



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ประสิทธิภาพของปูนขาวต่อการยับยั้ง
เชื้อ *B. pseudomallei* (Ara⁻) ในดินนา
(The Efficacy of Lime (CaO) as Inhibitors
to *B. pseudomallei* in Soil from Rice field)

โดย นายนิสร นางามและคณะ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ: 31 พฤษภาคม 2544



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ประสิทธิภาพของปูนขาวต่อการยับยั้ง
เชื้อ *B. pseudomallei* (*Ara*⁻) ในดินนา
(The Efficacy of Lime (CaO) as Inhibitors
to *B. pseudomallei* in Soil from Rice field)

โดย นายนิศร นางามและคณะ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ: 31 พฤษภาคม 2544

สัญญาเลขที่ PPG3/01/2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ประสิทธิภาพของปูนขาวต่อการยับยั้ง
เชื้อ *B. pseudomallei* (Ara) ในดินนา
(The Efficacy of Lime (CaO) as Inhibitors
to *B. pseudomallei* in Soil from Rice field)

คณะผู้วิจัย

ผศ. นริศร นางาม* นายสรรเพชญ อังกิตติตระกูล*
นายพิทักษ์ น้อยเมล์* นายพุดพิงศ์ พงษ์พันธ์ **

*ภาควิชาสัตวแพทย์สาขารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชุดโครงการ: โรคmelioidosis (Meliodosis)

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ใคร่ขอขอบคุณ ศ. นพ. วิษณุ ธรรมลิขิตกุล ที่ปรึกษาโครงการวิจัย อ.ดร. ธนากร วงศ์วัฒนาเสถียร ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ออกแบบภาชนะใส่ดินทดลอง นายวสันต์ จันทรสนิท อ.ดร. คมกริช พิมพะภักดี ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นายระนอง ศรีพิพัฒน์ นายวรรณวร พงษ์ประจักษ์ นายรัชชัย โสจินดา นายไก่อแก้ว บับพาน นายบุญนา ตะวงส์ษา นายสิทธิเดช สกุลโพน นักศึกษาสัตวแพทย์ชั้นปีที่ 4 ที่ช่วยงานวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนสถานที่ในการศึกษาวิจัยและสุดท้ายขอขอบคุณสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

โครงการวิจัยโดยย่อ (Executive summary of proposal)

ชื่อโครงการ:

ประสิทธิผลของปูนขาว ต่อการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา

(The Efficacy of Lime (CaO) as Inhibitors to *B. pseudomallei* in Soil from Rice field)

ผู้เสนอโครงการ:

นาย นริศร นางาม (Mr. Narisorn Na-ngam)

สถานที่ทำงาน : ภาควิชาสัตวแพทยศาสตร์สาทรณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

โทร./โทรสาร. 043-364493. โทรสาร. โทร . 01-661-8432.

E-mail address: narnan@kku.ac.th

ระยะเวลาดำเนินการ : 5 เดือน

จากสิ่งแวดล้อมและการแพร่กระจาย

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคmelioidosis เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชื่อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็น Saprophytic bacteria พบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินและน้ำของถิ่นระบาดของโรคมีทั้ง Arabinose positive (Ara⁺) และ Arabinose negative (Ara⁻) แต่เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยโรคmelioidosis โคสิส มักเป็นชนิด Ara⁻ เชื้อมีชีวิตรอดอยู่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องได้นาน 8 สัปดาห์ ในโคลนที่มีน้ำท่วมขังได้นาน 7 เดือน (Blood et al., 1983) ที่อุณหภูมิ 4°C มีชีวิตรอดนานหลายเดือน และเจริญที่ pH 4.5-8 ที่อุณหภูมิ 15-42°C ในดินที่มีปริมาณน้ำ ร้อยละ 10 ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดได้ถึง 70 วัน (Tong et al., 1996) โรคนี้กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในคนและสัตว์ในเขตร้อน โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ เวียดนาม ลาว และกัมพูชา เป็นต้น เมลิออยโคสิส เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทยโรคหนึ่งซึ่งมีผู้ป่วยในแต่ละปีประมาณ 2,000-3,000 ราย พบอุบัติการณ์โรคสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราส่วนผู้ป่วย 137.9/100,000 คน โรงพยาบาลศูนย์สรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี พบผู้ป่วยปีละ 150-170 คน พบโรคมมากในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือน พ.ค.-มิ.ย. ถึงร้อยละ 75 ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็น ชาวนา-ชาวไร่ ที่ต้องสัมผัสกับดินและน้ำเป็นประจำ เชื่อว่าเชื้อเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังที่เป็นแผลหรือรอยทลอก การกินเชื้อที่ปนเปื้อนอาหารและน้ำ การหายใจ และทางเพศสัมพันธ์ (Leelarasamee, 2000; Vuddhakul et al., 1999; Wuthiekanun et al., 1995) ผู้ป่วยส่วนมากมีโรคเดิม (ร้อยละ 53) เช่น เบาหวาน ไตวาย ธาลัสซีเมีย มะเร็งเม็ดเลือดขาว ดับแฉียง เป็นต้น

จากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบสูงกว่าภาคอื่น ๆ ของประเทศ รวมทั้งความหนาแน่นของเชื้อในดิน ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนผู้

คิดเชื่อนี้ที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาดังกล่าวไม่อาจบ่งชี้การปรากฏของเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคเมลิออยโดสิส (Leelarasamee, 2000; Vuddhakul. et al., 1999; Smith et al., 1995) เชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคสามารถแยกได้จากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือถึงร้อยละ 75 (Wathiekanun, 1995) ปูนขาว (Lime or Calcia) มีปริมาณมากในประเทศไทยโดยเฉพาะในจังหวัดสระบุรี เกษตรกรสามารถหาซื้อได้ง่าย และมีราคาถูก เมื่อถูกความชื้นหรือน้ำจะให้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) และมีสภาพเป็นด่างซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ ในประเทศไทยมีการใช้ปูนขาวเพื่อฆ่าเชื้อในฟาร์มปศุสัตว์มานาน นอกจากนี้ยังพบว่าเกษตรกรชาวสวนมักใช้ปูนขาวโรยในแปลงดินเตรียมเพาะปลูกเพื่อปรับสภาพของดิน และทำลายตัวอ่อนของศัตรูพืชบางชนิดในดิน มีรายงานศึกษาการใช้ปูนขาวปรับสภาพความเป็นกรดของดินในแปลงหญ้าเลี้ยงปศุสัตว์ในขนาด 4, 8, 12 ตัน/เฮกตาร์ (6.5 ไร่) ร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมี NKP พบว่าสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมี เพิ่มแคลเซียมในดิน และเพิ่มผลผลิตหญ้าในระยะเวลา 10 ปี (Stevens and Laughlin, 1996) และ Johnson and Kaneene (1999) ได้ศึกษาปัจจัยเสี่ยงจากสิ่งแวดล้อมและการแพร่กระจายของโรคพาราทูเบอร์คิวโรสิส (Paratuberculosis) ในฝูงโคนม 121 ฟาร์มในรัฐมิชิแกน ฟาร์มที่ตรวจพบโรคได้ใช้ปูนขาวโรยในแปลงหญ้าพบว่าความชุกของโรคในฝูงโคนมลดลง 72% แต่การศึกษาวิจัยผลของปูนขาวในการทำลายเชื้อได้มาน้อยเท่าใดยังไม่มีรายงาน การศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งจะศึกษาระดับความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ ของปูนขาวในการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินนา เพื่อแสวงหาความรู้เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมป้องกันโรค และกำจัดเชื้อโรคเมลิออยโดสิสในสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์ที่จำเพาะของโครงการ

1. ศึกษาระดับความเข้มข้นปูนขาวที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา
2. ศึกษา pH ที่มีผลยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา
3. ระยะเวลาที่ปูนขาวสามารถทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา
4. ศึกษารูปแบบวิธีการใช้ปูนขาวเพื่อทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. จัดหาภาชนะพลาสติกขนาดกว้าง 35 ซม. ยาว 40 ซม. และลึก 35 ซม. สำหรับใส่ดินทดลอง จำนวน 45 อัน
 2. เตรียมดินจากนาข้าวที่ไม่มีเชื้อ *B.pseudomallei* นำดินมาผสมกับเชื้อ Ara⁻ *B.pseudomallei* ในขนาด 10^5 cfu./มล. แล้วนำดิน 3 ก. ไปเพาะหาเชื้อว่ามีเชื้อ *B.pseudomallei* จริง
 3. นำดินที่มีเชื้อ Ara⁻ *B.pseudomallei* ไปดำเนินการต่อและใส่ในภาชนะที่เตรียมไว้ทั้ง 45 อัน แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้
- กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมคือดินที่ไม่มีปูนขาวจำนวน 1 อัน

