ออาการของโรคยังไม่รุนแรงนักจึงจะได้ผลดี

Wokocha (1990) ได้มีการศึกษาการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ในมะเขือเทศ โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma viride* ร่วมกับสารเคมี PCNB, captan และ Aldrex T พบว่า การใช้ *T. viride* ร่วมกับ captan และ Aldrex T สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ถึง 84.9 และ 79.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Roy *et al.* (2010) ได้มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช carbendazim ร่วมกับ mancozeb ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ในเมล็ดพริก พบว่า เมื่อใช้สารเคมีทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ในเมล็ดพริกได้ดี

Khattabi *et al.* (2001) ได้ศึกษาการใช้สารเคมี และสารเคมีร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* ในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ซึ่งสารเคมีที่ใช้คือ benomyl ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 250 mg a.i./m^2 สาร oxyquinoleine ที่ระดับ 21, 42 และ 210 mg a.i./m^2 และสาร hymexazol ที่ระดับ 54, 108 และ 540 mg a.i./m^2 พบว่า สารเคมีทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ โดยที่ benomyl ทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุมากที่สุด สอดคล้องกับการรายงานของ Johnson and Subramanyam (2000) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีทั้ง 8 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ภายในห้องปฏิบัติการ พบว่า hexaconazole, penconazole และ propiconazole มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสาร tricyclazole และ mancozeb มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุได้ 80 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.5.2 สารธรรมชาติ

น้ำมันหอมระเหยจากข่า จากการศึกษาของ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรณภพ บรรเจิดเชิดชู

(2551) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากข่า คือสาร geraniol และสาร linalool ด้วยวิธี poisoned food technique ที่ระดับความเข้มข้น 100 – 10000 ppm นำมาทดสอบกับเชื้อรา *S. rolfsii* ตรวจดูการสร้างและทดสอบการงอกของเมล็ด Sclerotium พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 300 600 900 1000 และ 10000 ppm ของน้ำมันข่า, geraniol และ linalool สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ 100% สอดคล้องกับรวีวรรณ เดื่อมขันมณี (2551) ได้ทดสอบประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากข่าในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii*, *Curvularia lunata*, *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Pyricularia oryzae* โดยที่น้ำมันหอมระเหยมีระดับความเข้มข้น 0 1,000 3,000 4,000 5,000 และ 10,000 ppm และความเข้มข้นของสารสกัดจากข่า 0 1,000 5,000 10,000 และ 100,000 ppm ปรากฏว่าสารสกัดจากข่าที่ระดับความเข้มข้น 100,000 ppm ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้เพียงชนิดเดียว ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากข่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* และ *P. oryzae* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกระดับความเข้มข้น และยับยั้งเชื้อ *C. lunata* และ *C. gloeosporioides* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm ขึ้นไป

จันทิรา แสงสีเหลือง และคณะ (2551) ได้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 11 ชนิด ได้แก่ ใบพลู กานพลู ตะไคร้ ตะไคร้หอม ขมิ้นชัน ข่า ขิง กระเทียม กระเพรา หนอนตายหยาก และว่านน้ำ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* พบว่า สมุนไพรที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้ดี 3 ชนิด ได้แก่ ใบพลู ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm เท่ากับ 46.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระดับความเข้มข้น 20,000 ppm ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และกานพลูทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเติบโตได้ 100 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน ขมิ้นชัน ที่ 10,000 ppm เท่ากับ 56.45 เปอร์เซ็นต์ 20,000 ppm เท่ากับ 51.79 เปอร์เซ็นต์ 40,000 ppm เท่ากับ 62.05 เปอร์เซ็นต์ และ 60,000 ppm เท่ากับ 62.05 เปอร์เซ็นต์

น้ำหมักชีวภาพ พบว่า จากผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร โดยใช้น้ำหมักชีวภาพที่ได้จากกล้วยน้ำหว้าสุก และกากน้ำตาล อัตราส่วน 3:1 ใช้น้ำหมัก 600 ซีซี ผสมกับน้ำ 20 ลิตร สามารถเพื่อยับยั้งการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนส้ม ลำไย มะละกอ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของพริก ไม้ผล มะม่วง ทุเรียน ฝรั่ง มะละกอ หอมหัวใหญ่ กล้วยไม้ ผัก ไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด

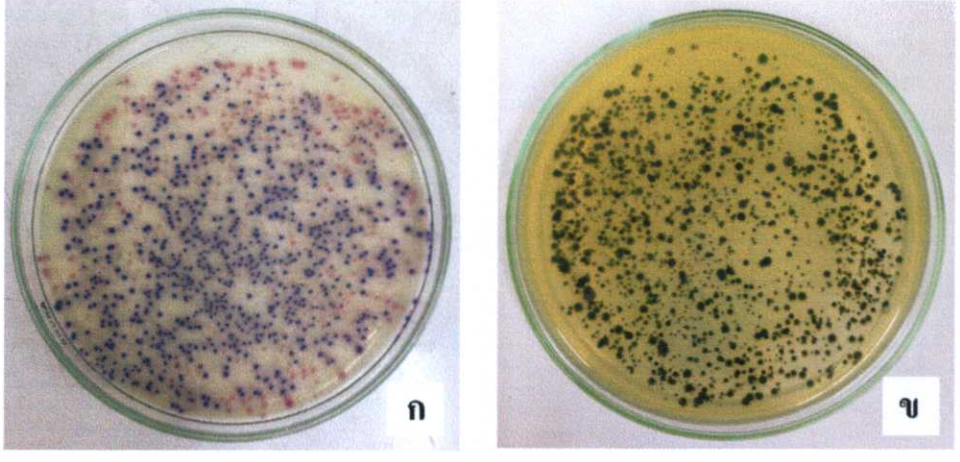
2.6 เชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน อยู่ในกลุ่มของ Enterobacteriaceae ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมลบ ดำรงชีวิตแบบใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้ เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 7-10 องศาเซลเซียสไปจน 50 องศาเซลเซียส ปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ไม่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์แต่สัตว์สามารถเป็นพาหะของเชื้อนี้ได้ เชื้อเหล่านี้พบในโค แกะ สุกร กวาง สุนัข และสัตว์ปีก สัตว์ที่มีเชื้อ โดยเฉพาะสัตว์ที่อายุน้อยสามารถปล่อยเชื้อออกมาพร้อมกับอุจจาระได้ ส่วนใหญ่โคเป็นพาหะหลักของเชื้อ *E. coli* O157:H7 (หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำในสัตว์. ม.ม.ป.) ซึ่งส่วนใหญ่พบเป็นจำนวนมากในอุจจาระ แต่ไม่พบในปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้ทำให้ *E. coli* มีความสำคัญในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ว่าผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลหรือไม่ (เกษร เทพแปง. ม.ป.ป.) เชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่มักไม่เป็นอันตรายและสามารถถูกยับยั้งได้ในทางเดินอาหารของคนแต่ก็ยังมีบางชนิดที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ระยะฟักตัว 10 ชั่วโมง ถึง 8 วัน ทำให้มีอาการอาเจียนท้องเสีย มีไข้ และปวดท้อง ท้องเสียตั้งแต่อ่อนๆจนถึงรุนแรง อาจทำให้ขาดน้ำอย่างรุนแรงถึงช็อคได้ หรือมีอาการแทรกซ้อนที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (กันยา หว่านฉรงค์. 2555) ซึ่งกลไกการเกิดโรค เชื้อสามารถสร้างสารพิษชิกา ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Shiga toxin 1 (STX1) และ Shiga toxin 2 (STX2) นอกจากนั้น เชื้อโรคยังสร้างโปรตีนอินติมิน (Intimin) เพื่อใช้ในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ และสร้างสารพิษชนิดเอนเทอโรฮีโมลัยซิน (enterohaemolysin) ส่งผลต่อภาวะเม็ดเลือดแดงแตกและไตวาย (จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์. 2554)

Staphylococcus aureus มีรูปร่างเป็นทรงกลม (cocus) อยู่รวมกันเป็นพวงคล้ายพวงองุ่น ไม่มีการสร้างสปอร์ (non spore forming bacteria ดู bacterial spore ด้วย) เป็นเชื้อที่ไม่เคลื่อนที่ ส่วนใหญ่ไม่มีแคปซูล ให้ผลบวกในการทดสอบ catalase และในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะสลายน้ำตาลกลูโคสให้กรดอินทรีย์ จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe คือเจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ ลักษณะของโคโลนีกลม ขอบเรียบนูน มีดำ สีครีม เหลือง ส้ม (ภาพที่ 2.15) (ขึ้นอยู่กับชนิดของคาโรตินอยส์ในเซลล์เมมเบรน รวมถึงอุณหภูมิ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ) เชื้อสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดีที่สุด คือ 30-37 องศาเซลเซียส ทนความร้อนได้ถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

เชื้อ *S. aureus* สามารถพบแหล่งอาศัยของเชื้อชนิดนี้ได้จำนวนมากใกล้บริเวณเปิดของผิวร่างกาย และสัตว์เลี้ยง เช่น วัว น้ำนมดิบอาจมีการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* จากวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ หากดื่มน้ำนมหรือเนยแข็งที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อน หรือในอาหารชนิดใดก็ตามที่ผลิตมาจากสัตว์หรืออาหารที่สัมผัสด้วยมือมนุษย์ โดยที่ไม่มีการผ่านความร้อนที่สามารถทำลายเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* ก่อนนำไปบริโภค จะมีโอกาสเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อนี้ได้อย่างมาก

เชื้อ *S. aureus* สามารถทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น ปนเปื้อนในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ซึ่งอาการขั้นแรกที่พบคือ ผู้ป่วยจะมีน้ำลายออกมามากผิดปกติ คลื่นไส้ วิงเวียน อาเจียน ท้องเสีย เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย มักพบว่ามีไข้ต่ำๆ มากกว่าไข้สูง อาการจะคงอยู่ 1-2 วันก็หายโดยไม่ต้องรักษา หากผู้ป่วยบางรายที่มีอาการรุนแรง จะปวดศีรษะ เหงื่อออก กล้ามเนื้อเป็นตะคริว ความดันโลหิตเปลี่ยนแปลง อาจพบเลือดและมูกในอุจจาระ ชีพจรอ่อนและช็อค ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อ และระยะฟักตัวของโรคจะใช้เวลา 2-4 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากอาหารเป็นพิษหรือโรคติดเชื้อชนิดอื่นๆ ที่มีระยะฟักตัวนานกว่านี้ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2556)



ภาพที่ 2.15 ลักษณะของเชื้อทั้ง 2 ชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน

ก = ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Escherichia coli* TISTR780 (สีม่วง) และโคโลนีของ Coliform (สีชมพู) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult agar

ข = ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR118 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar

2.7 ปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในบัวบก

เกษตรกรส่วนใหญ่ยังคงมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืชในภาคเกษตร มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตเพื่อการอุตสาหกรรมและการส่งออก เมื่อใช้เป็นระยะเวลานานอาจส่งผลกระทบให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ดินเสื่อมโทรม ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้ผลิต ผู้บริโภค เกษตรกรหลายๆรายก็เริ่มที่จะมาทำการเกษตรแบบเกษตรอินทรีย์ (อภิชาต ศรีสอาด. 2552) ได้มีการศึกษาของอนันต์ พิริยะภัทรกิจ และคณะ (2552) ใส่ปุ๋ยมูลโคในบัวบก ที่อัตรา 2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ส่งผลให้ต้นมีทรงพุ่มขนาดใหญ่และยาวมากขึ้น ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินทำให้ดินโปร่งร่วนและเก็บความชื้นได้ดีรวมทั้งยังมีอินทรียวัตถุและปริมาณธาตุอาหารพืชมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม จึงส่งผลให้บัวบกทุกสายต้นเจริญเติบโตดี แต่การปลูกแบบระบบเกษตรอินทรีย์นั้น เป็นการกระตุ้นให้เกษตรกรใช้ปุ๋ยคอกซึ่งอาจจะมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และจะปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายของสัตว์ (Brackett. 1999) บางชนิดหากเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ จะทำให้มีอาการอาเจียนท้องเสียมีไข้และปวดท้องท้องเสียตั้งแต่อ่อนๆจนถึงรุนแรง อาจทำให้ขาดน้ำอย่างรุนแรงถึงช็อคได้ หรือมีอาการแทรกซ้อนที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (กันยา หว่านณรงค์. 2555) มีรายงานของปิยะมาศ โสมภีร์ และคณะ (2554) กล่าวไว้ว่า การปลูกแบบเกษตรอินทรีย์โดยการใช้มูลวัวที่ไม่ได้มีการหมักนำมาเป็นปุ๋ยอินทรีย์ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E.coli* ในพืชผัก นอกจากนี้อาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม โดยมาจากดิน หรือน้ำ (Brackett. 2000)

กรมการค้าต่างประเทศ (2549) รายงานว่า ผักของไทยที่ส่งออกไปต่างประเทศในแถบยุโรป จำนวน 23 ชนิด ได้แก่ ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง ใบกระเพรา ใบโหระพา ผักแขยง ใบสะระแหน่ ผักแพรว ต้นหอม ผักคื่นช่าย ใบและดอกกุยช่าย ชะอม ตะไคร้ ผักบุ้ง ผักแว่น ผักกระเฉด ใบบัวบก ใบชะพลู ผักโขมแดง ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง พริกขี้หนู และผักปลัง ได้มีการแจ้งเตือนการพบเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* และจะยกเลิกการห้ามนำเข้าหากไทยมีการรับรองว่าผักที่ส่งออกปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาและสร้างความเชื่อมั่นให้กับประเทศคู่ค้าของไทย ในปี 2550 จึงได้ออกประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 55 ง. เรื่อง กำหนดชนิดหรือประเภทของผักและผลไม้ ที่ต้องมีหนังสือรับรองการส่งออก (กรมการค้าต่างประเทศ. 2550)

2.8 วิธีการลดจุลินทรีย์ปนเปื้อน

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอนในกระบวนการผลิตตั้งแต่ในแปลงปลูก การเก็บเกี่ยวการทำความสะอาด การคัดบรรจุ จนกระทั่งการขนส่งผลผลิต ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยนำเอาการจัดการคุณภาพและมาตรฐานอาหารปลอดภัย (Food safety) เข้ามาใช้เพื่อการลดการปนเปื้อนได้ โดยเริ่มจากการปฏิบัติดูแลรักษาต้นพืชและแปลงปลูกพืชตามหลัก GAP และเก็บเกี่ยวผลผลิต เคลื่อนย้าย คัดแยกทำความสะอาดและบรรจุตามหลัก GMP สามารถช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตผลได้ ซึ่งในขั้นตอนการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวควรล้างผลผลิตด้วยน้ำที่สะอาด 3 ครั้ง ก็สามารถลดปริมาณการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ 1-4 log CFU แล้ว (เชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. ม.ม.ป.) เช่นเดียวกับการรายงานของจันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ (2554) การล้างด้วยน้ำเปล่า ล้างผักด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง จะสามารถชะล้างเชื้อ *E. coli* และเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ปนเปื้อนได้ และเมื่อซื้อผักและผลไม้สดมานั้นควรล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง หรือล้างโดยเปิดน้ำก๊อกให้แรงพอประมาณ ปล่อยให้น้ำไหลผ่านผักผลไม้ นานประมาณ 2 นาที เด็ดผักคลี่เป็นใบๆ หรือลอกเปลือกชั้นนอกของผักผลไม้ออกใส่ตะแกรงโปร่ง ซึ่งวิธีเหล่านี้ จึงเป็นวิธีการเบื้องต้นในการป้องกันและรักษาสุขอนามัยตนเองให้ปลอดภัยจากการบริโภคผักและผลไม้ที่ปลอดภัยจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (สำนักงานมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2554) สอดคล้องกับการรายงานของ Cruz *et al.* (2007) การนำแครอทมาล้างด้วยน้ำเปล่าก็มีส่วนที่ช่วยลดปริมาณของจุลินทรีย์รวมได้เช่นเดียวกับ Galvez *et al.* (2009) รายงานว่าน้ำเปล่าสามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้ประมาณ 0.5 log CFU ในผักกาดหอม

แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (calcium hypochlorite) เป็นสารประกอบคลอรีนมีสูตรโมเลกุล $CaCl_2O_2$ ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ใช้สำหรับฆ่าเชื้อวัตถุดิบและฆ่าเชื้อน้ำที่ใช้ในกระบวนการต่างๆ มีทั้งชนิดที่เป็นผง หรืออัดเป็นเม็ด ความเข้มข้นของคลอรีนออกฤทธิ์ (active ingredient) 65 หรือ 65 เปอร์เซ็นต์ นอกจากการใช้เพื่อฆ่าเชื้อแล้ว calcium hypochlorite ยังให้ผลดี คือ เกลือแคลเซียม (calcium salt) เมื่อรวมตัวกับ pectin ในผนังเซลล์ของผักและผลไม้ จะช่วยทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงขึ้น และต้านทานโรคได้ดีอีกด้วย (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป.)

Behrsing *et al.* (2000) ได้มีการศึกษาประสิทธิภาพของแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในการกำจัดเชื้อ *E. coli* ในผักสด โดยนำผักกาดหอมและบล็อคโคลี่มาล้างด้วยสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความ 0, 50 และ 100 mg/l เป็นระยะเวลา 30 วินาที 2 และ 5 นาที พบว่า การล้าง

ด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับ 100 mg/l นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณของเชื้อ *E. coli* ได้ถึง 2.4 log CFU/g

กรดแลคติก (Lactic acid) มีสูตรโครงสร้าง $C_3H_6O_3$ ใช้เป็นสารในห้องปฏิบัติการ เป็นสารที่ทำให้เกิดความเปรี้ยวในอาหารและน้ำนม รวมทั้งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านยา และเครื่องสำอาง สารนี้ละลายน้ำได้

โอโซนเป็นก๊าซธรรมชาติ ที่มีการทำปฏิกริยาออกซิเดชั่นสูง โดยไม่เหลือสารพิษตกค้างใดๆ นอกจากออกซิเจน (Ramawamy *et al.* 2007) ปัจจุบันจึงได้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เช่น โรงงานผลิตน้ำดื่มผ่านการฆ่าเชื้อด้วยโอโซน เครื่องฟอกอากาศ เครื่องปรับอากาศในบ้าน เป็นต้น ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และโปรโตซัวได้ดีและรวดเร็ว ซึ่งสามารถทำให้อยู่ในรูปแบบของสารละลายโดยผ่านก๊าซโอโซนในน้ำอย่างต่อเนื่อง ระดับที่ใช้อยู่ระหว่าง 0.5 – 4.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (เชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. ม.ม.ป.) นอกจากนี้น้ำโอโซนก็สามารถลดจำนวนประชากรจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษาผักตัดแต่งและผลไม้ให้คงความสดได้นานยิ่งขึ้น (Kim *et al.* 1999) รวมทั้งยังสามารถลดจุลินทรีย์ก่อโรค อาทิ *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *E. coli* O157:H7 (Singh *et al.* 2002a) ดังนั้นการใช้น้ำโอโซนจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่างๆ เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ อีกทั้งยังเป็นสารในกลุ่ม GRAS (Generally Regarded As Safe) คือ เป็นสารที่มีความปลอดภัย เนื่องจากไม่ทำให้เกิดสารตกค้างในผลผลิต

Rodgers *et al.* (2004) ได้มีการศึกษาการใช้น้ำโอโซนเปรียบเทียบกับการล้างด้วยสารเคมีต่างๆกันในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 และเชื้อ *L. monocytogenes* ในแอปเปิ้ล ผักกาดหอม สตอร์เบอรี่ และแคนตาลูป พบว่า น้ำโอโซนสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ได้ประมาณ 5.6 log CFU/g ซึ่งใช้โอโซน 3 mg/l สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2005) นำผักคื่นฉ่ายสดมาล้างด้วยน้ำโอโซนที่ระดับ 0.03, 0.08 และ 0.18 ppm เก็บรักษาที่ระยะต่างๆกัน พบว่า น้ำโอโซนที่ระดับ 0.18 ppm สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์รวมได้ถึง 1.69 log CFU/g และยังคงคุณภาพของผักคื่นฉ่ายได้ดีกว่าการล้างด้วยน้ำโอโซนที่ระดับอื่นๆ และ Singh *et al.* (2002b) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำโอโซนในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในผักกาดหอมและเบบี้แครอท โดยนำผักทั้งสองชนิดมาล้างด้วยน้ำโอโซน ที่ระดับ 0, 5.2, 9.7 และ 16.5 mg/l เป็นระยะเวลา 1, 5, 10 และ 15 นาที พบว่า ที่ระดับ 5.2 mg/l ขึ้นไปสามารถลดปริมาณ

ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เวลาที่ล้างนานมากขึ้น ปริมาณของเชื้อก็จะลดน้อยลงยิ่งขึ้น และ Singh *et al.* (2003) ก็ได้มีการศึกษาการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในหญ้าอัลฟาฟ่าเช่นกัน โดยเปรียบเทียบการล้างด้วย น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว คลอรีน น้ำโอโซน น้ำมันหอมระเหยจากโหระพา และล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซนและคลอรีน พบว่า การล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา 5.0 ml/l นาน 3 นาที ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 14.3 mg/l นาน 3 นาที และคลอรีน 25.0 mg/l นาน 5 นาที สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้เป็นอย่างดี

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วิธีการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่า

1. โรงเรือนเพาะชำสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร
2. กระถางพลาสติก ขนาด 15 เซนติเมตร
3. บัวรดน้ำ
4. ปุ๋ยคอก และน้ำหมักชีวภาพ
5. เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum, B. subtilis* และเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii*
6. ถังพลาสติก ขนาด 100 ลิตร
7. ป้ายแสดงกรรมวิธีทดลอง
8. เครื่องชั่ง (ยี่ห้อ Scaltec, รุ่น SPB61)
9. กระบอกตวงสารขนาด 1,000 มิลลิลิตร
10. กระดาษบันทึกผลการทดลอง
11. ตลับเมตร และเวอร์เนีย
12. มีดและเขียง
13. จานเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์เลี้ยงเชื้อ
14. ตู้อบเครื่องแก้ว (ยี่ห้อ Contherm รุ่น 2400)
15. ตู้บ่มเชื้อ (ยี่ห้อ Memmert รุ่น INE600 256l)
16. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (ยี่ห้อ Tomy รุ่น ES-315)
17. ไมโครเวฟ (ยี่ห้อ LG รุ่น MS2120VW)
18. ตู้เขี่ยเชื้อ (ยี่ห้อ GTech รุ่น GT-CL120ST)
19. ไมโครปิเปต

3.1.2 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (ยี่ห้อ GTech รุ่น GT-CL120ST)
2. กล้องจุลทรรศน์ (ยี่ห้อ Nikon รุ่น Labophot)
3. กระบอกตวง

4. จานเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์เลี้ยงเชื้อ

5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ And รุ่น FX-2000i)

6. ตู้อบเครื่องแก้ว (ยี่ห้อ Contherm รุ่น 2400)

7. ตู้บ่มเชื้อ (ยี่ห้อ Memmert รุ่น INE600 2561)

8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (ยี่ห้อ Tomy รุ่น ES-315)

9. ไมโครเวฟ (ยี่ห้อ LG รุ่น MS2120VW)

10. ตู้แช่แข็ง –20°C

11. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง

12. ไมโครปิเปต

13. แบบบันทึกข้อมูล

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (Merck, Germany)

2. Agar (Criterion, U.S.A)

3. Simmon's Citrate Agar (Merck, Germany)

4. Lauryl SulphateTryptose Broth (LST) (Criterion, U.S.A)

5. Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB) (Criterion, U.S.A)

6. *Escherichia coli* Broth (EC Broth) (Criterion, U.S.A)

7. Levine's Eosin Methylene Blue (EMB) (Merck, Germany)

8. Plate Count Agar (Merck, Germany)

9. Trytophan Broth (Sigma Aldrich, Switzerland)

10. Methyl Red VogesProskawer Broth (MR-VP) (Merck, Germany)

11. Tryptone (Biobasicinc, Canada)

12. Tryptic Soy Broth (Merck, Germany)

13. Bactident Coagulase (Merck, Germany)

14. Baird Parker Agar (Merck, Germany)

15. Chromocult Agar (Merck, Germany)

3.1.4 สารเคมี

1. Sodium chloride, NaCL (Ajax Finechem, Australia)

2. Lactic acid

3. Methyl red (Sigma Aldrich, Switzerland)

4. Kovac (Merck, Germany)

5. α-Napthol ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (Sigma Aldrich, Switzerland)

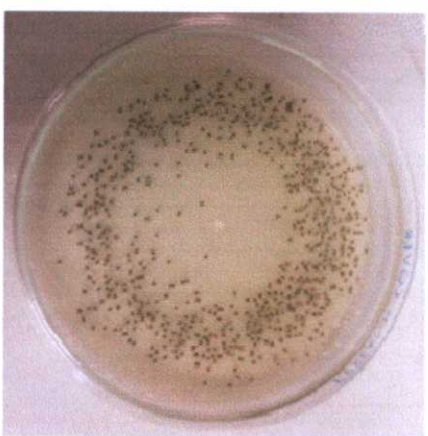
6. Potassiumhydroxide (KOH) ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (Merck, Germany)

7. Alcohol 70, 95%

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การแยกเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบก

เก็บตัวอย่างของโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกจากแปลงเกษตร จังหวัดนครปฐม นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue Transplanting โดยตัดใบที่แผลเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฆ่าเชื้อด้วยคลอล็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ และใช้กระดาษทิชชู่ที่ฆ่าเชื้อแล้วซับให้แห้ง จากนั้นวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเติบโตแล้ว (ภาพที่ 3.1) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไปทำการพิสูจน์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า โดยอาศัยหลักการพิสูจน์โรค Koch's Postulates และต้นบัวบกต้องแสดงอาการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าเช่นเดิม (ภาพที่ 3.2) จากนั้นจึงนำไปนำไปแยกเชื้อลงในหลอดอาหารเพื่อเก็บไว้เป็น stock culture และนำไปทดสอบความสามารถในการเกิดโรครากเน่าโคนเน่า



ภาพที่ 3.1 เชื้อ *Sclerotium roifsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 5 วัน

ภาพที่ 3.2 ลักษณะอาการของโรครากเน่าโคนเน่า เมื่อพิสูจน์การเกิดโรคด้วยเชื้อ *S. roifsii*

3.2.2 การเตรียมเชื้อปฏิปักษ์และน้ำหมักชีวภาพ

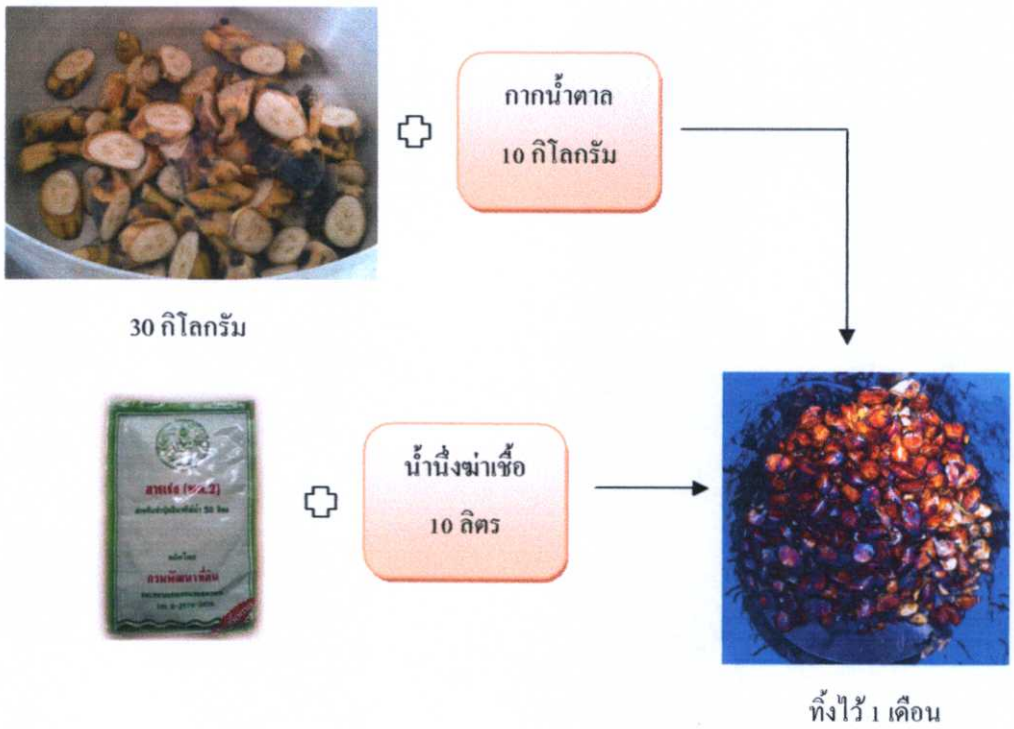
การแยกเชื้อ *Trichoderma* sp นำตัวอย่างดินจากแปลงเกษตรที่ปลูกบัวบก จังหวัดนครปฐม จำนวน 5 แหล่ง มาตรวจหาเชื้อด้วยวิธี soil dilution plate ชั่งดินจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในขวดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันดีและวางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำไปทำการเจือจางโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ซึ่งตัวอย่างนั้นจะถูกทำให้เจือจางลงอีก 10 เท่า คือ 1:10 หรือ 10^{-1} ทำต่อไปเรื่อยๆ จนได้ความเข้มข้น 1:1,000,000 หรือ 10^{-6} จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างของเชื้อจากทุกความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม Rose Bengal 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Streptomycin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อราเจริญขึ้น จะมีโคโลนีเป็นเป็นวงกลม เส้นใยมีสีเหลือง หรือสีเขียว จึงแยกลงในอาหาร PDA และเก็บไว้เป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมเชื้อ *T. harzianum* เพื่อนำไปทดลองในโรงเรือนทดลองและสภาพแปลงปลูก ทำการเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* โดยนำมาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำเมล็ดข้าวฟ่างมา 1 กิโลกรัม จากนั้นล้างให้สะอาดและนำเมล็ดข้าวฟ่างไปต้มจนให้เมล็ดแตกและนิ่ม กรองเอาน้ำออกให้เหลือแต่เมล็ด ผึ่งให้แห้ง จึงนำเมล็ดไปบรรจุในถุงพลาสติกใส ถุงละ 25 กรัม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จึงใส่โคโลนีของเชื้อ *T. harzianum* แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จึงนำไปใช้ผสมกับดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนที่จะปลูกบัวบก (ภาพที่ 3.3)

เชื้อ *B. subtilis* โดยนำเชื้อที่ทางสถาบันวิจัยพืชสวนได้แยกไว้แล้วมาใช้

การเตรียมน้ำหมักชีวภาพ โดยนำกล้วยน้ำว้าที่สุกแล้ว มาหั่นเป็นชิ้นๆ ชั่งมา 30 กิโลกรัม และกากน้ำตาล จำนวน 10 กิโลกรัม มานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงใส่ลงในถังพลาสติกที่ล้างทำความสะอาดเตรียมไว้ และใส่พด. 2 ที่ผสมกับน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 ลิตรลงไปในถัง คนให้ทั่ว ปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ 1 เดือน ก่อนจะนำมาใช้ในการทดลอง ซึ่งอัตราการใช้อยู่ที่ 60 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร (ภาพที่ 3.4)

ภาพที่ 3.3 การเตรียม *T. harzianum* ในข้าวฟ่าง



ภาพที่ 3.4 การเตรียมน้ำหมักชีวภาพ

3.2.3 การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

แผนการทดลองแบบการสุ่มแบบสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) ประกอบด้วย 9 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum* isolate1

กรรมวิธีที่ 2 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum* isolate2

กรรมวิธีที่ 3 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum* isolate3

กรรมวิธีที่ 4 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum* isolate4

กรรมวิธีที่ 5 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum* isolate5

กรรมวิธีที่ 6 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis*

กรรมวิธีที่ 7 น้ำหมักชีวภาพ

กรรมวิธีที่ 8 น้ำหมักชีวภาพร่วมกับเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis*

กรรมวิธีที่ 9 วิธีควบคุม (control)

ทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ที่แยกได้ด้วยวิธี bi-culture technique บนอาหาร PDA กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ สำหรับเชื้อ *Trichoderma* sp และ *S. rolfsii* ใช้เชื้อที่มีอายุ 7 วัน โดยนำ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะและนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้เชื้อทั้งสองชนิดมีระยะห่าง 5 เซนติเมตร สำหรับเชื้อ *B. subtilis* ให้ใช้ loop ลากเป็นเส้นยาว ห่างจากเชื้อสาเหตุ 5 เซนติเมตร หากเป็นน้ำหมักชีวภาพให้ใช้กระดาษ paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จุ่มลงไปที่น้ำหมักชีวภาพและวางลงบน plate ให้ห่างจากเชื้อสาเหตุ 5 เซนติเมตร เช่นกัน จากนั้นจึงนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดความยาวของรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุด้านที่เจริญไปทางกรรมวิธีทดสอบและความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรัศมีการเจริญของเชื้อสาเหตุ (percent inhibition rate growth หรือ PIRG) ของเชื้อราสาเหตุตามสูตร (Tronsmo. 1992)

$$PIRG = [(R1-R2)/R1]\times100$$

R1= ความกว้างของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2= ความกว้างของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

การวัดค่าปฏิปักษ์ของเชื้อสามารถประเมินค่ายับยั้ง ดังนี้

>75 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61-75 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51-60 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
<50 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

3.2.4 การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบการสุ่มแบบสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum*

กรรมวิธีที่ 2 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis*

กรรมวิธีที่ 3 น้ำหมักชีวภาพ (กล้วยน้ำว้า)

กรรมวิธีที่ 4 สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (etridiazole+quintozene)

กรรมวิธีที่ 5 วิธีควบคุม (control)

ดำเนินการปลูกบัวบกสายพันธุ์นครปฐม 2 ครั้ง เดือนธันวาคม - กุมภาพันธ์ และเดือนพฤษภาคม - กรกฎาคม ที่สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร และดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใส่เชื้อ *S. rolfsii* ประมาณ 10 เมล็ด/กระถาง ใส่ปุ๋ยมูลโคอัตรา 2 กิโลกรัม/ตารางเมตร

ทำการวัดการเจริญเติบโต โดยบันทึกความสูง ความกว้างทรงพุ่ม ความยาวไหล จำนวนไหลต่อต้น จำนวนต้นต่อไหล และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า โดยแบ่งเป็นระดับดังนี้

ระดับที่ 1 = ไม่มีการเกิดโรค

ระดับที่ 2 = โคนของต้นบัวบกเริ่มมีอาการสีเหลือง น้ำตาล ประมาณ 1-20%

ระดับที่ 3 = โคนของต้นบัวบกเริ่มมีอาการสีเหลือง น้ำตาล ประมาณ 21-40%

ระดับที่ 4 = โคนของต้นและใบบัวบก มีสีเหลือง น้ำตาล ประมาณ 41-60%

ระดับที่ 5 = โคนของต้นและใบบัวบก มีสีเหลือง แห้ง เหี่ยว ประมาณ 61-80%

ระดับที่ 6 = โคนของต้นและใบบัวบกแห้ง เหี่ยว ต้นตาย ประมาณ 61-80%

บันทึกผลผลิตสดและน้ำหนักแห้งของแต่ละกรรมวิธี นำข้อมูลมาเปรียบเทียบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05%

3.2.5 การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกในสภาพแปลงปลูก

ดำเนินการปลูกบัวบกสายพันธุ์นครปฐมในแปลงปลูกของเกษตรกร อ.ไทรน้อย จ.นครปฐม ระยะปลูก 20×20 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบการสุ่มแบบสมบูรณ์ (Randomized Complete Block design : RCBD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum*

กรรมวิธีที่ 2 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis*

กรรมวิธีที่ 3 น้ำหมักชีวภาพ (กล้วยน้ำว้า) 60 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (etridiazole+quintozene) 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 วิธีควบคุม (control)

ทำการวัดการเจริญเติบโตแบบเดียวกันกับการทดลองในสภาพโรงเรือนทดลอง นำข้อมูลมาเปรียบเทียบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05%

3.2.6 การศึกษาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก

สุ่มตัวอย่างบัวบกที่จำหน่ายจากตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด (ตลาดที่ไม่ได้มีการล้างบัวบกก่อนจะนำมาจำหน่าย และสภาพตลาดมีความสกปรก ไม่ได้มีการล้างทำความสะอาดแผงขายของ) ตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด (ตลาดที่ไม่ได้มีการล้างบัวบกก่อนจะนำมาจำหน่าย และสภาพตลาดมีความสะอาด ล้างทำความสะอาดแผงขายของอยู่เป็นประจำทุกวัน มีการจัดการระบบน้ำทิ้งอย่างเป็นระบบ) และห้างสรรพสินค้า (มีการล้างบัวบกก่อนจะนำมาจำหน่ายและบัวบกที่นำมาจำหน่ายบรรจุหีบห่อ) อย่างละ 4 แหล่ง เปรียบเทียบกับแปลงปลูกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทดลอง เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อรา จุลินทรีย์รวม Coliforms และ *E. coli*

การตรวจหาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์รวม นำตัวอย่างบัวบก 25 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง serial dilution จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ซึ่งตัวอย่างนั้นจะถูกทำให้เจือจางลงอีก 10 เท่า คือ 1:10 หรือ 10^{-1} จากนั้นเปลี่ยนปิเปตใหม่ และดูดของเหลวจาก 10^{-1} ออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตัวอย่างนี้จะถูกเจือจางอีก 10 เท่า คือ 1:100 หรือ 10^{-2} ทำ serial dilution ต่อไปเรื่อยๆ จนได้ความเข้มข้น 1:1,000,000 หรือ 10^{-6} จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างของเชื้อจากทุกความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าด้วย sterile spreader รูป L ซึ่งทำมาจากแท่งแก้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จึงตรวจนับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์

การตรวจหาปริมาณของเชื้อรา นำตัวอย่างบัวบก 25 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง serial dilution จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร จนได้ความเข้มข้น 1:10,000 หรือ 10^{-4} จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างของเชื้อจากทุกความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin sulphate 100 ppm และเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าด้วย sterile spreader รูป L บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จึงตรวจนับปริมาณของเชื้อรา