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ใส่ปุ๋ยขาวผสมกับดินในความเข้มข้น 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% และ 50% จำนวน 11 อัน

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ใส่ปุ๋ยขาวผสมกับดินในความเข้มข้น 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% และ 50% จำนวน 11 อัน

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่โรยปุ๋ยขาวบนผิวดินขนาด 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 กก./ตร.ม. จำนวน 11 อัน

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่โรยปุ๋ยขาวบนผิวดินขนาด 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 กก./ตร.ม. จำนวน 11 อัน

4. รดน้ำในดินให้ชุ่มวันละครั้ง และวัด pH ของดินทุกกลุ่มวันละครั้ง
5. นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 1 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้งติดต่อกันประมาณ 7 วัน และสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 1 เดือน
6. นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 2 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้งติดต่อกันประมาณ 7 วัน และสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 1 เดือน
7. นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 3 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้ง เมื่อไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จากดิน จะเติมเชื้อ *B. pseudomallei* ลงในดินอีกในขนาดเดิม ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนกว่าจะเพาะได้เชื้อ จากดินใน 24 ชั่วโมงต่อมา
8. นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 4 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้งติดต่อกันประมาณ 7 วัน และสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 1 เดือน
9. นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 5 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้ง เมื่อไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จากดิน จะเติมเชื้อ *B. pseudomallei* ลงในดินอีกในขนาดเดิม ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนกว่าจะเพาะได้เชื้อ จากดินใน 24 ชั่วโมงต่อมา

10. วิธีการตรวจวิเคราะห์

-pH meter วัดความเป็น กรด-ด่างของดินและน้ำ

-เพาะแยกหาจำนวนเชื้อในดินในห้องปฏิบัติการใน TBSS-C 20 & Asdown's agar

การวัดผล (Outcome measurement)

- ปริมาณปุ๋ยขาวที่โรยต่อพื้นที่ที่มีผลจำนวนเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- สัดส่วนปุ๋ยขาวที่ผสมในดินที่มีผลต่อจำนวนเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- ระดับความลึกชั้นดินที่มีผลจำนวนต่อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- ระดับ pH ที่มีผลยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- ระยะเวลาที่ทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน

แผนการวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis plan):

รวบรวมข้อมูลที่ได้จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและแบบบันทึกเสริมที่ผู้วิจัยจัดทำขึ้นเองแล้วนำมาวิเคราะห์

แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการวิจัย 5 เดือน

ระยะเวลา (เดือน)	แผนงาน	ผลที่ได้
0.5	-เตรียมพื้นที่/ดินสำหรับทดลอง -เตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี -เตรียมเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> Ara ⁻	-เตรียมงานและผู้ร่วมวิจัยให้พร้อมที่จะดำเนินการวิจัยได้
4	-เก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจหาเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> และวัด pH ดิน	-ประสิทธิภาพของปูนขาวในการยับยั้งเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>
0.5	-เขียนรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ -นำเสนอรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์	-รายงานผลการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบประโยชน์การใช้ปูนขาวในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อหรือทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา
2. ทราบ pH ที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
3. ระยะเวลาที่ปูนขาวสามารถทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
5. สามารถนำปูนขาวซึ่งเป็นวัสดุจากธรรมชาติที่หาได้ง่ายและราคาถูกไปประยุกต์ใช้เป็นสารกำจัดเชื้อในดินของพื้นที่ที่มีการเกิดโรคmelioidosis ได้

ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่จะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

The Efficacy of Lime (CaO) as Inhibitors to *B. pseudomallei* Ara⁻ in Soil from Rice Field.

- Interpret the concentrated levels of lime as the inhibitors to *B. pseudomallei* Ara⁻ in soil
- Interpret the levels of pH for suppression of *B. pseudomallei* Ara⁻ in soil
- Interpret how long lime inhibits *B. pseudomallei* Ara⁻ in soil
- Apply these findings for eradication *B. pseudomallei* Ara⁻ in soil

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของปูนขาวต่อการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) ในดินนา ได้แบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม โดยทุกกลุ่มใส่เชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) ขนาด 10^5 cfu/ml แล้วรดน้ำให้ชุ่มทุกวัน เก็บตัวอย่างดิน 3 กรัม/น้ำกลั่น 2 มล. ที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. จำนวน 11 ครั้งๆ ละ 7 ตัวอย่างในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, และ 35 ยกเว้นกลุ่มที่ 3 เก็บตัวอย่างถึงวันที่ 40 กลุ่มแรกคือกลุ่มควบคุมดินมีค่า pH เฉลี่ย 4.76-5.90 ตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 10, 10, 11, 11, 11, 9, และ 11 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับและ 6, 7, 5, 7, 7, 7, 7, 7, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2 ผสมปูนขาวในดิน 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, และ 50% ดินมีค่า pH เฉลี่ย 7.63, 8.17, 8.42, 8.72, 8.97, 7.27, 8.74, 9.04, 9.06, 9.37, และ 7.49 ที่ปูนขาว 2.50% ตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 1, 2, 0, 0, 0, 0, และ 0 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับและ 1, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, และ 1 ตัวอย่าง/ครั้ง ตามลำดับ ที่ปูนขาว 5.0% ตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 2, 1, 0, 1, 0, 0, และ 2 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับและ 2, 0, 0, 0, 3, 0, 0, 1, 0, 0, และ 0 ตัวอย่าง/ครั้ง ตามลำดับ ที่ปูนขาว 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, และ 45% ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ใน 24 ชม. ถัดมา ที่ปูนขาว 25.0% ตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 4, 6, 2, 8, 5, 5, และ 6 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับและ 2, 1, 0, 4, 2, 1, 4, 6, 6, 6, และ 4 ตัวอย่าง/ครั้ง ตามลำดับและที่ปูนขาว 50% ตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 2, 1, 4, 2, 3, 4, และ 4 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับและ 0, 2, 3, 2, 2, 0, 0, 2, 0, 5, และ 4 ตัวอย่าง/ครั้ง ตามลำดับ อาจเนื่องจากปูนขาวมีคุณภาพไม่ดีและสภาพดินมีดินเหนียวปนมามากซึ่งจะทำให้การแตกตัวของปูนขาวไม่ดี

กลุ่มที่ 3 ทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 แต่ถ้าตรวจไม่พบเชื้อจะใส่เชื้อใหม่จนตรวจพบใน 24 ชม. ต่อมา พบว่าปูนขาวส่วนใหญ่ไม่ออกฤทธิ์เนื่องจากปูนขาวคุณภาพไม่ดีและสภาพเป็นดินเหนียวปนมามากซึ่งปูนขาวจะออกฤทธิ์ได้ไม่ดี มีค่า pH เฉลี่ย 7.24, 7.16, 7.19, 7.52, 7.29, 7.34, 7.54, 8.0, 7.82, 8.28, และ 7.64 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามปูนขาวที่ 20%, 35%, และ 45% เชื้อมีแนวโน้มลดลงและตรวจไม่พบในวันที่ 40, 35, และ 35 ตามลำดับ

กลุ่มที่ 4 ได้ใส่เชื้อเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1, 2, และ 3 โดยโรยปูนขาวบนผิวดินขนาด 0.25, 0.50, 1.0, 1.50, 2.0, 2.50, 3.0, 3.50, 4.0, 4.50, และ 5.0 กก./ตรม. แล้วรดน้ำให้ชุ่มทุกวันพบว่าปูนขาวไม่ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อเนื่องจากปริมาณน้ำที่รดไม่เพียงพอต่อการแตกตัวทางเคมีโดยมีค่า pH เฉลี่ย 6.26, 5.65, 6.63, 5.87, 6.11, 6.81, 6.24, 6.44, 6.74, 6.73, และ 6.87 ตามลำดับ และในกลุ่มที่ 5 ทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 4 แต่ถ้าตรวจไม่พบเชื้อจะใส่เชื้อใหม่จนตรวจพบใน 24 ชม. ต่อมาซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 4 โดยมีค่า pH เฉลี่ย 6.47, 5.99, 6.65, 6.38, 6.49, 6.36, 6.67, 6.43, 6.46, 6.83, และ 6.86 ตามลำดับ