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธีของ AOAC (2006) ชั่งตัวอย่างบัวบก 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกที่มี peptone 1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง

Stomacher blender เป็นเวลา 2 นาที และเจือจาง ด้วยวิธี serial dilution โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี peptone 1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เจือจางต่อจนถึงความเข้มข้น 10^{-7} ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างของเชื้อจากทุกความเข้มข้น จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphatetryptose broth (LST) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และมีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ ระดับความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูหลอดที่เกิดฟองแก๊สใน fermentation tube นำเฉพาะหลอดที่เกิดฟองแก๊สไปถ่ายต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) โดยใช้ loop จุ่มจากหลอดอาหาร LST ที่มีแก๊ส และนำมาถ่ายเชื้อต่อลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร BGLB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูหลอด BGLB ที่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นนำผลที่ได้ไปเปิดตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN coliforms bacteria/g

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ EC-broth ใช้ loop จุ่มจากหลอดอาหาร LST ที่มีแก๊ส นำมาถ่ายเชื้อต่อในหลอดทดลองที่มีอาหาร EC-broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูเฉพาะหลอดที่มีฟองแก๊ส นำหลอดดังกล่าว ถ่ายเชื้อต่อด้วยการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Levine's eosin methylene blue agar (EMB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากเป็นโคโลนีของ *E.coli* จะมีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) (ภาพที่ 3.5) ถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar slant บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จึงนำไปจัดจำแนก (identification) โดยวิธี Biochemical tests (IMViC test)

การทดสอบ Indole โดยการถ่ายเชื้อจาก Plate count agar slant ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptophan broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดด้วย Kovac ปริมาณ 0.2-0.3 มิลลิลิตร หากให้ผลเป็นบวก (+) จะปรากฏสีแดงที่ส่วนบนอาหาร Tryptophan broth และถ้าผลเป็นลบ (-) จะมีสีเหลือง

การทดสอบ Methyl red และ Acetoin (MR-VP) โดยการถ่ายเชื้อจาก Plate count agar slant ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Methyl Red Voges Proskawer Broth (MR-VP) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 MR ปริมาณ 3 มิลลิลิตร จากนั้นจึงหยด methyl red 2-3 หยด หากผลเป็นบวก (+) จะเปลี่ยนเป็นสีแดง ถ้าผลออกมาเป็นลบ (-) จะเป็นสีเหลือง และส่วนที่ 2 VP ปริมาณ 0.7 มิลลิลิตร เติม 5% α-napthol ปริมาณ 0.6 มิลลิลิตร และ 40% KOH ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2

ชั่วโมง หากผลเป็นบวก (+) จะปรากฏสีแดงหรือชมพูอยู่ด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ และถ้าผลเป็นลบ (-) จะเห็นเป็นสีเหลือง

การทดสอบ Citrate โดยการถ่ายเชื้อจาก Plate count agar slant ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmon citrate agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากผลเป็นบวก (+) จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน และถ้าผลออกมาเป็นลบ (-) จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

เมื่อจำแนกโดยวิธี Biochemical tests แล้ว จึงประเมินค่า MPN ของ *E. coli* จากจำนวนหลอดของ EC-broth ที่มีโคโลนีให้ผลเป็น ++-- หรือ -+--

ภาพที่ 3.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB

3.2.7 การศึกษาวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118

นำตัวอย่างบัวบกจากตลาด มาทำการตรวจหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด และ inoculate เชื้อ *E.coli* TISTR780 และ *S. aureus* TISTR118 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml ลงในบัวบกโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) มี 5 กรรมวิธี 3 ซ้ำดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ได้ล้างด้วยกรรมวิธีใดๆ (control)

กรรมวิธีที่ 2 ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 3 ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง + ล้างด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm นาน 15 นาที

กรรมวิธีที่ 4 ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง + ล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที

กรรมวิธีที่ 5 ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง + ล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที

นำไปผึ่งลมให้แห้ง และแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปตรวจหาปริมาณเชื้อหลังล้างด้วยกรรมวิธีต่างๆที่ระยะเวลา 0 วัน ส่วนที่ 2 นำมาบรรจุในถุงพลาสติก และปิดผนึก เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 3 วัน (ภาพที่ 3.6) จึงนำตัวอย่างที่ได้ในทุกกรรมวิธีไปตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* ตามวิธี AOAC (2006)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Coliforms และ *E.coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ chromocult นำตัวอย่างบัวบกของแต่ละกรรมวิธี 25 กรัม (ภาพที่ 3.7) ใส่ในถุงพลาสติกที่มี peptone 1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Stomacher blender เป็นเวลา 2 นาที (ภาพที่ 3.8) และเจือจางด้วยวิธี serial dilution โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี peptone 1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เจือจางต่อจนถึงความเข้มข้น 10^{-6} ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างของเชื้อจากทุกความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult และเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าด้วย sterile spreader บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงตรวจนับปริมาณของเชื้อ หากเป็นเชื้อ *E. coli* จะมีโคโลนีสีม่วง และ coliforms จะมีโคโลนีสีชมพู จากนั้นจึงนำเชื้อที่มีโคโลนีสีม่วง 1 โคโลนี ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) (ภาพที่ 3.9) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหยดด้วย Kovac ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที หากเป็นสีแดง แสดงว่าคือเชื้อ *E. coli*

ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. aureus* นำตัวอย่างบัวบกของแต่ละกรรมวิธี จำนวน 25 กรัม ในถุงพลาสติกที่มี peptone 1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Stomacher blender เป็นเวลา 2 นาที และเจือจางด้วยวิธี serial dilution โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี peptone 1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เจือจางต่อจนถึงความเข้มข้น 10^{-6} จากนั้นนำตัวอย่างจากทุกความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar (BP) ที่ได้ผสม egg yolk solution แล้ว (ภาพที่ 3.10) และเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าด้วย sterile spreader บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณของเชื้อ ซึ่งโคโลนีจะเป็นสีดำ นูน และขอบเรียบ จากนั้นนำเชื้อ 1 โคโลนี ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จึงใส่ Rabbit plasma ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

4-6 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูจากการแข็งตัวของ plasma จากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *S. aureus* สร้างขึ้น

ภาพที่ 3.6 บัวบกที่บรรจุในถุงพลาสติก ปิดผนึก เก็บไว้ในตู้เย็น 3 วัน

ภาพที่ 3.7 ตัวอย่างบัวบก 25 กรัม

ภาพที่ 3.8 การทำบัวบกให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Stomacher blender

ภาพที่ 3.9 การถ่ายเชื้อโคโลนี *E. coli* ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient broth

ภาพที่ 3.10 การเตรียม egg yolk solution เพื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar (BP)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ปริมาณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งหมดที่ตรวจนับได้จะถูกนำมาแปลงข้อมูลให้อยู่ในค่าลอการิธึม (y=log x) นำข้อมูลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์รวมที่ได้จากการศึกษามาวิเคราะห์หาความแปรปรวนของกลุ่มด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป IRRI's Statistics และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Analysis of Variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

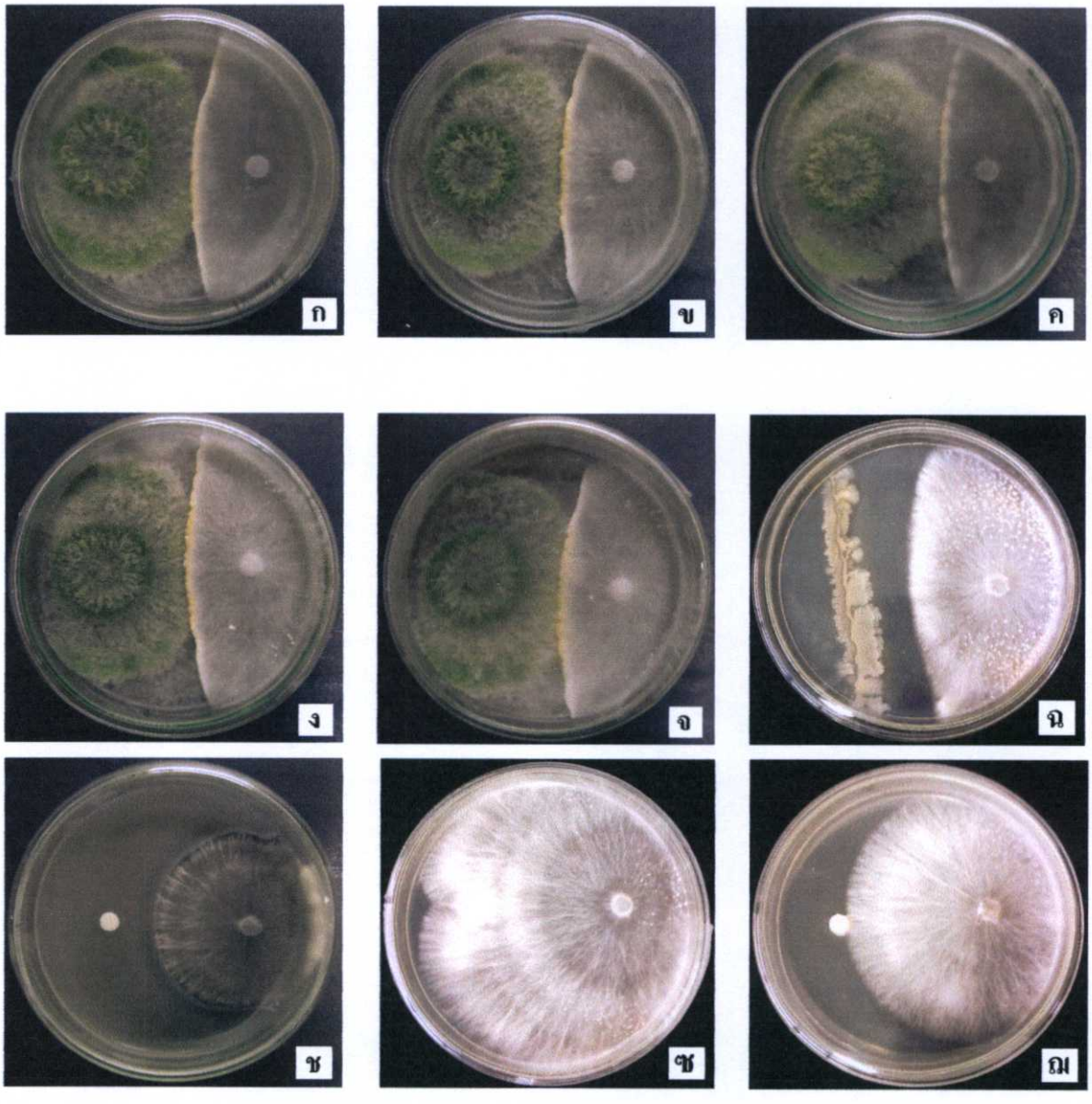
ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. rolfsii* เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่า เชื้อรามีเส้นใย ขนาดใหญ่ สีขาว และเจริญได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเชื้อเจริญไปเจอกับเชื้อปฏิปักษ์ พบว่าเชื้อหยุดการเจริญเติบโตและสร้าง sclerotium ลักษณะเป็นเส้นใยมาพันรวมกันเป็นเม็ดกลมเล็กๆ สีขาวครีม บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนมาก โดยเริ่มสร้างจากบริเวณขอบโคโลนีก่อน จากนั้นเมื่ออายุมากขึ้น sclerotium จะมีสีที่เข้มขึ้น เป็นสีน้ำตาล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ภายในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี bi-culture บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดความยาวของรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อปฏิปักษ์ที่ทำการทดสอบ และความยาวของรัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรัศมีการเจริญ (PIRG) พบว่า เชื้อ *T. harzianum* isolate 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* สูงถึง 71.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เชื้อ *B. subtilis*, *T. harzianum* isolate 4, *T. harzianum* isolate 2, *T. harzianum* isolate 5, *T. harzianum* isolate 1 และน้ำหมักชีวภาพ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 68.90, 66.44, 64.58, 60.44, 60.40 และ 54.10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 52.18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้น้ำหมักชีวภาพร่วมกับเชื้อ *B. subtilis* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุด คือ 45.40 เปอร์เซ็นต์ และน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับ Nahum *et al* (2008) ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบเชื้อปฏิปักษ์ *T. harzianum*, *Penicillium* sp. และเชื้อ *Petriella* sp. ในการควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* พบว่า เชื้อ *T. harzianum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ถึง 100% เมื่อเทียบกับเชื้อปฏิปักษ์ *Penicillium* sp. และเชื้อ *Petriella* sp. และรายงานของ Bhuiyan *et al* (2012) ได้ศึกษาการใช้สารเคมี และเชื้อปฏิปักษ์ในควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ด้วยวิธี Dual culture พบว่า เชื้อ *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ 83.06%

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ด้วยกรรมวิธีต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการ

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii*[1]
T. harzianum isolate 1	60.40±0.27 c
T. harzianum isolate 2	64.58±0.36 bc
T. harzianum isolate 3	71.90±0.58 a
T. harzianum isolate 4	66.44±0.15 b
T. harzianum isolate 5	60.44±0.30 c
B. subtilis	68.90±0.23 ab
น้ำหมักชีวภาพ	54.10±0.53 d
น้ำหมักชีวภาพร่วมกับเชื้อ *B. subtilis*	45.40±0.21 e
กรรมวิธีควบคุม	52.18±0.77 d

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ด้วยกรรมวิธีต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการ โดยที่ ก = *T. harzianum* isolate 1, ข = *T. harzianum* isolate 2, ค = *T. harzianum* isolate 3, ง = *T. harzianum* isolate 4, จ = *T. harzianum* isolate 5, ฉ = *B. subtilis*, ช = น้ำหมักชีวภาพ, ซ = น้ำหมักชีวภาพ+ *B. subtilis* และ ฌ = วิธีควบคุม

4.2 การทดสอบการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าในสภาพโรงเรือนทดลอง

การทดสอบการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า การปลูกฤดูกาลที่ 1 ช่วงเดือนธันวาคม ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ได้วัดการเจริญเติบโตของบัวบก คือ ความสูง ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนไหลต่อต้น ความยาวไหล จำนวนต้นต่อไหล และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ปรากฏว่า ด้านการเจริญเติบโตของบัวบกทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ความสูงของบัวบก การใช้สารเคมี มีความสูงของบัวบกมากที่สุด 19.10 เซนติเมตร รองลงมาคือ *T. harzianum* กรรมวิธีควบคุม *B. subtilis* และน้ำหมักชีวภาพ มีความสูงเฉลี่ย 18.24, 17.65, 16.99 และ16.30 เซนติเมตร ตามลำดับ ความกว้างทรงพุ่ม พบว่า *B. subtilis* มีความกว้างทรงพุ่มมากที่สุด 12.82 เซนติเมตร รองลงมา กรรมวิธีควบคุม *T. harzianum* การใช้สารเคมี และน้ำหมักชีวภาพ มีความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 12.55, 11.65, 10.40 และ 8.57 เซนติเมตร ตามลำดับ ความยาวไหล พบว่า น้ำหมักชีวภาพ มีความยาวไหลมากที่สุด 14.41 เซนติเมตร รองลงมาคือ *B. subtilis* การใช้สารเคมี กรรมวิธีควบคุม และ *T. harzianum* มีความยาวของไหลเฉลี่ย 13.62, 12.35, 10.77 และ 10.09 เซนติเมตร จำนวนไหลต่อต้น พบว่า กรรมวิธีควบคุม มีจำนวนไหลต่อต้นมากที่สุด คือ 2.40 ไหลต่อต้น รองลงมา คือ น้ำหมักชีวภาพ *T. harzianum* *B. subtilis* และการใช้สารเคมี มีจำนวนไหลเฉลี่ย 2.36, 2.12, 1.77 และ 1.61 ไหลต่อต้น ตามลำดับ จำนวนต้นต่อไหล พบว่า น้ำหมักชีวภาพ มีจำนวนต้นต่อไหลมากที่สุด คือ 1.49 ต้นต่อไหล รองลงมาคือ *B. subtilis* และกรรมวิธีควบคุม มีจำนวนต้นต่อไหลเฉลี่ย 1.06 และ 1.03 ต้นต่อไหล ส่วน *T. harzianum* และการใช้สารเคมีมีจำนวนต้นต่อไหลเท่ากันคือ 0.86 ต้นต่อไหล (ตารางที่ 4.2)

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 43.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชพบว่าค่อนข้างใกล้เคียงกับการใช้สารเคมีที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่าน้อยที่สุด คือ 31.54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เชื้อ *T. harzianum* และน้ำหมักชีวภาพ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 45.50 และ 58.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด คือ 70.00 เปอร์เซ็นต์

ส่วนทางด้านผลผลิตบัวบก พบว่า การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 1.20 ตัน/ไร่ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้ *T. harzianum* ที่มีผลผลิตบัวบก 1.12 ตัน/ไร่ ตามลำดับ แต่แตกต่างกันทางสถิติกับ *B. subtilis* น้ำหมักชีวภาพ และกรรมวิธีควบคุม ที่มีผลผลิตบัวบก 1.09, 0.99 และ 0.75 ตัน/ไร่ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของบัวบกในสภาพโรงเรือนทดลอง ในฤดูกาลที่ 1

กรรมวิธี	ความสูง (ซม.)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	ความยาวไหล (ซม.)	จำนวนไหลต่อต้น	จำนวนต้นต่อไหล
T. harzianum	18.24±1.54^{ns}	11.65±2.55^{ns}	10.09±1.75^{ns}	2.12±0.67^{ns}	0.86±0.89^{ns}
B. subtilis	16.99±1.84	12.82±2.33	13.62±0.34	1.77±0.93	1.06±1.03
น้ำหมักชีวภาพ	16.30±1.45	8.57±2.59	14.41±1.86	2.36±1.19	1.49±1.05
สารเคมี	19.10±2.31	10.40±2.76	12.35±3.32	1.61±0.92	0.86±0.71
Control	17.65±1.96	12.55±2.39	10.77±3.23	2.40±0.92	1.03±1.51

^{ns}ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า (%) และผลผลิตบัวบก (ตัน/ไร่) ในสภาพโรงเรือนทดลอง ในฤดูกาลที่ 1

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า[1] (%)	ผลผลิต[1] (ตัน/ไร่)
Trichoderma harzianum	45.50±2.32 b	1.12±0.06 ab
Bacillus subtilis	43.75±2.05 b	1.09±0.04 b
น้ำหมักชีวภาพ	58.00±3.30 c	0.99±0.06 c
สารเคมี	31.50±3.69 a	1.20±0.08 a
Control	70.00±3.82 d	0.75±0.05 d

[1]ค่าเฉลี่ย ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

การปลูกฤดูกาลที่ 2 ช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนกรกฎาคม พบว่า ด้านการเจริญเติบโตของบัวบกทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ความสูงของบัวบก *B. subtilis* มีความสูงของบัวบกมากที่สุด 19.66 เซนติเมตร รองลงมาคือ การใช้สารเคมี น้ำหมักชีวภาพ *T. harzianum* และกรรมวิธีควบคุม มีความสูงเฉลี่ย 18.57, 18.34, 17.81 และ 17.44 เซนติเมตร ตามลำดับ ความกว้างทรงพุ่ม พบว่า น้ำหมักชีวภาพ มีความกว้างทรงพุ่มมากที่สุด 13.32 เซนติเมตร รองลงมา คือการใช้สารเคมี กรรมวิธีควบคุม *B. subtilis* และ *T. harzianum* มีความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 12.97, 12.89, 12.37 และ 12.10 เซนติเมตร ตามลำดับ ความยาวไหล พบว่า น้ำหมักชีวภาพ มีความยาวไหลมาก

ที่สุด 11.23 เซนติเมตร รองลงมาคือ *B. subtilis* การใช้สารเคมี *T. harzianum* และกรรมวิธีควบคุม มีความยาวของไหลเฉลี่ย 8.71, 7.87, 7.32 และ 6.49 เซนติเมตร ตามลำดับ จำนวนไหลต่อต้น พบว่า กรรมวิธีควบคุม มีจำนวนไหลต่อต้นมากที่สุด คือ 2.32 ไหลต่อต้น รองลงมา คือ การใช้สารเคมี น้ำหมักชีวภาพ *B. subtilis* และ *T. harzianum* มีจำนวนไหลเฉลี่ย 2.11, 1.97, 1.64 และ 1.53 ไหลต่อต้น ตามลำดับ จำนวนต้นต่อไหล พบว่า กรรมวิธีควบคุม มีจำนวนต้นต่อไหลมากที่สุด คือ 1.37 ต้นต่อไหล รองลงมาคือ *T. harzianum* น้ำหมักชีวภาพ *B. subtilis* และการใช้สารเคมีมีจำนวนต้นต่อไหลเฉลี่ย 1.31, 0.80, 0.66 และ 0.62 ต้นต่อไหล (ตารางที่ 4.4)

การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด คือ 40.70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 46.52 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *T. harzianum* น้ำหมักชีวภาพ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 52.18 และ 61.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด คือ 74.02 เปอร์เซ็นต์

ทางด้านผลผลิตบัวบก พบว่า การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ให้ผลผลิตบัวบกมากที่สุด คือ 1.13 ตันต่อไร่ รองลงมาคือ การใช้เชื้อ *B. subtilis* เชื้อ *T. harzianum* น้ำหมักชีวภาพ และกรรมวิธีควบคุม ซึ่งให้ผลผลิตบัวบก 1.07, 0.96, 0.78 และ 0.59 ตันต่อไร่ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการทดลองในฤดูกาลที่ 1 (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.4 การเจริญเติบโตของบัวบกในสภาพโรงเรือนทดลอง ในฤดูกาลที่ 2

กรรมวิธี	ความสูง (ซม.)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	ความยาวไหล (ซม.)	จำนวนไหลต่อต้น	จำนวนต้นต่อไหล
T. harzianum	7.81±2.48^{ns}	12.10±1.60^{ns}	7.32±1.44^{ns}	1.53±1.13^{ns}	1.31±0.93^{ns}
B. subtilis	19.66±2.70	12.37±2.16	8.71±3.59	1.64±0.98	0.66±1.10
น้ำหมักชีวภาพ	18.34±3.09	13.32±3.58	11.23±4.41	1.97±1.15	0.80±1.22
สารเคมี	18.57±3.36	12.97±3.39	7.87±2.24	2.11±0.89	0.62±0.77
Control	17.44±2.14	12.89±1.45	6.49±1.80	2.32±0.82	1.37±0.55

^{ns}ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า (%) และผลผลิตบัวบก (ตัน/ไร่) ในสภาพโรงเรือนทดลอง ในฤดูกาลที่ 2

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า[1] (%)	ผลผลิต[1] (ตัน/ไร่)
T. harzianum	52.18±5.48 b	0.96±0.07 b
B. subtilis	46.52±4.60 ab	1.07±0.07 a
น้ำหมักชีวภาพ	61.34±6.01 c	0.78±0.09 c
สารเคมี	40.70±3.87 a	1.13±0.09 a
Control	74.02±6.08 d	0.59±0.06 d

[1]ค่าเฉลี่ย ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.3 การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าบัวบกในสภาพแปลงปลูก

การทดสอบการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกในสภาพโรงเรือนทดลอง โดยได้ดำเนินการปลูกบัวบกสายพันธุ์นครปฐมในแปลงปลูกของเกษตรกร อ.ไทรน้อย จ.นครปฐม ระยะปลูก 20×20 เซนติเมตร ทำการวัดการเจริญเติบโตแบบเดียวกันกับการทดลองที่ 2 ในสภาพโรงเรือนทดลอง นำข้อมูลมาเปรียบเทียบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05% พบว่า ด้านการเจริญเติบโตของบัวบกทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ความสูงของบัวบก การใช้สารเคมี มีความสูงของบัวบกมากที่สุด 24.30 เซนติเมตร รองลงมาคือ *T. harzianum* น้ำหมักชีวภาพ *B. subtilis* และกรรมวิธีควบคุม มีความสูงเฉลี่ย 23.31, 22.61, 22.28 และ 21.83 เซนติเมตร ตามลำดับ ความกว้างทรงพุ่ม พบว่า การใช้สารเคมี มีความกว้างทรงพุ่มมากที่สุด 11.57 เซนติเมตร รองลงมา คือ กรรมวิธีควบคุม *B. subtilis* *T. harzianum* และน้ำหมักชีวภาพ มีความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 10.39, 10.25, 9.77 และ 7.14 เซนติเมตร ตามลำดับ ความยาวไหล พบว่า น้ำหมักชีวภาพ มีความยาวไหลมากที่สุด 30.21 เซนติเมตร รองลงมาคือ การใช้สารเคมี *T. harzianum* *B. subtilis* และกรรมวิธีควบคุม มีความยาวของไหลเฉลี่ย 25.33, 25.31, 23.39 และ 20.63 เซนติเมตร ตามลำดับ จำนวนไหลต่อต้น พบว่า *T. harzianum* มีจำนวนไหลต่อต้นมากที่สุด คือ 1.97 ไหลต่อต้น รองลงมา คือ การใช้สารเคมี และ *B. subtilis* ซึ่งมีจำนวนไหลต่อต้นเท่ากัน 1.94 ไหลต่อต้น น้ำหมักชีวภาพ และกรรมวิธีควบคุม จำนวนไหลเฉลี่ย 1.74 และ 1.60 ไหลต่อต้น ตามลำดับ จำนวนต้นต่อไหล พบว่า *B. subtilis* มี

จำนวนต้นต่อไหลมากที่สุด คือ 2.29 ต้นต่อไหล รองลงมาคือ น้ำหมักชีวภาพ การใช้สารเคมี กรรมวิธีควบคุม และ *T. harzianum* มีจำนวนต้นต่อไหลเฉลี่ย 2.20, 1.97, 1.71 และ 1.66 ต้นต่อไหล (ตารางที่ 4.6)

การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด คือ 19.54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การใช้เชื้อ *B. subtilis* เชื้อ *T. harzianum* และน้ำหมักชีวภาพ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า 26.55, 30.90 และ 31.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า คือ 40.77 เปอร์เซ็นต์

ทางด้านผลผลิตบัวบก เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 65 วัน โดยใช้เคี่ยวตัดจากห่างจากโคนต้นประมาณ 10 เซนติเมตร และนำไปชั่งน้ำหนักของผลผลิตที่ได้ พบว่า การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ให้ผลผลิตบัวบกมากที่สุด คือ 1.26 ตันต่อไร่ รองลงมาคือ การใช้เชื้อ *B. subtilis* เชื้อ *T. harzianum* น้ำหมักชีวภาพ และกรรมวิธีควบคุม ซึ่งให้ผลผลิตบัวบก 1.10, 1.06, 1.01 และ 0.93 ตันต่อไร่ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.7) เช่นเดียวกับการรายงานของ Raj and Sharma (2005) พบว่า การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช carbendazim ร่วมกับ mancozeb สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ในสตอเบอรี่ได้

ตารางที่ 4.6 การเจริญเติบโตของบัวบกในสภาพแปลงปลูก

กรรมวิธี	ความสูง (ซม.)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	ความยาวไหล (ซม.)	จำนวนไหลต่อต้น	จำนวนต้นต่อไหล
T. harzianum	23.31±0.06^{ns}	9.79±3.58^{ns}	25.31±4.50^{ns}	1.97±0.97^{ns}	1.66±0.74^{ns}
B. subtilis	22.28±1.63	10.25±2.60	23.31±2.84	1.94±0.65	2.29±0.55
น้ำหมักชีวภาพ	22.61±1.14	7.14±3.24	30.21±6.47	1.74±0.83	2.20±1.09
Chemical	24.30±1.93	11.57±4.06	25.33±5.33	1.94±0.60	1.97±0.34
Control	21.83±1.84	10.39±3.58	20.63±2.78	1.60±0.40	1.71±0.43

^{ns}ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า (%) และผลผลิตบัวบก (ตัน/ไร่) ในสภาพแปลงปลูก

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า[1] (%)	ผลผลิต[1] (ตัน/ไร่)
T. harzianum	30.90±4.88 b	1.06±0.05 bc
B. subtilis.	26.55±4.46 ab	1.10±0.05 b
น้ำหมักชีวภาพ	31.21±7.28 b	1.01±0.08 c
สารเคมี	19.54±4.54 a	1.26±0.05 a
Control	40.77±7.30 c	0.93±0.08 d

[1]ค่าเฉลี่ย ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ภาพที่ 4.2 ลักษณะอาการโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกในสภาพแปลงปลูก

4.4 การศึกษาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก

เมื่อนำตัวอย่างบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ (ภาพที่ 4.3.-4.10) มาตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์รวม เชื้อรา coliforms และเชื้อ *E. coli* เปรียบเทียบกับบัวบก แปลงปลูกอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า บัวบกที่ปลูกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทุกกรรมวิธีซึ่งไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวมน้อยกว่าบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ โดยที่การใช้สารเคมี มีปริมาณจุลินทรีย์รวมเฉลี่ยน้อยที่สุด 0.19×10^5 CFU/g ซึ่งแตกต่างกับกันทางสถิติกับบัวบกจากห้างสรรพสินค้ามีปริมาณจุลินทรีย์รวมเฉลี่ย 3.73×10^5 CFU/g บัวบกที่จำหน่าย

ในตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาดและตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาดมีปริมาณจุลินทรีย์รวมเฉลี่ย 4.73×10^5 CFU/g และ 9.32×10^5 CFU/g ตามลำดับ ด้านปริมาณเชื้อรา พบว่าทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การใช้สารเคมี มีปริมาณเชื้อราน้อยที่สุด 0.34×10^2 CFU/g บัวบกที่จำหน่ายในห้าง สรรพสินค้ามีปริมาณเฉลี่ย 2.88×10^2 CFU/g บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาดและตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด มีปริมาณเชื้อราเฉลี่ย 3.13×10^2 CFU/g และ 3.35×10^2 CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ส่วนใบบัวบกจากห้างสรรพสินค้ามีปริมาณ coliform น้อยที่สุดคือ log 2.72 MPN/g รองลงมาคือ บัวบกจากตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด และบัวบกจากตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด มีปริมาณ coliform เฉลี่ย log 3.44 MPN/g และ log 3.65 MPN/g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนปริมาณเชื้อ *E. coli* พบว่า บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีปริมาณ *E. coli* เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ log 1.30 MPN/g รองลงมาคือ บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด และตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด มีปริมาณเท่ากับ log 2.61 และ 2.76 MPN/g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) เมื่อจำแนกเชื้อ *E. coli* โดยวิธีทางชีวเคมี พบว่า สามารถจำแนกออกมาได้ 2 ชนิดคือ typical *Enterobacteraerogenes* และ atypical *Enterobacteraerogenes* ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับบัวบกที่ปลูกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนที่ไม่มีปริมาณของเชื้อ *E. coli* และ coliform ปนเปื้อน

ตารางที่ 4.8 ปริมาณเชื้อราและจุลินทรีย์รวม (CFU/g) ในบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆเปรียบเทียบกับแปลงปลูกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทดลอง

บัวบกจากแหล่งต่างๆ	เชื้อรา (10^2)	จุลินทรีย์รวม[1] (10^5)
ตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด	3.47±0.06[ns]	9.43±1.01 d
ตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด	3.10±1.15	4.70±0.46 c
ห้างสรรพสินค้า	3.07±0.51	3.63±0.25 b
แปลงกรรมวิธี *T. harzianum*	0.54±0.21	0.21±0.14 a
แปลงกรรมวิธี *B. subtilis*	0.41±0.20	0.20±0.17 a
แปลงกรรมวิธีน้ำหมักชีวภาพ	0.56±0.39	0.54±0.15 a
แปลงกรรมวิธีสารเคมี	0.34±0.07	0.19±0.23 a
แปลงควบคุม	0.72±0.20	0.64±0.32 a

[1]ค่าเฉลี่ย ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

[ns]ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05

ตารางที่ 4.9 ปริมาณของเชื้อ coliform และ *E. coli* (log MPN/g) ในบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ เปรียบเทียบกับบัวบกจากแปลงทดลอง

บัวบกจากแหล่งต่างๆ	coliform[1]	*E. coli*[1]
ตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด	3.71±0.21 d	2.89±0.14 d
ตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด	3.46±0.15 c	2.66±0.14 c
ห้างสรรพสินค้า	2.80±0.21 b	1.33±0.03 b
แปลงกรรมวิธี *T. harzianum*	0.00±0 a	0.00±0 a
แปลงกรรมวิธี *B. subtilis*	0.00±0 a	0.00±0 a
แปลงกรรมวิธีน้ำหมักชีวภาพ	0.00±0 a	0.00±0 a
แปลงกรรมวิธีสารเคมี	0.00±0 a	0.00±0 a
แปลงควบคุม	0.00±0 a	0.00±0 a

[1]ค่าเฉลี่ย ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

เมื่อนำผลการศึกษาจุลินทรีย์รวม coliform ราและจุลินทรีย์รวมและ *E. coli* เทียบกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2553) ซึ่งกำหนดให้ผักผลไม้สด มีจำนวนจุลินทรีย์รวม/กรัม น้อยกว่า 1×10^6 จำนวนรา/กรัม และปริมาณ coliform น้อยกว่า 5×10^2 ส่วนปริมาณจำนวน MPN *E. coli*/กรัม ต้องน้อยกว่า 1×10^2 พบว่าบัวบกที่นำมาจากแหล่งจำหน่ายทุกๆ แหล่งมีปริมาณจุลินทรีย์รวม และปริมาณเชื้อรายังไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ coliform เกินมาตรฐานทุกแหล่งจำหน่าย ส่วนปริมาณเชื้อ *E. coli* พบว่า บัวบกที่จำหน่ายจากตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด และตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาดมีปริมาณเชื้อเกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ซึ่งตรงกันข้ามกับบัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าซึ่งมีปริมาณเชื้อยังไม่เกินมาตรฐานที่กำหนด (ตารางที่ 4.10) Abadias *et al* (2008) นำผักและผลไม้สดที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า มาตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า ผักและผลไม้สดมีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* *Listeria monocytogenes* เชื้อ *Salmonella* เช่นเดียวกับปรีชา จึงสมานุกูลและคณะ (2553) ได้มีการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดที่จำหน่ายจากตลาดสด 8 แห่งและห้างสรรพสินค้า 4 แห่ง จำนวน 97 ตัวอย่าง รายงานว่า ผักที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ จำนวน 97 ตัวอย่าง มีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคดังนี้ ปริมาณ coliform 90.7% เชื้อ *E. coli* 45.4% ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp 16.5% เชื้อ *Vibrio cholera* 14.4% เชื้อ *L. monocytogenes* 2.1% และเชื้อ

Listeria spp 48.4% ซึ่งผักที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคดังกล่าวน้อยกว่าผักที่จำหน่ายในตลาดสด ซึ่งสอด คล้องกับรายงานของ ขวัญพิมล อชรัตน์และคณะ (2555) ได้สุ่มซื้อผักสดจากตลาดกลางสินค้าเกษตร จังหวัดเพชรบุรีทำการสุ่มตรวจทั้งหมด 5 ชนิด รวม 50 ตัวอย่าง ได้แก่ ผักกาดหอม ผักชี ผักบุ้งจีน กะเพรา และสะระแหน่ พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างผัก 15 ตัวอย่าง ได้แก่ กะเพรา 7 ตัวอย่าง ผักชี 3 ตัวอย่าง ผักบุ้งจีน 3 ตัวอย่าง ผักกาดหอม 1 ตัวอย่าง และสาระแน่ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 ของตัวอย่างทั้งหมด ดังนั้นการจัดการด้านสุขลักษณะสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และแก้ไขปัญหาการส่งออกสินค้าพืชไทยไปต่างประเทศ

ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์ร้านจำหน่ายผักที่พบการปนเปื้อนของ Total coliform และ *E. coli* ที่เกินมาตรฐาน

ชนิดของตลาด	Total coliform	*E. coli*
ตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด	100	75
ตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด	100	75
ห้างสรรพสินค้า	100	0

ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะของตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด

ภาพที่ 4.4 แผงจำหน่ายภายในตลาด

ภาพที่ 4.5 บัวบกที่จำหน่ายอยู่ในตลาด

ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะของตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด

ภาพที่ 4.7 แผงจำหน่ายภายในตลาด

ภาพที่ 4.8 บัวบกที่จำหน่ายอยู่ในตลาด

ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะแผงจำหน่ายบัวบกในห้างสรรพสินค้า

ภาพที่ 4.10 บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า

ภาพที่ 4.11 บรรจุภัณฑ์ของบัวบก

4.5 การศึกษาวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118

ปริมาณ coliform พบว่า มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ log 5.72 - 5.89 CFU/g (ตารางที่ 4.11) เมื่อนำไปล้างด้วยกรรมวิธีต่างๆกัน พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณ coliform ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 3.41 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที การล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยคลอรีน นาน 15 นาที และการล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง มีปริมาณ coliform คงเหลือ log 3.66, 3.87 และ 4.38 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ซึ่งมีปริมาณ *E. coli* คงเหลือ log 5.66 CFU/g ($p<0.05$)

หลังการล้างวันที่ 3 พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณ coliform ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 2.34 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที การล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยคลอรีน นาน 15 นาที และการล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง มีปริมาณ coliform คงเหลือ log 2.61, 2.95 และ 3.76 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ซึ่งมีปริมาณ coliform คงเหลือ log 4.95 CFU/g ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.11 ปริมาณ Coliform (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วยน้ำต่างๆ กัน

เวลา (วัน)	จำนวน Coliform (log CFU/g) [1]				
	control	น้ำเปล่า 2 ครั้ง	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + คลอรีน	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + แลคติก	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + โอโซน
0-ก่อนล้าง	5.82±0.08	5.72±0.16	5.78±0.26	5.89±0.03	5.78±0.20[ns]
0-หลังล้าง	5.66±0.08 d	4.38±0.15 c	3.87±0.04 b	3.41±0.19 a	3.66±0.13 b
3	4.95±0.02 e	3.76±0.06 d	2.95±0.06 c	2.34±0.11 a	2.61±0.15 b

[1]ค่าเฉลี่ย ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

[ns]ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05

ปริมาณของเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 780 พบว่า มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ log 5.75 - 5.83 CFU/g (ตารางที่ 4.12) เมื่อนำไปล้างด้วยกรรมวิธีต่างๆกัน พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 2.90 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที การล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยคลอรีน นาน 15 นาที และการล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง มีปริมาณ *E. coli* คงเหลือ log 3.50, 3.86 และ 4.71 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมมีปริมาณ *E. coli* คงเหลือ log 5.61 CFU/g ($p<0.05$)