Abstract

The efficacy study of lime as inhibitors to *B. pseudomallei* (Ara-) in soil from rice field was divided into 5 groups of specimen collection. All groups added *B. pseudomallei* (Ara-) 10^5 cfu/ml. and sprayed with water in everyday and took the soil specimens 3 g/2 ml. DW at the depth; 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 cm. The times for collection samples were 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, and 35 days but in group 3 extended to 40 days. First group was control group, averages of soil pH were 4.76-5.90. The result of *B. pseudomallei* (Ara-) isolation for 10, 10, 11, 11, 11, 9, and 11 specimens of soil/each dept, and 6, 7, 5, 7, 7, 7, 7, 7, 7, and 7 specimens of soil/day, respectively were positive. The 2nd group, soil was mixed with lime; 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, and 50%. The averages of soil pH were 7.63, 8.17, 8.42, 8.72, 8.97, 7.27, 8.74, 9.04, 9.06, 9.37, and 7.49, respectively. For 2.5% of lime, the result of *B. pseudomallei* (Ara-) isolation for 1, 2, 0, 0, 0, 0, and 0 specimens of soil/each dept and 1, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, and 1 specimens of soil/day, respectively were positive. For 5.0% of lime in soil, the result of *B. pseudomallei* (Ara-) isolation for 2, 1, 0, 1, 0, 0, and 2 specimens of soil/each dept, and 2, 0, 0, 0, 3, 0, 0, 1, 0, 0, and 0 specimens of soil/day, respectively were positive. For lime at level 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, and 45% could not isolate *B. pseudomallei* (Ara-) in following days. However containers of soil with lime 25% and 50% had a low reaction of lime, probably caused by low quality of lime or much sticky soil inhibited lime reaction.

The 3rd group was similar the 2nd group but when could not isolate *B. pseudomallei* (Ara-), would add organisms at the same concentrate until could find these in the following day. All these had no reaction of lime, suspected all containers of soil were mixed much sticky soil that inhibited chemical reaction of lime or low quality of lime. The averages of soil pH were 7.24, 7.16, 7.19, 7.52, 7.29, 7.34, 7.54, 8.0, 7.82, 8.28, and 7.64, respectively. However lime at the level 20%, 35%, and 45% were showed inclining to eradicate *B. pseudomallei* (Ara-) at 40, 35, and 35 days of experimentation. The 4th and 5th groups were added organisms in soil like the 1st, 2nd, and 3rd groups but spread lime on surface at level; 0.25, 0.50, 1.0, 1.50, 2.0, 2.50, 3.0, 3.50, 4.0, 4.50, and 5.0 kg/m². The both groups were no response for killing *B. pseudomallei* (Ara-) because they had not enough water to activate the chemical reaction of lime. Soil pH of 4th group was 6.26, 5.65, 6.63, 5.87, 6.11, 6.81, 6.24, 6.44, 6.74, 6.73, and 6.87, respectively and the 5th group was 6.47, 5.99, 6.65, 6.38, 6.49, 6.36, 6.67, 6.43, 6.46, 6.83, and 6.86, respectively.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
โครงการวิจัยโดยย่อ	4
บทคัดย่อภาษาไทย	8
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)	9
สารบัญเรื่อง	10
บทที่ 1: บทนำ	
1.1 ความสำคัญและเหตุผลในการทำวิจัย	11
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	12
1.3 ขอบเขตการวิจัย	12
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	12
บทที่ 2: ระเบียบวิธีวิจัย	
2.1 รูปแบบการวิจัย	13
2.2 สถานที่ทำวิจัย	13
2.3 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	13
2.4 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย	13
2.5 ขั้นตอนการทำวิจัย	14
บทที่ 3: ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	
3.1 ผลการทดลอง	17
3.2 วิเคราะห์ผลการทดลอง	35
3.3 ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย	36
3.4 ปัญหาและอุปสรรคในการวิจัย	36
3.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	39
ตารางที่ 11	40
ตารางที่ 12	43
ตารางที่ 13	75
ตารางที่ 14	108
ตารางที่ 15	139

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและและจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาวิจัย (Rational for proposing the project)