หลังการล้างวันที่ 3 พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 1.83 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที การล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยคลอรีน นาน 15 นาที และการล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง มีปริมาณ *E. coli* คงเหลือ log 2.62, 2.97 และ 3.72 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ซึ่งมีปริมาณ *E. coli* คงเหลือ log 4.60 CFU/g ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Huang and Chen (2011) รายงานว่ากรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที มีคุณสมบัติในการลดจำนวนปริมาณของเชื้อ *E. coli* ได้ แต่หากใช้กรดแลคติก 1% ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนของเชื้อ *E. coli* ได้ดียิ่งขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Velázquez *et al.* (2009) พบว่า เมื่อนำกรดแลคติก 2% ใช้ล้างผักกาดหอม และมะเขือเทศ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ได้ดีเช่นเดียวกับ Neal *et al.* (2012) ได้นำใบของผักโขมมาล้างด้วยสารต่างๆกัน พบว่า กรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนได้ดีที่สุด โดยสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ได้ถึง 2.7 log CFU/g และเชื้อ *Salmonella* 2.7 log CFU/g และการศึกษาของ Wang *et al.* (2013) ที่นำหน่ออ่อนของบัวมาล้างด้วยกรดแลคติกที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* พบว่า กรดแลคติก 2% สามารถลดปริมาณของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.12 ปริมาณ *Escherichia coli* TISTR780 (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วยน้ำต่างๆกัน

เวลา (วัน)	จำนวน *Escherichia coli* [1] (log CFU/g)				
	control	น้ำเปล่า 2 ครั้ง	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + คลอรีน	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + แลคติก	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + โอโซน
0-ก่อนล้าง	5.75±0.07	5.73±0.22	5.83±0.03	5.80±0.13	5.75±0.08[ns]
0-หลังล้าง	5.61±0.25 e	4.71±0.10 d	3.86±0.08 c	2.90±0.05 a	3.50±0.10 b
3	4.60±0.20e	3.72±0.11 d	2.97±0.01 c	1.83±0.08 a	2.62±0.04 b

[1]ค่าเฉลี่ย ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

[ns]ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05

ปริมาณของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR118 พบว่า มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ log 5.59 - 5.83 CFU/g (ตารางที่ 4.13) เมื่อนำไปล้างด้วยกรรมวิธีต่างๆกัน พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 2.93 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที การล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยคลอรีน นาน 15 นาที และการล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง มีปริมาณ *S. aureus* คงเหลือ log 3.37, 3.62 และ 4.74 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ซึ่งมีปริมาณ *S. aureus* คงเหลือ log 5.53 CFU/g ($p<0.05$)

หลังการล้างวันที่ 3 พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 1.93 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที การล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยคลอรีน นาน 15 นาที และการล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง มีปริมาณ *S. aureus* คงเหลือ log 2.40, 2.98 และ 3.49 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ซึ่งมีปริมาณ *S. aureus* คงเหลือ log 4.83 CFU/g ($p<0.05$)

คุณภาพของบัวบกหลังการล้างวันที่ 3 พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติกทำให้ใบของบัวบกมีคุณภาพลดลง ใบมีอาการช้ำ เน่า ซึ่งตรงกันข้ามการล้าง

น้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที เป็นกรรมวิธีที่ไม่ทำให้คุณภาพของบัวบกเสียหาย และยังมีความสด ไม่มีอาการช้ำ (ภาพที่ 4.12)

ตารางที่ 4.13 ปริมาณ *Staphylococcus aureus* (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วยน้ำต่างๆกัน

เวลา (วัน)	จำนวน *Staphylococcus aureus*[1] (log CFU/g)				
	control	น้ำเปล่า 2 ครั้ง	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + คลอรีน	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + แลคติก	น้ำเปล่า 2 ครั้ง + โอโซน
0-ก่อนล้าง	5.77±0.12	5.59±0.20	5.60±0.16	5.83±0.07	5.66±0.29[ns]
0-หลังล้าง	5.53±0.08 e	4.74±0.13 d	3.62±0.10 c	2.93±0.02 a	3.37±0.09 b
3	4.83±0.12 e	3.49±0.06 d	2.98±0.03 c	1.93±0.12 a	2.40±0.47 b

[1]ค่าเฉลี่ย ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

[ns]ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05

ภาพที่ 4.12 คุณภาพของบัวบกหลังจากเก็บรักษาในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 3 วัน

ก = ไม่ได้ล้างด้วยกรรมวิธีใดๆ (control)

ข = ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง

ค = ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง + ล้างด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm นาน 15 นาที

ง = ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง + ล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที

จ = ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง + ล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคน

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ภายในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี bi-culture นำข้อมูลที่ได้มา คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรัศมีการเจริญ (PIRG) พบว่า เชื้อ *T. harzianum* isolate 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* สูงถึง 71.9 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า การ ปลูกฤดูกาลที่ 1 ช่วงเดือนธันวาคม ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พบว่า การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 43.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่าน้อยที่สุด คือ 31.54 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ *T. harzianum* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 45.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนทางด้านผลผลิตบัวบก พบว่า การใช้ *T. harzianum* และ *B. subtilis* ให้ผลผลิตบัวบก 1.12 และ 1.09 ตัน/ไร่ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 1.20 ตัน/ไร่ ซึ่งสอดคล้องกับการปลูกฤดูที่ 2 ช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนกรกฎาคม พบว่า การใช้เชื้อ *B. subtilis* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า 46.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด คือ 40.87 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ *T. harzianum* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 51.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทางด้านผลผลิตบัวบก พบว่า การใช้เชื้อ *B. subtilis* ซึ่งให้ผลผลิตบัวบก 1.07 ตันต่อไร่ ใกล้เคียงการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชอีกเช่นกัน โดยให้ผลผลิตบัวบกมากที่สุด คือ 1.13 ตันต่อไร่ ส่วน *T. harzianum* ให้ผลผลิต 0.95 ตันต่อไร่ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของบัวบกสายพันธุ์นครปฐมในสภาพแปลงปลูก โดยได้ดำเนินการปลูกบัวบกสายพันธุ์นครปฐมในแปลงปลูกของเกษตรกร อ.ไทรน้อย จ.นครปฐม พบว่า การใช้เชื้อ *B. subtilis* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า 26.55 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด คือ 19.54 เปอร์เซ็นต์ ทางด้านผลผลิตบัวบก เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 65 วัน โดยใช้เคียวตัดจากห่างจากโคนต้นประมาณ 10 เซนติเมตร และนำไปชั่งน้ำหนักของผลผลิตที่ได้ พบว่า การใช้สารเคมีป้องกันกำจัด

โรคพืช ให้ผลผลิตบัวบกมากที่สุด คือ 1.26 ตันต่อไร่ รองลงมาคือ การใช้เชื้อ *B. subtilis* 1.10 ตันต่อไร่ ดังนั้นเกษตรกรควรหันมา ใช้เชื้อ *B. subtilis* ในการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่า เพื่อเป็นการลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และยังช่วยเพิ่มผลผลิตบัวบก

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก

บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีปริมาณจุลินทรีย์รวม เชื้อรา coliform และ *E. coli* เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 3.73×10^{5}, 2.88×10^{2} CFU/g log 2.72 และ log 1.30 MPN/g ตามลำดับ เทียบกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2553) พบว่าบัวบกที่นำมาจากแหล่งจำหน่ายทุกๆ แหล่งมีปริมาณจุลินทรีย์รวม และปริมาณเชื้อรายังไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ coliform เกินมาตรฐานทุกแหล่งจำหน่าย ส่วนปริมาณเชื้อ *E. coli* พบว่า บัวบกที่จำหน่ายจากตลาดสดทั้ง 2 แบบ ที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด และที่มีการจัดการด้านความสะอาดมีปริมาณเชื้อเกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ ส่วนบัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้านั้น ไม่เกินมาตรฐานที่กำหนด ซึ่งบัวบกที่ซื้อมารับประทานสดต้องมีการล้างก่อนการบริโภค

วิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118

การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณ coliform ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 3.41 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที คงเหลือ log 3.66 CFU/g หลังการล้างวันที่ 3 พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณ coliform ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 2.34 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที มีปริมาณ coliform คงเหลือ log 2.61 CFU/g ปริมาณของเชื้อ *Escherichia coli* TISTR780 พบว่า เมื่อนำไปล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 2.90 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที มีปริมาณ *E. coli* คงเหลือ log 3.50 CFU/g หลังการล้างวันที่ 3 พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 1.83 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที มีปริมาณ *E. coli* คงเหลือ log 2.62 CFU/g ปริมาณของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR118 เมื่อนำไปล้างด้วยกรรมวิธีต่างๆกัน พบว่า การล้างด้วย

น้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 2.93 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที มีปริมาณ *S. aureus* คงเหลือ log 3.37 CFU/g หลังการล้างวันที่ 3 พบว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที สามารถลดปริมาณของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด และมีปริมาณคงเหลือ log 1.93 CFU/g รองลงมาคือการล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที มีปริมาณ *S. aureus* คงเหลือ log 2.40 CFU/g จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยกรดแลคติก 1% นาน 5 วินาที ดีที่สุด แต่ทำให้คุณภาพของบัวบกลงลด จึงควรหันมาล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ร่วมกับการล้างด้วยน้ำโอโซน 10 ppm นาน 20 นาที ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ได้ผลรองลงมา และไม่ทำให้คุณภาพของบัวบกเสียหาย

บรรณานุกรม

กมลรัตน์ ณ หนองคาย. 2550. **สปาไทยเพื่อความงาม ผลิตภัณฑ์สปาด้วยสมุนไพรไทย.** กรุงเทพฯ : เกษตรธรรมชาติ.

กรมการค้าต่างประเทศ. 2549. **"การส่งออกผักและผลไม้ที่จะต้องมีหนังสือรับรองการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ*Salmonella* ในการส่งออก."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.ryt9.com /s/ryt9/65577.

กรมการค้าต่างประเทศ. 2550. "ประกาศกรมการค้าต่างประเทศ เรื่อง กำหนดชนิดหรือประเภทของผักและผลไม้ ที่ต้องมีหนังสือรับรองในการส่งออก พ.ศ.2550." **ราชกิจจานุเบกษา.** 124 ตอนพิเศษ (55 ง). กรุงเทพฯ : กรมการค้าต่างประเทศ.

กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2556. **"อธิบดีธวัชชัย เผยตลาดเครื่องสำอางไทยวางทั่วโลกปีที่ผ่านมายอดพุ่งกว่า 2 แสนล้าน."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.dtam.moph.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=398 :pr0208 &catid=8:dtam-news&Itemid=114.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553. **"ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/cheme/dmscguide1.pdf.

กัญจนา ดีวิเศษ และเพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2542. **สมุนไพรไทยกับวัฒนธรรม ตอนที่ 2 ไม้ริมรั้ว.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

กันยา หว่านฉรงค์. 2555. แบคทีเรียในอาหาร (Bacteria in Food). R&D Newsletter 19 : 12-15.

กรีนเนท. 2557. **"เกษตรอินทรีย์โลก ขยายตัวทั้งการผลิตและการตลาด."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.greennet.or.th/news/1598.

เกษม สร้อยทอง. 2532. **การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.

เกษร เทพแปง. ม.ป.ป. **"รู้จักกับเชื้ออีโคไล (*Escherichia coli*)."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.oshthai.org/phocadownload/e_coli.pdf .

ขวัญพิมล อชรัตน์ ธนันธร พิพัฒน์นรเศรษฐ์ ปรียาภรณ์ บุตุธรรม สุรวัฒน์ ชลอสันติสกุล จารุณี เกษรพิกุล และเกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2555. "การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอีโคไลในผักบริโภคจากตลาดกลางสินค้าเกษตร จังหวัดเพชรบุรี." **วารสารคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร.** 3 (3) : 35-51.

คมแข พิลาสมบัติ. 2550. **ปฏิบัติการสุขศาสตร์เนื้อสัตว์.** กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จันจิรา แสงสีเหลือง พนิดา ปรีเปรมโมทย์ และดารารัตน์ โฮตาก้า. 2551. **การศึกษาเทคนิคการสกัดพืชสมุนไพรทางชีวภาพที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันโรคพืชในดินและผลผลิตการเกษตร.** กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน.

จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์. 2554. **"โรคอุจจาระร่วงจากเชื้ออีโคไล (*E. coli*)."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/thai/knowledgeinfo.php?id=52.

จิระเดช แจ่มสว่าง วรรณวิไล อินทนู ถวัลย์ คุ้มช้าง และวาริน อินทนา. ม.ม.ป. "การควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ชนิดสดคลุกเมล็ดและใส่วัสดุเพาะกล้า" : 349-360.

จิตระพี บัวผัน. 2548. **เรียนรู้เรื่องสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : ปิรามิด.

จุมพล สาระนาค อรพรรณ วิเศษสังข์ และจักรพงษ์ เจิมศิริ. 2540. **คู่มือนักวิชาการภาคสนามโรคผัก.** ฝ่ายวิเคราะห์และพัฒนาการเกษตร เขตที่ 6 กรมวิชาการเกษตร.

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2551. "ผลของน้ำมันหอมระเหยจากข่าที่มีต่อเชื้อสาเหตุโรคในดิน *Sclerotium rolfsii* และประสิทธิภาพในการควบคุม." **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 39 (3) : 253-256.

ชาญชัย สาคแสงจันทร์. 2552. **เภสัชโภชนากินผักให้เป็นยา.** กรุงเทพฯ : บุ๊คส์ ทู ยู.

เชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. ม.ม.ป. **"ผักสดปลอดจุลินทรีย์...เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค."** [online]. เข้าถึง ได้จาก : http://it.doa.go.th/pibai/pibai/n12/v_8-sep/rai.html.

ธวัชชัย กมลธรรม. **"เบญจอำมฤตย์ยาต้านมะเร็งตับ."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thairath.co.th /content/newspaper/401136. 2557.

ปิยะมาศ โสมภีร์ อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง และสมพร ชุนห์ลือชานนท์. 2554. "การปนเปื้อนเชื้อ *Escherichia coli* Miguli และ *Salmonella* spp. ในดินและผักที่ปลูกโดยใช้มูลวัวหมักและ

ไม่หมัก." หน้า 17-23. ใน **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีชา จึงสมานุกูล นวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต และกมลวรรณ กันแต่ง. 2553. "การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด." **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 52 (1-2) : 30-39.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2556. **"โรคและอาการของโรค ที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus*."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3919/โรคและอาการของโรค-ที่เกิดจาก-staphylococcus-aureus.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. **"Calcium hypochlorite / แคลเซียมไฮโพคลอไรต์."** [online]. เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3671/calcium-hypochlorite-แคลเซียมไฮโพคลอไรต์.

พิศวาท บัวรา และคณะ. 2554. **โรคผักและการป้องกันกำจัด.** กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 5-6.

มัทนา ศรีหัตถกรรม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. ม.ม.ป. **การปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* โดยการทำให้กลายพันธุ์.** กทม : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

วัชรีพร คงวิลาด และคมสัน หุตะแพทย์. 2550. **สมุนไพรสามัญประจำบ้านปรุงยาสมุนไพรไว้ใช้เอง. พิมพ์ครั้งที่** 5. กรุงเทพฯ : กองบรรณาธิการวารสารเกษตรธรรมชาติ.

วันดี กฤษณพันธ์. 2538. **สมุนไพรสารพัดประโยชน์.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดลราชเทวี

วิฑูรย์ ปัญญากุล. 2556. **"ภาพรวมเกษตรอินทรีย์ไทย 2554-2555."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.greennet.or.th/sites/default/files/Thai%20OA%2011-12.pdf

วีณา เชิดบุญชาติ. 2547. **ปลูกผักไทย ได้ทั้งอาหารและยา.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บ้านและสวน.

รวีวรรณ เดื่อมขันมณี. 2551. "การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากข่าต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด." **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 39 (3) : 456-459.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2557. **"คนรวยเสี่ยงมีสารพิษตกค้างมากกว่าเกษตรกร พบใบบัวบกมากสุด."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thairath.co.th/content/edu/404961.

สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์. 2556. **ทำเนียบสินค้าอินทรีย์.** นนทบุรี: สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์.

สำนักงานมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2554. **"เชื้ออีโคไล สองด้านที่แตกต่าง ประโยชน์และโทษต่อสุขภาพ"**[online].เข้าถึงได้จาก : http://www.prcmu.cmu.ac.th/scoop_detail.php?sco_sub_id=235.

ศูนย์บริหารศัตรูพืช จังหวัดขอนแก่น. ม.ป.ป. **"เชื้อราไตรโคเดอร์มา."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.pmc04.doae.go.th/patho_trico.htm.

ศูนย์สารสนเทศสิ่งแวดล้อม กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม. ม.ม.ป. **"เกษตรอินทรีย์ (Organic agriculture)...วิถีช่วยโลก"** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.environnet.in.th/?p=7386.

หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำในสัตว์. ม.ม.ป. **"โรคติดเชื้อ *E. coli* O157:H7."** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.cfsph.iastate.edu/FastFacts/th/ecoli.pdf.

อภิชาต ศรีสอาด. 2552. **เกษตรอินทรีย์ สารพันสูตรปุ๋ยอินทรีย์.** กรุงเทพฯ : นาคา

อภิชาต ศรีสอาด และศุภวรรณ์ ใจแสน. 2552. **คู่มือการปลูกผักสวนครัวและผักพื้นบ้าน เล่ม 2.** กรุงเทพฯ : นาคา.

อนันต์ พิริยะภัทรกิจ ประภาพร ตั้งกิจโชติ และปิยะ เฉลิมกลิ่น. 2552. "การผลิตบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์." **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 40 (3) (พิเศษ) : 205-208.

Abada, K.A. 1994. "Fungi causing damping-off and root-rot on sugar-beet and their biological control with *Trichoderma harzianum*." **Journal of Agriculture, Ecosystems and Environment.** 51 : 333-337.

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. and Vinas, I. 2008. "Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments." **International Journal of Food Microbiology**. 123 : 121 – 129.

Allah, E.F. 2005. "Effect of a *Bacillus subtilis* isolate on Southern blight *(Sclerotium rolfsii)* and lipid composition of peanut seeds." **Phytoparasitica**. 33 (5) : 460-466.

Ansari, M., Mirza, M.S., Gupta, G.K. and Srivastava, S.K. 2011. "Characterization of local isolates of *Trichoderma*, *in-vitro* evaluation against *Sclerotium rolfsii* (causal organism of collar rot of soybean) and compatibility with seed dressing fungicides." **Journal of Soybean Research**. 9 : 123-135.

AOAC. 2006. AOAC Official Method 966. 23-24 p.5-6. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. Official Methods of Analysis of AOAC International. Maryland, USA.

Aycock, R. 1966. "Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. Technical Bulletin No. 174 North Carolina Agricultural Experimental Station 202 pp.

Behrsing J., Winkler, S., Franz P. and Premier, R. 2000. "Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables." **Postharvest Biology and Technology**. 19 : 187–192.

Bracket, R. E. 1999. "Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce." **Postharvest Biology and Technology.** 15 : 305-311.

Brackett, R.E. 2000. Safe handling of fruits and vegetables, pp. 79-103. In: Farber, J.M., and Todd, E.C.D. (Editors), Safe Handling of Foods. New York: Marcel Dekker, Inc.

Bhuiyan, M.A. H.B., M.T. Rahman and K.A. Bhuiyan. 2012. "In vitro screening of fungicides and antagonists against *Sclerotium rolfsii*." **African Journal of Biotechnology**. 11(82) : 14822-14827.

Cruz, S.R., Felix, E.A., Cinco, M.D., Osuna, M.A. and Aguilar, G.A. 2007. Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp* and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots." **Food Control.** 18 : 1383–1390.

Dasgupta, M.K. and Mandal, N.C. 1989. **Postharvest Pathology of Perishables**. New Delhi and Oxford: IBH Publishers.

Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P. and Rossman, A.Y. 1989. "Fungi on plants and plant products in the United States." **Mycological Research.** 94 (3) : 429-430.

Galvez, F.L., Allende, A., Selma, M.V. and Gil, M.I. 2009. "Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce." **International Journal of Food Microbiology**. 133 (1-2) : 167-171.

Haywared, A.C. 1991. "Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacerum*." **Annnual Review of Phytopathology**. 29 : 65-87.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's manual of

determinative bacteriology, 9th ed. Philadelphia: Williams and Wilkins. 552 p.

Huang, Y. and Chen. H. 2011. "Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach." **Food Control**. 22 (8) : 1178-1183.

Johnson, M. and Subramanyam, K. 2000. *"In-vitro* efficacy of fungicides against stem rot pathogen (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut." **Annals of Plant Protection Sciences**. 8 (2) : 255-257.

Khattabi, N., Ezzahiri, B., Louali, L. and Oihabi, A. 2001. "Effect of fungicides and *Trichoderma harzianum* on sclerotia of *Sclerotium rolfsii*." **Phytopathologia Mediterranea**. 40 : 143-148.

Kim, J.G., Yousef, A.E. and Chism, G.W. 1999. "Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce." **Journal of Food Safety**. 19 (1) : 17-34.

Mukherjee, P.K. and Raghu, K. 1997a. "*Trichoderma* sp. as a microbial suppressive agent of *Sclerotium rolfsii* on vegetables." **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 13 : 497-499.

Mukherjee, P.K. and Raghu, K. 1997b. "Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*." **Mycopathologia**. 139 : 151-155.

Nalisha, I., Muskhazli, M. and Farizan, T.N. 2006. "Production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*." **Malaysian Journal of Microbiology**. 2 (2) : 19-23.

Neal, A.J., Gonzalez, M.M., Diaz, E.C., Lucia, L.M., O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C. and Castillo, A. 2012. "Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves." **Food Research International**. 45 :1123-1128.

Nahuma Z.S., M. Danon, Y. Hadar and Yona Chen. 2008. "Chemical properties of compost extracts inhibitory to germination of Sclerotium rolfsii." **Soil Biology & Biochemistry**. 40 : 2523-2529.

Raj, H. and Sharma, S.D. 2005. " Integrated management of collar and root rot (*Sclerotium rolfsii*) of strawberry." **Acta Horticulturae**. 696 : 375-379.

Ramawamy, R., Romo, L.R., Vurma, M.V., Balasubramanian, M. and Yousef, A.E. 2007. **"Ozone technology."** [online]. Available at : http://ohionline.osu.edu/fse- fact/0005.html.

Rasu, T., Sevugapperumal, N., Thiruvengadam R. and Ramasamy, S. 2013. "Biological control of sugar beet root rot caused by *Sclerotium rolfsii*." **International Journal of Biological, Ecological and Environmental Sciences.** 2 (1) : 7-10.

Rodgers, S.L., Cash, J. N., Siddiq, M. and Ryser, E.T. 2004. "A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe." **Journal of Food Protection.** 67 : 721-731.

Roy, S., Banerjee, A., Tarafdar, J. and Samanta, S.K. 2010. "Superior bio-efficacy of a combined formulation of carbendazim and mancozeb in inducing defense responses in chilli seedlings against *Sclerotium rolfsii* Sacc. in comparison with methyl jasmonate." **Crop Protection**. (2) : 163–167 .

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology V.2.** Baltimore, Meryland : Williams and Wilkins, 1599 p.

Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Stroshine, R.L. 2002a. "Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce." **Food Microbiology.** 19 : 183-193.

Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Stroshine, R.L. 2002b. "Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and Thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots." **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.** 35 : 720-729.

Singh, N., Singh, R.K. and Bhunia, A.K. 2003. "Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine

dioxide, ozonated water, and thyme essential oil." **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.** 36 : 235-243.

Tronsmo, A. 1992. "Leaf and Blossom Epiphytes and Endophytes as Biological Control Agents." **Biological Control of Plant Diseases**. : 12 p.

Tsahouridou, P.C. and Thanassoulopoulos, C.C. 2002. "Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*." **Soil Biology and Biochemistry**. 34 : 767-776.

Velázquez, L.C., Barbini, N.B., Escudero, M.E. and Estrada, C.L. 2009. "Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables." **Food Control.** 20 : 262–268.

Wang, C., Wang, S., Chang, T., Shi, L., Yang, H., Shao, Y., Feng, W. and Cui, M. 2013. "Efficacy of lactic acid in reducing foodborne pathogens in minimally processed lotus sprouts." **Food Control**. 30 : 721-726.

Willer, H. and Lernoud, J. 2014. **"The World of Organic Agriculture : Statistics & Emerging Trends 2014"** [online].Available at : http://www.greennet.or.th/library/book/organicagriculture/1597.

Wokocha, R. C. 1990. "Integrated control of *Sclerotium rolfsii* infection of tomato in the Nigerian Savanna: effect of *Trichoderma viride* and some fungicides." **Crop Protection**. 9 (3) : 231-234.

Zhang, L., Z. Lu, Z. Yu and X. Gao. 2005. "Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water." **Food Control**. 16 : 279–283.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มด้วยวิธี MPN (Most Probable Number) และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธี MPN

วิธี MPN (Most Probable Number) เป็นการตรวจจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในอาหารหรือน้ำ ซึ่งการใช้วิธีดังกล่าวนี้ใช้หลักการทางสถิติในการประเมินปริมาณจุลินทรีย์ ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีนี้มักนำมาทำให้เจือจางลงระดับ 10 เท่า เลือกระดับความเจือจางที่จะใช้ให้เหมาะสมกับตัวอย่างอาหาร การเลือกใช้ระดับความเจือจางที่จะใช้ให้เหมาะสมกับตัวอย่างอาหาร การเลือกใช้ระดับความเจือจางนั้นมักอาศัยข้อมูลต่างๆ ของการตรวจวิเคราะห์อาหารนั้นๆ เป็นเกณฑ์ตัดสิน โดยเลือกความเจือจาง 3 ระดับติดกัน โดยทั่วไปจะใช้ปริมาณตัวอย่างอาหารที่เจือจางในระดับต่างๆ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวระดับความเจือจางละ 3 หรือ 5 หลอด แล้วแต่จะเลือกใช้ ในกรณีตัวอย่างอาหารมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหารน้อย อาจเพิ่มปริมาณตัวอย่างอาหารเป็น 10 มิลลิลิตร แต่ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของปกติ สำหรับจุลินทรีย์ที่นิยมตรวจนับด้วยปริมาณ MPN ได้แก่ จุลินทรีย์กลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliform) และ *E. coli*

การตรวจคำนวณปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์ม จะใช้หลักสถิติ ในการประเมินจำนวนจุลินทรีย์สูงสุดที่มีในตัวอย่าง เช่น การวิเคราะห์อาหารโดยใช้ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ระดับความเจือจางละ 3 หลอด พบว่าจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซของความเจือจาง 10^{-1} คือ 3 หลอด ความเจือจาง 10^{-2} คือ 2 หลอด และความเจือจาง 10^{-3} คือ 1 หลอด เมื่อนำค่า 3-2-1 เปิดตาราง MPN ได้เท่ากับ 150 MPN ต่อกรัมหรือมิลลิลิตร หากตัวอย่างที่นำมาตรวจมีปริมาณจุลินทรีย์สูงมากจนไม่สามารถอ่านค่าของ 3 ระดับแรกได้ ดังนั้นผู้วิเคราะห์ต้องเจือจางตัวอย่างมากขึ้นเป็น 5 ระดับ คือ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5} ระดับความเจือจางละ 3 หลอด อ่านผลที่ได้คือ 3,3,3,2,1 นำค่าที่อ่านได้ 3 ระดับสุดท้าย คือ 3,2,1 ไปอ่านค่า MPN ได้เท่าใดไปคูณด้วย dilution factor ของความเจือจางเริ่มต้นอ่าน หารด้วย 10 (คมแข พิลาสมบัติ. 2550)

$$\text{MPN/กรัมตัวอย่างอาหาร} = \frac{\text{ค่า MPN dilution factor แรก}}{10}$$

ตารางภาคผนวกที่ ก1 แสดงค่า Most Probable Number (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม โดยใช้ตัวอย่าง 3 ระดับ คือ 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม

หลอดที่ให้ผลบวก				หลอดที่ให้ผลบวก				หลอดที่ให้ผลบวก				หลอดที่ให้ผลบวก			
0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

ที่มา : AOAC (2005)

ตารางภาคผนวกที่ ก2 การจัดจำแนกเชื้อ *E. coli* โดยวิธีชีวเคมี

Indole	MR	VP	Citrate	Type
+	+	-	-	Typical *E. coli*
-	+	-	-	Atypical *E. coli*
+	+	-	+	Typical intermediate
-	+	-	+	Typical intermediate
-	-	+	+	Typical *Enterobacter aerogenes*
+	-	+	+	Atypical *Enterobacter aerogenes*

ที่มา : AOAC (2005)

การเตรียม Peptone

Peptone	1 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย peptone กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
วุ้น	15-17 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

หมายเหตุ : ต้มมันฝรั่ง 200 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งมันสุก กรองน้ำมันฝรั่งด้วยผ้ากรอง เก็บส่วนน้ำเอาไว้ นำวุ้นมาละลายในน้ำที่เหลืออีก 500 มิลลิลิตร จากนั้นต้มจนวุ้นละลายแล้วใส่น้ำตาลกลูโคส คนให้ละลายแล้วผสมน้ำมันฝรั่งที่กรองไว้ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน แบ่งใส่ขวดแก้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมด จากนั้นดูดส่วนผสมที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 13×100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของความยาวหลอด ปิดจุก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

Nutrient broth	8 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย Nutrient broth กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphatetryptose broth (LST)

Lauryl sulphatetryptose broth	35.6 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย Lauryl sulphatetryptose broth กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth (BGLB)

Brilliant green lactose bile broth	41 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย Brilliant green lactose bile broth กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ EC-broth (EC)

EC-broth	37 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย EC-broth กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Trytophan broth

Chromocult	16 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย Trytophan broth มาผสมกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmon's Citrate agar

Simmon's Citrate agar	22.5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย Simmon's Citrate agar กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

Plate count agar	22.5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย Plate count agar กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Methyl Red VogesProskawer broth (MR-VP)

Methyl Red VogesProskawer broth	17 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย Methyl Red Voges Proskawer broth กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Levine's Eosin Methylene Blue (EMB)

Levine's Eosin Methylene Blue	35.96 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : ละลาย Levine's Eosin Methylene Blue กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult

Chromocult	26.5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

หมายเหตุ : นำอาหาร Chromocult มาผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงนำไปผ่านความร้อนให้อาหารละลาย และไม่นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพของอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar (ดัดแปลงจาก Baird-Parker, 2000)

1.1 การเตรียม egg yolk solution

1.1.1 นำไข่ไก่สดมาล้างเปลือกให้สะอาด จากนั้นจึงนำไปแช่ใน 70% ethyl alcohol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.1.2 นำมาวางในบีกเกอร์ที่มีกระดาษกรองรองปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ให้แอลกอฮอล์ระเหยไปจนหมด

1.1.3 ตอกไข่ใส่ตู้ปลอดเชื้อ ทำการแยกไข่ขาวออกให้หมดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกส่วนที่เป็นไข่แดงลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ เติมไข่แดงลงในขวดดูแรนขนาดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้ออยู่ 140 มิลลิลิตร ใส่ไข่แดงจนมีปริมาตร 200 (ผสมในอัตราส่วน น้ำเกลือ 0.85% 5 ส่วน+ไข่แดง 5 ส่วน) เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

1.2 การเตรียม 1% potassium tellurite (PT)

1.2.1 ชั่ง potassium tellurite ปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์แก้ว ใส่น้ำกลั่นทำการคนจนสารละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

1.2.2 นำ potassium tellurite ที่ปรับปริมาตรแล้วเทใส่ลงในบีกเกอร์แก้วทำให้สารละลายปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองปลอดเชื้อ ใส่ลงในขวดดูแรนปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

1.3 การผสม egg yolk – tellurite emulsion

1.3.1 นำ egg yolk solution ที่เตรียมไว้มาผสมกับ 1% potassium tellurite ที่กรองแล้ว โดยนำ 1% potassium tellurite วัดปริมาตร 40 มิลลิลตร ด้วยกระบอกตวงปลอดเชื้อผสมลงขวดดูแรน egg yolk solution

1.3.2 ทำการเขย่าให้เข้ากัน จะได้ egg yolk tellurite 240 มิลลิลิตร เก็บในขวดดูแรนปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

1.4 การเตรียม Baird Parker medium

1.4.1 ใช้กระบอกตวง ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เทน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร

1.4.2 ชั่ง Baird Parker agar ปริมาณ 63 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่มีบีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนให้อาหารกระจายในน้ำกลั่น จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นที่เหลือทั้งหมด

1.4.3 นำไปต้มให้วุ้นละลาย นำมาเทในขวดรูปชมพู่ 285 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างปรับอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส

1.4.4 เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จึงเติม egg yolk tellurite ลงไปในขวดๆละ 15 มิลลิลิตร

1.4.5 เขย่าเบาๆ ให้ไข่แดงแตก และเป็นเนื้อเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จานละ 15-20 มิลลิลิตร

1.5 วิธีวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ Coagulase ของ *Staphylococcus aureus*

1.5.1 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ลงในหลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5.2 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

1.5.3 ดูด Rabbit plasma ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

1.5.4 อ่านผลโดยดูการแข็งตัวของ plasma จากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *Staphylococcus aureus* สร้างขึ้น

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

ตารางภาคผนวกที่ ข1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* (%) ภายในห้องปฏิบัติการ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	8	2953.27	369.16	27.82 **
Error	36	477.76	13.27	
Total	44	3431.03		
CV = 6.0 %				

2. การทดสอบการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าในสภาพโรงเรือนทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ข2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความสูง (ซม.)ของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 1

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	30.478	7.6195	1.45 ns
Error	20	157.129	5.2376	
Total	24	187.608		
CV = 26.4 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)ของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 1

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	5.948	1.487	< 1
Error	20	192.480	6.416	
Total	24	198.429		
CV = 26.0 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความยาวไหล (ซม.) ของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 1

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	342.805	85.701	< 1
Error	20	3100.913	103.363	
Total	24	3443.718		
CV = 40.7 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของจำนวนไหลต่อต้นของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 1

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	3.024	0.756	< 1
Error	20	28.262	0.942	
Total	24	31.286		
CV = 41.7 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของจำนวนต้นต่อไหลของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 1

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	3.718	0.929	< 1
Error	20	34.742	1.158	
Total	24	38.461		
CV = 35.6 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข7 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า (%) ของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 1

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	4326.25	1081.56	111.07 **
Error	20	94.75	9.73	
Total	24	4521.00		
CV = 6.3%				

ตารางภาคผนวกที่ ข8 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของผลผลิตบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 1

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.5849	0.1462	39.25 **
Error	20	0.0745	0.0037	
Total	24	0.6595		
CV = 5.9 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข9 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความสูง (ซม.)ของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 2

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	4.113	1.028	< 1
Error	20	233.923	7.797	
Total	24	238.036		
CV = 21.3 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข10 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)ของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 2

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	53.415	13.353	1.06 ns
Error	20	379.184	12.639	
Total	24	432.184		
CV = 21.1 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข11 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความยาวไหล (ซม.)ของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 2

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	143.526	35.88	< 1
Error	20	1804.883	60.162	
Total	24	1948.409		
CV = 51.9 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข12 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของจำนวนไหลต่อต้นของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 2

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.738	0.184	< 1
Error	20	30.525	1.017	
Total	24	31.264		
CV = 54.8 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข13 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของจำนวนต้นต่อไหลของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 2

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	2.210	0.552	< 1
Error	20	27.108	0.903	
Total	24	29.318		
CV = 48.4 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข14 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า (%) ของบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 2

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	3431.49	857.87	30.82 **
Error	20	556.78	27.84	
Total	24	3988.27		
CV = 9.6 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข15 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของผลผลิตบัวบกภายในสภาพโรงเรือนทดลอง ฤดูกาลที่ 2

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.9817	0.2454	40.81 **
Error	20	0.1202	0.0060	
Total	24	1.1019		
CV = 8.6 %				

3. ทดสอบการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าบัวบกในสภาพแปลงปลูก

ตารางภาคผนวกที่ ข16 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความสูง (ซม.)ของบัวบกภายในสภาพแปลงปลูก

SV	DF	SS	MS	F
Replications	3	24.454	4.075	2.2 ns
Treatment	4	10.604	2.652	1.43 ns
Error	12	44.528	1.855	
Total	19	79.586		
CV = 18.5 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข17 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)ของบัวบกภายในสภาพแปลงปลูก

SV	DF	SS	MS	F
Replications	3	125.909	20.984	2.18 ns
Treatment	4	27.171	6.792	< 1
Error	12	231.165	9.631	
Total	19	384.246		
CV = 20.5 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข18 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของความยาวไหล (ซม.)ของบัวบกภายในสภาพแปลงปลูก

SV	DF	SS	MS	F
Replications	3	328.630	54.771	1.37 ns
Treatment	4	92.120	23.03	< 1
Error	12	957.890	39.91	
Total	19	1378.641		
CV = 75.9 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข19 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของจำนวนไหลต่อต้นของบัวบกภายในสภาพแปลงปลูก

SV	DF	SS	MS	F
Replications	3	2.299	0.383	< 1
Treatment	4	1.058	0.264	< 1
Error	12	13.277	0.553	
Total	19	16.635		
CV = 65.7 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข20 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของจำนวนต้นต่อไหลของบัวบกภายในสภาพแปลงปลูก

SV	DF	SS	MS	F
Replications	3	3.709	0.618	1.42 ns
Treatment	4	1.851	0.462	1.06 ns
Error	12	10.484	0.436	
Total	19	16.045		
CV = 62.5 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข21 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* (%) ภายในสภาพแปลงปลูก

SV	DF	SS	MS	F
Replications	3	74.4559	24.8186	< 1
Treatment	4	993.4268	248.3567	6.80 **
Error	12	438.3060	36.5255	
Total	19	1506.188		
CV = 20.3 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข22 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของผลผลิตบัวบกภายในสภาพแปลงปลูก