โรคมะลิออยโคสเกิดจากเชื้อแบคทีเรียกรัมลบชื่อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็น Saprophytic bacteria พบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินและน้ำของดินระบาดของโรคมะลิออย Arbinose positive (Ara^+) และ Arabinose negative (Ara^-) แต่เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยโรคมะลิออยโคส มักเป็นชนิด Ara^- เชื้อมีชีวิตรอดอยู่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องได้นาน 8 สัปดาห์ ในโคลนดมที่มีน้ำท่วมขังได้นาน 7 เดือน (Blood et al., 1983) ที่อุณหภูมิสูงเย็น ($4^\circ C$) มีชีวิตรอดนานหลายเดือน และเจริญที่ pH 4.5-8 ที่อุณหภูมิ $15-42^\circ C$ ในดินที่มีปริมาณน้ำ ร้อยละ 10 ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดได้ถึง 70 วัน (Tong et al., 1996) โรคนี้อาศัยอยู่ทั่วไปทั้งในคนและสัตว์ในเขตร้อน โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ เวียดนาม ลาว และกัมพูชา เป็นต้น มะลิออยโคสเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทยโรคหนึ่งซึ่งมีผู้ป่วยในแต่ละปีประมาณ 2,000-3,000 ราย พบอุบัติการณ์โรคสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราส่วนผู้ป่วย 137.9/100,000 คน โรงพยาบาลศูนย์สรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี พบผู้ป่วยปีละ 150-170 คน พบโรคมะลิออยในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือน พ.ค.-มิ.ย. ถึงร้อยละ 75 ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็น ชาวนา-ชาวไร่ ที่ต้องสัมผัสกับดินและน้ำเป็นประจำ เชื่อว่าเชื้อเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังที่เป็นแผลหรือรอยทลอก การกินเชื้อที่ปนเปื้อนอาหารและน้ำ การหายใจ และทางเพศสัมพันธ์ (Leelarasamee, 2000; Vuddhakul et al., 1999; Wuthiekanun et al., 1995) ผู้ป่วยส่วนมากมีโรคเดิม (ร้อยละ 53) เช่น เบาหวาน ไตวาย ธาลัสซีเมีย มะเร็งเม็ดเลือดขาว ดับแฉัง เป็นต้น

จากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินของภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบสูงกว่าภาคอื่น ๆ ของประเทศ รวมทั้งความหนาแน่นของเชื้อในดิน ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนผู้ติดเชื้อที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาดังกล่าวไม่อาจบ่งชี้การปรากฏของเชื้อ *B. pseudomallei* Ara^- ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคมะลิออยโคส (Leelarasamee, 2000; Vuddhakul. et al., 1999; Smith et al., 1995) เชื้อ *B. pseudomallei* Ara^- ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคสามารถแยกได้จากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือถึงร้อยละ 75 (Wathiekanun, 1995) ปูนขาว (Lime or Calcia) มีปริมาณมากในประเทศไทยโดยเฉพาะในจังหวัดสระบุรี เกษตรกรสามารถหาซื้อได้ง่าย และมีราคาถูก เมื่อถูกความชื้นหรือน้ำจะให้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) และมีสภาพเป็นด่างซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ ในประเทศไทยมีการใช้ปูนขาวเพื่อฆ่าเชื้อในฟาร์มปศุสัตว์มานาน นอกจากนี้ยังพบว่าเกษตรกรชาวสวนมักใช้ปูนขาวโรยในแปลงดินเตรียมเพาะปลูกเพื่อปรับสภาพของดิน และทำลายตัวอ่อนของศัตรูพืชบางชนิดในดิน มีรายงานการใช้ปูนขาวปรับสภาพความเป็น

กรคของดินในแปลงหญ้าเลี้ยงปศุสัตว์ในขนาด 4, 8, 12 คัน/เฮกตาร์ (6.5 ไร่) ร่วมกับการใช้ปุ๋ย NKP พบว่าสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมี เพิ่มแคลเซียมในดิน และเพิ่มผลผลิตหญ้าในระยะเวลา 10 ปี (Stevens and Laughlin, 1996) และ Johnson and Kaneene (1999) ได้ศึกษาปัจจัยเสี่ยงจากสิ่งแวดล้อมและการแพร่กระจายของโรคพาราทูเบอร์คิวโรสิส (Paratuberculosis) ในฝูงโคนม 121 ฟาร์ม ในรัฐมิชิแกน ฟาร์มที่ตรวจพบโรคได้ใช้ปูนขาวโรยในแปลงหญ้าพบว่าความชุกของโรคพาราทูเบอร์คิวโรสิส (Paratuberculosis) ในฝูงโคนมลดลง 72% แต่การศึกษาวิจัยผลของปูนขาวในการทำลายเชื้อได้มากน้อยเท่าใดยังไม่มีรายงาน การศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งจะศึกษาระดับความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ ของปูนขาวในการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินนา เพื่อแสดงหาความรู้เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมป้องกันโรค และกำจัดเชื้อโรคเมลิออยโคสิสในสิ่งแวดล้อม

1.2 วัตถุประสงค์ที่จำเพาะของโครงการ (Specific objectives)

- 1.2.1 ศึกษาระดับความเข้มข้นปูนขาวที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา
- 1.2.2 ศึกษา pH ที่มีผลยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา
- 1.2.3 ระยะเวลาที่ปูนขาวสามารถทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา
- 1.2.4 ศึกษารูปแบบวิธีการใช้ปูนขาวเพื่อทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดินนา

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการวิจัยเฉพาะในดินนาที่ซื้อจากเกษตรกรรมข้างทางสายขอนแก่น-มหาสารคามโดยจุดดินในบริเวณที่ลุ่มที่มีความชื้นใต้ดินสูงระดับ 35 ซม. ขาว 40 ซม. และลึก 35 ซม. จำนวน 50 ถัง ตรวจการตรวจแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกถัง นำดินทั้งหมดไปอบให้แห้ง ทบให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักใส่ในถังทดลองให้เต็มทุกถังแล้วแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม กลุ่มผสมปูนขาวในดิน 2 กลุ่ม และกลุ่มโรยปูนขาว 2 กลุ่ม การผสมเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara⁻) ใช้ความเข้มข้น 10^5 cfu./มล. ผสมเชื้อในดินที่ละชั้นห่างกันชั้นละ 5 ซม. โดยทำหลังผสมปูนขาวในดินโดยคืดค่อน้ำหนักดินที่อบแห้งแล้วรดน้ำให้ชุ่ม ส่วนการโรยปูนขาวคืดค่อพื้นที่ผิวดินส่วนบนของถังทำหลังผสมเชื้อในดินแล้วรดน้ำให้ชุ่ม สำหรับปูนขาวซื้อจากร้านจำหน่ายวัสดุก่อสร้างในอำเภอเมืองขอนแก่น ทำการเก็บตัวอย่างดิน 3 กรัม/น้ำกลั่น 2 มล. มาตรวจแยกเชื้อและวัดความเป็นกรด-ด่างของดินในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, และ 35 ที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม.

1.4 ผลได้/ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected outputs and outcomes)

- 1.4.1 ทราบประโยชน์การใช้ปูนขาวในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- 1.4.2 ทราบ pH ที่มีผลยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- 1.4.3 ทราบระยะเวลาที่ปูนขาวสามารถทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน

1.4.4 สามารถนำปูนขาวไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดเชื้อในดินของพื้นที่ที่มีเชื้อก่อโรคและการระบาดของโรคมลิวเรียโคสิสได้

1.4.5 สามารถใช้ปูนขาวซึ่งเป็นวัตถุดิบในธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกำจัดเชื้อที่ก่อโรคได้

บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยประยุกต์ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการจัดการทรัพยากรธรรมชาติ สิ่งแวดล้อมและสวัสดิการสาธารณะ

2.2 สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.3 ระยะเวลาทำวิจัย

5 เดือน (มกราคม 2544-พฤษภาคม 2544)

2.4 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

-ถุงมือ 7 คู่	-ผ้าปิดจมูก 6 คู่
-กระดาษชำระ 24 ม้วน	-สำลี 4 ม้วนใหญ่
-ผ้าก๊อซ 2 ม้วนใหญ่	-กระดาษ A4 2 รีม
-หาวฟิลสำหรับปิดหลอดทดลอง 1 ม้วน	-ถุงขยะ 10 แพ็ค
-อุปกรณ์การเขียน/สมุดบันทึก/สติ๊กเกอร์	-แผ่นเก็บข้อมูล 1 คู่
-ฟิล์มและล้างอัดรูป 4 ม้วน	-แก๊ส 2 ถัง
-ตัวอย่างดินนา 50 ถัง	-ปูนขาว 200 กก.
-น้ำยาฆ่าเชื้อ 5 แกลลอน	-อุปกรณ์ชุดดินและผสมดิน 5 ชุด
-ถังสังกะสีขนาด 0.35 x 0.40 x 0.35 ม. จำนวน 45 ถัง	-ถาดเหล็กปลอดสนิม 20 อัน
-หลอดพลาสติกขนาด 15 มล. จำนวน 2,000 หลอด	-ขวดแก้วขนาด 1,000 มล. 20 ขวด
-แร็คสำหรับวางหลอดทดลองจำนวน 30 อัน	-ขวดแก้วขนาด 500 มล. 15 ขวด
-ขวดฟาสท์ขนาด 1000 มล. จำนวน 50 อัน	-จานเพาะเชื้อ 800 อัน
-หลอดทดลองขนาด 16x 150 มล. จำนวน 2,000 หลอด	-เครื่องวัด pH ในดิน 2 เครื่อง
-ตราซัง 3 เครื่อง	-ช้อนเหล็กคัดสาร 20 อัน
-ไม้บันทึกผล 10 อัน	-ถุงพลาสติกทนร้อน 10 แพ็ค

- Incubators 42°C และ 37°C
- กล้องถ่ายภาพ
- Loop เขี่ยเชื้อ
- Autoclave 2 เครื่อง
- น้ำกลั่น pH 7.2
- รถเข็นเก็บตัวอย่าง 2 คัน
- กะละมังผสมดิน 30 ใบ
- บัวรดน้ำ 5 อัน
- ท่อ พี วี ซี เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ยาว 35 ซม. 45 อัน
- Threonine basal salt solution (TBSS)
- Triple Sugar Iron Agar (TSI)
- Lysine broth
- OF-Glucose, Lactose, Maltose, Mannose, Fructose, และ Mannitol
- อัลกอฮอล์ 95% และ 70%
- Vertex Mixer 2 เครื่อง
- Hot Oven 2 เครื่อง
- Laminar Air Flow System
- ชุดเครื่องกรองแบคทีเรีย 2 ชุด
- ตะเกียงอัลกอฮอล์ 10 อัน
- ถังใส่น้ำ 6 ใบ
- ถังใส่น้ำกลั่นขนาด 20 ลิตร 3 ใบ
- ถังขยะ 4 ใบ
- Modified Asdown's agar
- Motility Nitrate Medium
- Citrate Agar

2.5 ขั้นตอนการทำวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย (Research methodology&Procedures)

2.5.1 รูปแบบการวิจัย (Study design): การวิจัยแบบทดลอง

2.5.2 ประชากรที่ศึกษา และสถานที่ศึกษาวิจัย (study subjects or study organisms or study materials): เชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ และ ปุ้นขาว

2.5.3 วิธีการวิจัย (Study procedures)

2.5.3.1 จัดหาภาชนะพลาสติกขนาดกว้าง 35 ซม. ยาว 40 ซม. และลึก 35 ซม.

สำหรับใส่ดินทดลอง จำนวน 45 อัน

2.5.3.2 เตรียมดินจากนาข้าวที่ไม่มีเชื้อ *B.pseudomallei* โดยอบให้แห้งด้วย Hot Oven ที่ 180°C นาน 2 ชม.

2.5.3.3 นำดินมาผสมกับเชื้อ Ara⁻ *B.pseudomallei* ในขนาด 10⁵ cfu./มล. แล้วนำดิน 3 ก. ไปเพาะหาเชื้อว่ามีเชื้อ *B.pseudomallei* จริง

2.5.3.4 นำดินที่มีเชื้อ Ara⁻ *B.pseudomallei* ไปดำเนินการต่อโดยใส่ในภาชนะใส่ดินที่เตรียมไว้ทั้ง 45 อัน แล้วแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

-กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมคือดินที่ไม่มีปุ้นขาวจำนวน 1 อัน

-กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ใส่ปุ้นขาวผสมกับดินในความเข้มข้น 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% และ 50% จำนวน 11 อัน

-กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ใส่ปุ้นขาวผสมกับดินในความเข้มข้น 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% และ 50% จำนวน 11 อัน

-กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่โรยปูนขาวบนผิวดินขนาด 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 กก./ตร.ม. จำนวน 11 อัน

-กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่โรยปูนขาวบนผิวดินขนาด 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 กก./ตร.ม. จำนวน 11 อัน

2.5.3.5 รดน้ำในดินให้ชุ่มวันละครั้ง

2.5.3.6 วัด pH ของดินทุกกลุ่มวันละครั้ง

2.5.3.7 นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 1 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้งติดต่อกันประมาณ 7 วัน และสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 1 เดือน

2.5.3.8 นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 2 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้งติดต่อกันประมาณ 7 วัน และสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 1 เดือน

2.5.3.9 นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 3 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้ง เมื่อไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จากดิน จะเติมเชื้อ *B. pseudomallei* ลงในดินอีกในขนาดเดิม ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนกว่าจะเพาะได้เชื้อจากดินใน 24 ชั่วโมงต่อมา

2.5.3.10 นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 4 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้งติดต่อกันประมาณ 7 วัน และสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 1 เดือน

2.5.3.11 นำดินปริมาณ 3 ก. จากทุกกลุ่มที่ 5 ที่ความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ซม. ไปเพาะหาเชื้อ *B. pseudomallei* วันละครั้ง เมื่อไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จากดิน จะเติมเชื้อ *B. pseudomallei* ลงในดินอีกในขนาดเดิม ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนกว่าจะเพาะได้เชื้อจากดินใน 24