SV	DF	SS	MS	F
Replications	3	0.0231	0.0077	2.40 ns
Treatment	4	0.2423	0.0605	18.81 **
Error	12	0.0386	0.0032	
Total	19	0.3041		
CV = 5.3 %				

4. การศึกษาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในบัวบก

ตารางภาคผนวกที่ ข23 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติการปนเปื้อนปริมาณเชื้อราของบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	199.958	28.565	< 1
Error	16	512.694	32.043	
Total	23	712.651		
CV = 21.1 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข24 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติการปนเปื้อนปริมาณจุลินทรีย์รวมของบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	232.059	33.151	175.36 **
Error	16	3.025	0.189	
Total	23	235.084		
CV = 17.8 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข25 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติการปนเปื้อน coliform ของบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ เปรียบเทียบกับการปลูกแบบอินทรีย์

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	63.569	9.081	624.68 **
Error	16	0.233	0.015	
Total	23	63.802		
CV = 9.7 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข26 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติการปนเปื้อน *E. coli* ของบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ เปรียบเทียบกับการปลูกแบบอินทรีย์

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	33.748	4.821	920.51 **
Error	16	0.084	0.005	
Total	23	33.382		
CV = 8.4 %				

5. การศึกษาวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* TISTR780 และเชื้อ *S. aureus* TISTR118

ตารางภาคผนวกที่ ข27 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ Coliform (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 0 ก่อนการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.0472	0.0118	< 1
Error	10	0.3001	0.0300	
Total	14	0.3473		
CV = 3.0 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข28 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ Coliform (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 0 หลังการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	9.5456	2.3864	135.90 **
Error	10	0.1756	0.0176	
Total	14	9.7212		
CV = 3.2 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข29 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ Coliform (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 3 หลังการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	13.4113	3.3528	381.87 **
Error	10	0.0878	0.0088	
Total	14	13.4991		
CV = 2.8 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข30 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ *E. coli* (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 0 ก่อนการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.0186	0.0046	< 1
Error	10	0.1640	0.0164	
Total	14	0.1826		
CV = 2.2 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข31 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ *E. coli* (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 0 หลังการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	13.5560	3.3890	171.68 **
Error	10	0.1974	0.0197	
Total	14	13.7534		
CV = 3.4 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข32 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ *E. coli* (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 3 หลังการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	13.5074	3.3769	256.73 **
Error	10	0.1315	0.0132	
Total	14	13.6389		
CV = 3.6 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข33 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ *S. aureus* (log CFU/g) ในบัวบกเมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 0 ก่อนการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.1376	0.0344	< 1
Error	10	0.3622	0.0362	
Total	14	0.4998		
CV = 3.3 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข34 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ *S. aureus* (log CFU/g) ในบัวบก เมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 0 หลังการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	13.7539	3.4385	380.08 **
Error	10	0.0905	0.0090	
Total	14	13.8444		
CV = 2.4 %				

ตารางภาคผนวกที่ ข35 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติของปริมาณ *S. aureus* (log CFU/g) ในบัวบก เมื่อล้างด้วย น้ำประปา คลอรีน สารละลายกรดแลคติก และน้ำโอโซน วันที่ 3 หลังการล้าง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	15.0615	3.7654	70.67 **
Error	10	0.5328	0.0533	
Total	14	15.5943		
CV = 7.4 %				

The 12th National Horticultural Congress

ประชุมวิชาการ
พืชสวนแห่งชาติ
ครั้งที่ 12 กรุงเทพมหานคร

กำหนดการ และบทคัดย่อ
การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 12

The 12th National Horticultural Congress
พืชสวนสู่ AEC ภายใต้สภาวะโลกร้อน
Horticulture Toward AEC Under Climatic Changes
วันที่ 9 - 12 พฤษภาคม 2556
ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ

HORTICULTURAL SCIENCE SOCIETY OF THAILAND
สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย

vnu exhibitions asia pacific

กรมวิชาการเกษตร

สกา

การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์

Study of Damping-off Control in Asiatic Pennywort Through Organic Agriculture

สุนิตรา คามีศักดิ์[1] สุวรินทร์ บำรุงสุข[2] และ แสงมณี ชิงดวง[3]

Kameesak, S.[1], Bumrungsuk, S.[2] and Chingduang, S.[3]

Abstract

Asiatic Pennywort is a widely used plant. Outbreaks of *Sclerotium rolfsii* cause damp-off and are extremely damaging to farmers. Control with *Trichoderma sp., Bacillus subtilis,* fermented plant residues and combination of fermented plant residues with the two types of antagonistic microorganisms and compared to the control treatment has been studied. It was found that *Trichoderma harzianum* was most effective at 69.44%. Followed by fermented plant residue, *Bacillus subtilis* and the combination of fermented plant residue with the two types of antagonistic microorganisms, having inhibition control at 53.14, 45.38 and 38.46%, respectively. In the greenhouse experiments with *Bacillus subtilis* the percentage of damping-off was 40%, followed by *Trichoderma harzianum,* fermented plant residue and untreated control at damping-off infection of 45, 58 and 70%, respectively.

Keywords: Asiatic Pennywort, *Sclerotium rolfsii, Trichoderma harzianum, Bacillus subtilis*

บทคัดย่อ

บัวบกเป็นพืชที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และได้มีการเข้าทำลายของโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ทำให้โคนต้นเหลืองและตาย สร้างความเสียหายกับเกษตรกรเป็นอย่างมาก จึงได้ศึกษา การควบคุมโรคโคนเน่าด้วยการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* น้ำหมักชีวภาพ และการใช้น้ำหมักชีวภาพร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การ ทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี bi-culture ภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด คือ 69.44% รองลงมาคือ การใช้น้ำหมักชีวภาพ เชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้น้ำหมักชีวภาพร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งเชื้อสาเหตุ 53.14, 45.38 และ 38.46% ตามลำดับ การทดลองภายในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่าการ ใช้แบคทีเรีย Bacillus subtilis มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโคนเน่าน้อยที่สุด คือ 40% รองลงมาคือ การใช้เชื้อ *Trichoderma harzianum* น้ำหมักชีวภาพ และกรรมวิธีควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 45, 58 และ 70% ตามลำดับ

คำสำคัญ: บัวบก *Sclerotium rolfsii, Trichoderma harzianum, Bacillus subtilis*

[1,2] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[1,2] Major of Plant Management, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

[3] สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

[3] Horticulture Research Institute, Department of Agriculture, Bangkok 10900

การป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์
Suppression damping-off disease on asiatic pennywort in organic farming systems

สุนิตรา คามีศักดิ์[1] สุวรินทร์ บำรุงสุข[2] และ แสงมณี ชิงดวง[3]
Sunitra Kameesak[1], Suvarin Bumrungsuk[2] and Sangmanee Chingduang[3]

ABSTRACT

Asiatic pennywort is a plant used widely which held in herbal health care group. It curative properties is to accelerate the growth of epithelium cell and having faster heal of wound.. The problem of asiatic pennywort production is the outbreak of *Sclerotium rolfsii* causing a damp-off disease which caused plant stem turn yellowish and die. and result in extremely damaging to growers. Therefore, the studies was caried out to control damping off with *Trichoderma sp.*, *Bacillus subtilis.*, and fermented banana as compared to the control to suppress with bi-culture under the laboratory condition. It were found that *Trichoderma harzianum* showed the highest percentage of inbihition, 69.44%. The pot experiments in greenhouse condition showed that chemical had minimum of damping-off (31.54%) and highest yield (1.20 tons/rai) and following by *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* treatment. Due to the chemical usage leaving toxic residues on plants and affect the human bodies. *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* should be considered as alternatives which have percent of damp-off disease and yields as follows: 45.50 and 43.75%, and 1.12 and 1.09 tons/rai, respectively. These two products are known that they have no health risk for growers and consumers in the future.

Keywords : Asiatic Pennywort, *Sclerotium rolfsii*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*

บทคัดย่อ

บัวบกเป็นพืชที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายจัดอยู่ในกลุ่มสมุนไพรสาธารณสุขมูลฐาน สรรพคุณช่วยในการเร่งการเจริญเติบโตของเยื่อบุผิว แผลหายเร็ว แต่ปัญหาการผลิตบัวบกคือมีการเข้าทำลายของโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ทำให้โคนต้นเหลืองและตาย สร้างความเสียหายกับเกษตรกรเป็นอย่างมาก จึงได้มีการศึกษาการควบคุมโรคโคนเน่าด้วยการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และน้ำหมักชีวภาพ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี bi-culture ภายในห้องปฏิบัติการ พบว่า การใช้ *Trichoderma harzianum* มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดคือ 69.44% การทดลองในสภาพโรงเรือน พบว่า การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด (31.54%) และให้ผลผลิตมากที่สุด(1.20 ตัน/ไร่) รองลงมาเป็นวิธี *Trichoderma harzianum* และ *Bacillus subtilis* แต่เนื่องจากการใช้สารเคมีนั้นทำให้เกิดสารตกค้างในพืช และส่งผลต่อสุขภาพร่างกายมนุษย์ จึงควรหันมาใช้ *Trichoderma harzianum* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและผลผลิตรองลงมาจากการใช้สารเคมี คือ 45.50 และ 43.75% ตามลำดับและและผลผลิต 1.12 และ 1.09 ตัน/ไร่ ตามลำดับ สาร bioproduct ทั้งสองชนิดไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภคต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : บัวบก *Sclerotium rolfsii Trichoderma harzianum Bacillus subtilis*

[1,2] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1,2] Major of plant management Faculty of Agricultural Technology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Bangkok 10520

คำนำ

บัวบก (Asiatic Pennywort) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* (Linn.) Urban. วงศ์ Umbelliferae เป็นพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มสมุนไพรสาธารณสุขมูลฐาน ส่วนที่นำไปใช้คือ ใบ และทั้งต้น ซึ่งมีรสขา หอมเย็น สรรพคุณช่วยในการเร่งการเจริญเติบโตของเยื่อบุผิว รักษาแผลให้หายเร็ว รักษาแผลเป็น ใส่ในเจลรักษาแผลเปื่อยในปาก ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา(กมลรัตน์, 2550; จิตระพี,2547) ปัจจุบันการผลิตภาคเกษตร มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตเพื่อการอุตสาหกรรมและการส่งออก โดยการใช้สารเคมี ซึ่งเมื่อใช้เป็นระยะเวลานานอาจส่งผลกระทบให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ดินเสื่อมโทรม ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้ผลิต ผู้บริโภค ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้จากการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในท้องถิ่น เช่น ผักผลไม้สด สมุนไพร หอยเชอรี่ เศษปลาสด ขี้เถ้าแกลบ กากอ้อย กากน้ำตาล มาผลิตเป็นสารสกัดชีวภาพ ซึ่งสามารถใช้ได้ผลดี ลดต้นทุนการผลิต เกษตรกรมีรายได้เพิ่ม คุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น (อภิชาติ, 2552) โรคเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งของการปลูกบัวบกเป็นการค้าโดยเฉพาะโคนเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Mukherjee and Raghu (1997) จึงต้องมีการศึกษาการป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์ เพื่อนำไปพัฒนาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างบัวบกจากแหล่งต่างๆ
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. กล้องจุลทรรศน์
4. กระบอกตวง
5. plate และอุปกรณ์เลี้ยงเชื้อ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ
7. แบบบันทึกข้อมูล

วิธีการดำเนินงาน

1. ทดสอบการป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block design (RCBD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum*

กรรมวิธีที่ 2 ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*

กรรมวิธีที่ 3 น้ำหมักชีวภาพ

กรรมวิธีที่ 4 วิธีควบคุม (control)

การเตรียมน้ำหมักชีวภาพ โดยนำกล้วยน้ำหว้าที่สุกแล้ว มาหั่นเป็นชิ้นๆ ชั่งมา 30 กิโลกรัม และกากน้ำตาล จำนวน 10 กิโลกรัม มานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงใส่ลงในถังพลาสติกที่เตรียมไว้ จากนั้นใส่พด 2 ที่ผสมกับน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 ลิตรลงไปในถัง คนละให้ทั่ว และปิดฝาให้สนิท

ทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ด้วยวิธี Bi-culture technique บนอาหาร PDA กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ สำหรับเชื้อ *Trichoderma* sp. และ *Sclerotium rolfsii* ใช้เชื้อที่มีอายุ 7 วัน โดยนำ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะและนำไปวางบนอาหาร PDA ให้ทั้งสองเชื้อมีระยะห่าง 5 เซนติเมตร สำหรับเชื้อ *Baciilus subtilis* ให้ใช้ loop ลากเป็นเส้นยาว ห่างจากเชื้อสาเหตุ 5 เซนติเมตร น้ำหมักชีวภาพใช้ paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีระยะห่างจากเชื้อสาเหตุ 5 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดความยาวของรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุด้านที่เจริญไปทางกรรมวิธีทดสอบ และความยาวของรัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรัศมีการเจริญ (percent inhibition rate growth หรือ PIRG) ของเชื้อราสาเหตุ

2. ทดสอบการป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของบัวบกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทดลอง

ปลูกบัวบกสายพันธุ์นครปฐม ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร บรรจุด้วยดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใส่ปุ๋ยมูลโคอัตรา 2 กิโลกรัม/ตารางเมตร ใส่เชื้อ *Sclerotium rolfsii* ประมาณ 15 เมล็ดต่อกระถาง วางแผนการทดลองแบบRandomized Complete Block design(RCBD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum*

กรรมวิธีที่ 2 ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*

กรรมวิธีที่ 3 ใส่น้ำหมักชีวภาพ

กรรมวิธีที่ 4 การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (เทอร์ราคลอร์)

กรรมวิธีที่ 5 วิธีควบคุม (control)

บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดโคนเน่า ผลผลิตสด นำข้อมูลมาเปรียบเทียบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05%

ผลและวิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ภายในห้องปฏิบัติการ พบว่า การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 69.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, น้ำหมักชีวภาพ และกรรมวิธีควบคุม (control) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 53.14, 45.38 และ 38.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1)

การป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของบัวบกแบบอินทรีย์ในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโคนเน่าเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 31.54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, น้ำหมักชีวภาพ และกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโคนเน่าเฉลี่ย 43.75, 45.50, 58 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลผลิตของบักบก พบว่า การใช้สารเคมีให้ผลผลิตบัวบกสูงที่สุดคือ 1.20 ตัน/ไร่ รองลงมาคือ *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, น้ำหมักชีวภาพ และกรรมวิธีควบคุม 1.12, 1.09, 0.98 และ 0.75 ตัน/ไร่ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2)

Table 1 percent inhibition rate growth

treatment	percent inhibition rate growth[1/]
Trichoderma harzianum	69.44 a
Bacillus subtilis	53.14 b
Fermented banana	45.38 b
Control	38.46 c
CV (%)	19.65

[1/]Means followed by the same letter within columes are not significantly different ($P \leq 0.05$)

Table 2 Percent of damp-off disease and yield of asiatic pennywort

treatment	percent of damp-off disease[1/]	yield[1/] (tons/rai)
Trichoderma harzianum	45.50 b	1.12 ab
Bacillus subtilis	43.75 b	1.09 ab
Fermented banana	58.00 c	0.98 b
Chemical	31.54 a	1.20 a
Control	70.00 d	0.75 c
CV (%)	60.27	37.40

[1/]Means followed by the same letter within columes are not significantly different ($P \leq 0.05$)

สรุปผลการทดลอง

การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด 31.54% และให้ผลผลิต 1.20 ตัน/ไร่ แต่เนื่องจากการใช้สารเคมีนั้นทำให้เกิดสารตกค้างในพืช และส่งผลต่อสุขภาพของเกษตรกร จึงควรหันมาใช้ *Trichoderma harzianum* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและผลผลิตใกล้เคียงกับการใช้สารเคมี คือ 45.50% และ 1.12 ตัน/ไร่ แต่ไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกายของเกษตรกรและผู้บริโภคต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กมลรัตน์ ณ หนองคาย. 2550. สปาไทยเพื่อความงาม ผลิตภัณฑ์สปาด้วยสมุนไพรไทย. สำนักพิมพ์เกษตรธรรมชาติ พญาไท กทม. หน้า 40.

จิตระพี บัวผัน. 2548. เรียนรู้เรื่องสมุนไพร. สำนักพิมพ์ ปิรามิด ราษฎร์บูรณะ กรุงเทพฯ. หน้า 120-121.

อภิชาต ศรีสอาด. 2552. เกษตรอินทรีย์ สารพันสูตรปุ๋ยอินทรีย์. สำนักพิมพ์ นาคา เขตบางแค กทม. 142 หน้า.

Mukherjee P.K. and Raghu K. 1997. *Trichoderma* sp. As a microbial suppressive agent of *Sclerotium rolfsii* on vegetables. World Journal of Microbiology & Biotechnology 13: 497-499.

สมาคมพืชสวน แห่งประเทศไทย
HORTICULTURAL SCIENCE SOCIETY OF THAILAND
ตึกสมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย สถาบันวิจัยพืชสวน
กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900
Horticultural Research Institute, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok, 10900 THAILAND
Tel. (66-2) 940-6578 Fax. (66-2) 940-6579
Email – hsstth_1@hotmail.com

ที่ สพท. 051 /2556

วันที่ 28 พฤศจิกายน 2556

เรียน คุณสุนิตรา คามีศักดิ์

เรื่อง ตอบรับการเสนอผลงาน

คณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 12 (The 12th National Horticultural Congress) ระหว่างวันที่ 9-12 พฤษภาคม 2556 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ ขอขอบคุณ คุณสุนิตรา คามีศักดิ์ เป็นอย่างยิ่งที่ลงทะเบียนเข้าร่วมประชุม และ เสนอผลงานวิจัยภาคบรรยาย เรื่อง การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์ ซึ่งสมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย จะจัดพิมพ์เรื่องที่บรรยายลงในวารสารวิทยาศาสตร์การเกษตรต่อไป

ขอแสดงความนับถือ

(นางกนกรัตน์ สิทธิพจน์)
กรรมการและเลขานุการ
คณะกรรมการจัดการประชุม

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมการออกหาอาหารของชันโรง Tetragonula laeviceps (Smith, 1857) ในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 326

นพมาศ วันทองสุข นฤมล เซี่ยงปู ชัยณรงค์ คำปอม พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ และธัชคณิน จงจิตวิมล

การใช้ประโยชน์จากพืชในพื้นที่เขตอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวงจังหวัดพิษณุโลก – เพชรบูรณ์ 332

บงกช เผ่าตั๊ะใจ นพมาศ วันทองสุข นฤมล เซี่ยงปู้ จริญพร หมั่นกิจ และธัชคณิน จงจิตวิมล

ผลของไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลพริกชี้ฟ้า 339

วัลลภา วอทอง และมยุรี กระจายกลาง

การศึกษาการสูญเสียปริมาณธาตุอาหารจากการชะล้างพังทลายของดินบนพื้นที่ทำการเกษตร กรณีศึกษาการใช้แถบหญ้าแฝก 350

ปิยะดา วชิรวงศกร ฉัฐวุฒิ คงคุ้ม และประวิทย์ หุ่นทอง

ความคิดเห็นของเกษตรกรที่มีต่อการใช้แถบหญ้าแฝกในพื้นที่ทำการเกษตร 358

ปิยะดา วชิระวงศกร นิพล เก้าพัน และอุษณีย์ ทิมสูงเนิน

การศึกษาสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดยอดและรากของกะตังใบ 366

ฉัฐพล มหาชัย และวนิดา แซ่จึง

คุณภาพทางจุลชีววิทยาของบัวบกจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ 370

สุนิตรา คามีศักดิ์ สุวรินทร์ บำรุงสุข และแสงมณี ชิงดวง

ประสิทธิภาพของหญ้าแฝกในการลดการชะล้างพังทลายของดินในพื้นที่ทำการเกษตร กรณีศึกษา: หมู่บ้านโคกผักหวาน อำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก 375

ปิยะดา วชิระวงศกร บุญสืบ ทองคำ ฉัฐวุฒิ คงคุ้ม และวัฒนา ไตรพรมมา

ผลของระดับ pH และระดับน้ำตาลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูของว่านแสงอาทิตย์ ว่านสี่ทิศ และว่านมหาลาภ 383

รุ่งนภา ช่างเจรจา พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง และสันติ ช่างเจรจา

การศึกษาความสัมพันธ์ของช่วงเวลา ต่อการเปิด-ปิดปากใบของมะนาวตาฮิติ ก่อนและหลังงดน้ำ 388

สันติ ช่างเจรจา ชิติ ศรีตนทิพย์ ยุทธนา เขาสุเมรุ และ รุ่งนภา ช่างเจรจา

คุณภาพทางจุลชีววิทยาของบัวบกจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ

Microbiological quality of asiatic pennywort from various sources

สุนิตรา คามีศักดิ์[1,*] สุวรินทร์ บำรุงสุข[2] และแสงมณี ชิงดวง[1,3]

SunitraKameesak[1], Suvarin Bumrungsuk[2] and Sangmanee Chingduang[1,3]

บทคัดย่อ

บัวบกเป็นผักที่นิยมนำมาใช้ในการบริโภคในรูปของผักสด ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารร้ายแรงต่อผู้บริโภคจึงได้มีการสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของบัวบกจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ 3 แบบ คือตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด (conventional markets) ตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด (hygienic markets) และห้างสรรพสินค้า(supermarkets) พบว่า บัวบกจากห้างสรรพสินค้า มีปริมาณจุลินทรีย์รวม และปริมาณเชื้อราน้อยที่สุด คือ 2.88×10^{2} CFU/g และ 3.73×10^{5} CFU/g ตามลำดับ ใบบัวบกจากห้างสรรพสินค้ามีปริมาณ coliform น้อยที่สุดคือ 6.25×10^{2} MPN/g รองลงมาคือ ตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด และตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด มีปริมาณ coliform เฉลี่ย 9.2×10^{2} MPN/g และ 9.4×10^{2} MPN/g ตามลำดับ ส่วนปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* พบว่า บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีปริมาณ *E. coli* น้อยที่สุด คือ 0.48×10^{2} MPN/g. รองลงมาคือ บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด และตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด มีปริมาณ 2.36×10^{2} MPN/g. และ 2.84×10^{2} MPN/g. ตามลำดับ เมื่อจำแนกเชื้อ *E. coli* โดยวิธีทางชีวเคมี สามารถจำแนกออกมาได้ 2 ชนิดคือ typical *Enterobacteraerogenes* และ atypical *Enterobacteraerogenes*

คำสำคัญ : บัวบก coliform *Escherichia coli*

Abstract

Asiatic pennywort is widely used for fresh vegetable consumption. It may be contaminated by pathogenic microorganisms which cause serious food poisoning to consumers, therefore, the microbial quality analysis of the asiatic pennywort collected from 3 different types of markets: conventional markets (without cleaning management), hygienic markets (with cleaning management) and vegetable shelves in the supermarkets. The results showed that asiatic pennywort from the supermarket had the least amount of total bacteria and total count at 2.88×10^{2} CFU/g and 3.73×10^{5} CFU/g, respectively. Asiatic pennywort from the supermarket had the least amount of coliform at 6.25×10^{2} MPN/g. Followed by the hygienic markets and conventional markets had amount of coliform at 9.2×10^{2} MPN/g. and 9.4×10^{2} MPN/g. respectively. The amount of *Escherichia coli* found on asiatic pennywort from department stores had the least at 4.8×10^{2} MPN/g. and followed by the hygienic markets and conventional markets (2.36×10^{2} MPN/g. and 2.84×10^{2}

[1,2]สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[3]สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

*Corresponding author : E-mail : noi_na3@hotmail.com

MPN/g. respectively). *E. coli* identified by biochemical tests could be classified into 2 types : typical Enterobacteraerogenes and atypical Enterobacteraerogenes

Keywords: Asiatic Pennywort coliform *Escherichia coli*

บทนำ

บัวบก (Asiatic Pennywort) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* (Linn.) Urban. วงศ์ Umbelliferae เป็นพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มสมุนไพรสาธารณสุขมูลฐาน ส่วนที่นำไปใช้คือ ใบ และทั้งต้น ซึ่งมีรสขา หอมเย็น สรรพคุณช่วยในการเร่งการเจริญเติบโตของเยื่อบุผิว รักษาแผลให้หายเร็ว รักษาแผลเป็น ใส่ในเจลรักษาแผลเปื่อยในปาก ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา(กมลรัตน์, 2550; จิตระพี, 2547; Sakshi et al., 2010) บัวบกประกอบด้วยเส้นใยที่ให้พลังงาน แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามิน (ค่อนข้างมาก) วิตามิน B1 วิตามินบี 2 ไนอาซิน วิตามินซี α-amyrin, triterpene และ glycoside triterpene เช่น กรดเอเชีย กรด madecassic, asiaticoside, madecassol saponins และสารขมที่ชื่อ vallarine (Thorne, 2007)

ปัจจุบันการผลิตภาคเกษตร มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตเพื่อการอุตสาหกรรมและการส่งออก โดยการใช้สารเคมี ซึ่งเมื่อใช้เป็นระยะเวลานานอาจส่งผลกระทบให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ดินเสื่อมโทรม ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้ผลิต ผู้บริโภค ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้จากการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในท้องถิ่น เช่น ผักผลไม้สด สมุนไพร หอยเชอรี่ เศษปลาสด ขี้เถ้าแกลบ กากอ้อย กากน้ำตาล มาผลิตเป็นสารสกัดชีวภาพ ซึ่งสามารถใช้ได้ผลดี ลดต้นทุนการผลิต เกษตรกรมีรายได้เพิ่ม คุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น (อภิชาติ, 2552)

กรมการค้าต่างประเทศ (2549) รายงานว่า ผักของไทยที่ส่งออกไปต่างประเทศในแถบยุโรปจำนวน 23 ชนิด ได้แก่ ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง ใบกระเพรา ใบโหระพา ผักแขยง ใบสะระแหน่ ผักแพรว ต้นหอม ผักคื่นไช่ ใบกุยไช่ ดอกกุยไช่ ชะอม ตะไคร้ ผักบุ้ง ผักแว่น ผักกระเฉด ใบบัวบก ใบชะพลู ผักโขมแดง ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง พริกขี้หนู และผักปลังได้มีการแจ้งเตือนการพบเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. และจะยกเลิกการห้ามนำเข้าหากไทยมีการรับรองว่าผักที่ส่งออกปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหานี้และเป็นการสร้างความเชื่อมั่นให้กับประเทศคู่ค้าของไทย ในปี 2550 จึงได้ออกประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม124 ตอนพิเศษ 55 ง. เรื่องกำหนดชนิดหรือประเภทของผักและผลไม้ ที่ต้องมีหนังสือรับรองการส่งออก (กรมการค้าต่างประเทศ, 2550)

E. coli มีรูปร่างเป็นแท่งไม่สร้างสปอร์ติดสีแกรมลบดำรงชีวิตแบบใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้ เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 7-10 องศาเซลเซียสไปจน 50 องศาเซลเซียสเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่มักไม่เป็นอันตรายและสามารถถูกยับยั้งได้ในทางเดินอาหารของคนแต่ก็ยังมีบางชนิดที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ระยะฟักตัว: 10 ชั่วโมง ถึง 8 วัน ทำให้มีอาการอาเจียนท้องเสียมีไข้และปวดท้องท้องเสียตั้งแต่อ่อนๆจนถึงรุนแรงแต่ไม่มีเลือดหรือเมือกปนปวดท้องอาเจียนอาจทำให้ขาดน้ำอย่างรุนแรงถึงช็อคได้หรือมีอาการแทรกซ้อนที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (กันยา, 2555)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างบัวบกจากแหล่งต่างๆ
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. กล้องจุลทรรศน์
4. กระบอกตวง
5. plateและอุปกรณ์เลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ
7. แบบบันทึกข้อมูล

วิธีการ

สุ่มตัวอย่างบัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด จำนวน 4 แหล่ง บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่มีการจัดด้านความสะอาด จำนวน 4 แหล่ง และบัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า จำนวน 4 แหล่งเพื่อตรวจวิเคราะห์ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวม ปริมาณเชื้อรา Coliforms และ *E. coli*

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Coliforms และ *E. coli* ตามวิธีของ AOAC (2006) โดยชั่งตัวอย่างบัวบก 25 กรัมแล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น 1:10 เจือจางต่อให้เป็น 1:100, 1:1,000 นำปิเปต 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางที่ 1:10, 1:100 และ1:1,000 ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate tryptose broth (LST) ที่บรรจุด้วยหลอดดักแก๊ส(fermentation tube) ระดับความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูหลอดที่เกิดฟองแก๊สใน fermentation tube ถ่ายเชื้อเฉพาะหลอดที่เกิดฟองแก๊สโดยใช้ loop จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูหลอด BGLB ที่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นนำผลที่ได้ไปเปิดตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN colifroms bacteria/g เขี่ยเชื้อ1 loop จากหลอด EC-broth ที่มีฟองแก๊สแล้ว streak บน Levine, s eosin methylene blue (EMB) agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ35 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง โคโลนีของ *E. coli* จะมีลักษณะสีดำตรงกลางหรืออาจไม่มีก็ได้ นำไปจัดจำแนก (indentification) Biochemical tests โดยเขี่ยเชื้ออย่างน้อย 2 โคโลนี (isolate colony) ถ่ายใส่ Plate Count Agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ประเมินค่า MPN ของ *E. coli* จากจำนวนหลอดของ EC-broth ที่มีให้ค่าจาก Biochem test คือ ++-- หรือ -+--

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อนำตัวอย่างบัวบกที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ มาตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์รวม coliforms และ เชื้อ *E. coli* พบว่า บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด มีปริมาณจุลินทรีย์รวมปริมาณเฉลี่ย 9.32×10^5 CFU/g., บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาดมีปริมาณจุลินทรีย์รวมปริมาณเฉลี่ย 4.73×10^5 CFU/g. และบัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า มีปริมาณเฉลี่ย 3.73×10^5 CFU/g. ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Figure 1.) ด้านปริมาณเชื้อรา พบว่า บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่ไม่มีการ

จัดการด้านความสะอาด มีปริมาณเชื้อราเฉลี่ย 3.35×10^2 CFU/g., บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาดมีปริมาณจุลินทรีย์รวมเฉลี่ย 3.13×10^2 CFU/g. และบัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีปริมาณเฉลี่ย 2.88×10^2 CFU/g. ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 1.)

ส่วนใบบัวบกจากห้างสรรพสินค้ามีปริมาณ coliform น้อยที่สุดคือ $6.25\text{x}10^2$ MPN/g รองลงมาคือตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด และตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด มีปริมาณ coliform เฉลี่ย $9.2\text{x}10^2$ MPN/g และ $9.4\text{x}10^2$ MPN/g ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนปริมาณเชื้อ *E. coli* พบว่า บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีปริมาณ *E. coli* เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ $0.48\text{x}10^2$ MPN/g. รองลงมาคือ บัวบกที่จำหน่ายในตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาด และตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด มีปริมาณ $2.36\text{x}10^2$ MPN/g. และ $2.84\text{x}10^2$ MPN/g. (Table 3.) ตามลำดับ เมื่อจำแนกเชื้อ *E.coli* โดยวิธีทางชีวเคมี พบว่า สามารถจำแนกออกมาได้ 2 ชนิดคือ typical *Enterobacteraerogenes* และ atypical *Enterobacteraerogenes*

เมื่อนำผลการศึกษาจุลินทรีย์รวม coliform ราและจุลินทรีย์รวม และ *E.coli* เทียบกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์(2553) ซึ่งกำหนดให้ผักผลไม้สด มีจำนวนจุลินทรีย์รวม/กรัม น้อยกว่า 1×10^6 จำนวนรา/กรัม น้อยกว่า 5×10^2 และจำนวน MPN *E. coli* /กรัม น้อยกว่า 1×10^2 พบว่า บัวบกที่นำมาจากแหล่งจำหน่ายทุกๆ แหล่ง มีปริมาณจุลินทรีย์รวม และปริมาณเชื้อรายังไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ ส่วนปริมาณเชื้อ *E. coli* พบว่า บัวบกที่จำหน่ายจากตลาดที่ไม่มีการจัดการด้านความสะอาด และตลาดที่มีการจัดการด้านความสะอาดมีปริมาณเชื้อเกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ ซึ่งตรงกันข้ามกับบัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าซึ่งมีปริมาณเชื้อยังไม่เกินมาตรฐานที่กำหนด (Table2-3)

Table 1. Quantity of fungi and microbial (CFU/g) of asiatic pennywort from various sources

Type of markets	Total fungi (CFU/g)	Total microbial count (CFU/g)
conventional markets	$3.35\times10^{2\,ns}$	$9.32\times10^{5\,ns}$
hygienic markets	$3.13\times10^{2\,ns}$	$4.73\times10^{5\,ns}$
supermarkets	$2.88\times10^{2\,ns}$	$3.73\times10^{5\,ns}$

means not [ns] Means not significantly different at the 5% level

Table 2. Quantity of coliform and *E. coli* (MPN/g) of asiatic pennywort from various sources

Type of markets	**coliform (MPN/g)**	***E. coli*[1] (MPN/g)**
conventional markets	$9.4\text{x}10^{2\,ns}$	$2.84\text{x}10^{2\,b}$
hygienic markets	$9.2\text{x}10^{2\,ns}$	$2.36\text{x}10^{2\,b}$
supermarkets	$6.25\text{x}10^{2\,ns}$	$0.48\text{x}10^{2\,a}$

[1]Mean followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

[ns] Means not significantly different at the 5% level

Table3. Percentage of markets found microorganism above the standard level

Type of markets[1]	Total coliform	*E. coli*
conventional markets	0	75
hygienic markets	0	75
supermarkets	0	0

สรุปผลการทดลอง

จากการนำใบบัวบกจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ มาตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีการปนเปื้อนน้อยที่สุด มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวม 3.73×10^5 CFU/g. เชื้อรา 2.88×10^2 CFU/g. coliform คือ 6.25×10^2 MPN/g. และเชื้อ *E. coli* 0.48×10^2 MPN/g. ซึ่ง บัวบกที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าบัวบกจากตลาดสดทั้งสองแบบ ดังนั้นควรล้างบัวบกทุกครั้งก่อนการบริโภคเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

เอกสารอ้างอิง

กมลรัตน์ ณ หนองคาย. 2550. สปาไทยเพื่อความงาม ผลิตภัณฑ์สปาด้วยสมุนไพรไทย. สำนักพิมพ์เกษตรธรรมชาติ พญาไท กรุงเทพฯ. หน้า 40.

กันยา หว่านฉรงค์. 2555. แบคทีเรียในอาหาร (Bacteria in Food). R&D Newsletter ฉบับที่ 19. หน้า 12-15.

กรมการค้าต่างประเทศ. 2549. การส่งออกผักและผลไม้ที่จะต้องมีหนังสือรับรองการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ Salmonella ในการส่งออก. แหล่งที่มา: http://www.ryt9.com/s/ryt9/65577

กรมการค้าต่างประเทศ. 2550. ประกาศกรมการค้าต่างประเทศ เรื่อง กำหนดชนิดหรือประเภทของผักและผลไม้ ที่ต้องมีหนังสือรับรองในการส่งออก พ.ศ. 2550, ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 55 ง, หน้า 22-24.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ . 2553.ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 . แหล่งที่มา http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/cheme/dmscguide1.pdf.

อภิชาต ศรี สอาด. 2552. เกษตรอินทรีย์ สารพันสูตรปุ๋ยอินทรีย์. สำนักพิมพ์ นาคา เขตบางแค กทม. 142 หน้า.

AOAC. 2006. AOAC Official Method 966.23-24 p. 5-6. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. Official methods of analysis of AOAC international. Maryland: AOAC international.

Sakshi, S., A. Gautam, A. Sharma & A. Batra, (2007). *Centella asiatica* (L.): A plant with immense medicinal potential but threatened. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 4, 9-17.

Thorne, R. (2007). *Centella asiatica*. Alternative Medicine Review, 12, 69-72.

ที่ ศธ 0527.07.01/ว3661

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ
และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก 65000

11 กรกฎาคม 2556

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 11

เรียน คุณสุนิตรา คามีศักดิ์

ตามที่ท่านลงทะเบียนเข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 11 ระหว่างวันที่ 30-31 กรกฎาคม 2556 ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร คณะกรรมการจัดงานฯ ได้พิจารณาผลงานวิจัยของท่านเป็นที่เรียบร้อยแล้ว และขอแจ้งให้ทราบว่า ผลงานวิจัยของท่านได้รับการคัดเลือกให้นำเสนอภาคโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 11 ดังนี้

1. รหัสผลงาน PA-16
2. ชื่อผลงาน คุณภาพทางจุลชีววิทยาของบัวบกจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ

ทั้งนี้ การนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ ขนาด 0.90 × 1.20 เมตร โดยสามารถติดโปสเตอร์ได้ตั้งแต่วันที่ 29 กรกฎาคม 2556 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินทร์ อัมพรสถิร)
คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

คณะเกษตรศาสตร์ฯ
โทรศัพท์. 055-962707
โทรสาร. 055-962709

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุนิตรา คามีศักดิ์
วัน เดือน ปีเกิด	4 ธันวาคม 2527
ที่อยู่	4 รามอินทรา 86 แยก 12-7 แขวงมีนบุรี เขตมีนบุรี กรุงเทพฯ 10510 โทร. 0-2918-9703
ประวัติการศึกษา	2549 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2556 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ความชำนาญเฉพาะด้าน	โรคของพืชสมุนไพร

ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย

พ.ศ.2550 – ปัจจุบัน ตำแหน่งนักวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

ผลงานวิจัย

สุนิตรา คามีศักดิ์ สุวรินทร์ บำรุงสุข และแสงมณี ชิงดวง. 2556. การศึกษาวิธีป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของบัวบกในระบบเกษตรอินทรีย์. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 12 วันที่ 9-12 พฤษภาคม 2556 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ

สุนิตรา คามีศักดิ์ สุวรินทร์ บำรุงสุข และแสงมณี ชิงดวง. 2556. คุณภาพทางจุลชีววิทยาของบัวบกจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ. การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 11 วันที่ 30-31 กรกฎาคม 2556 ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร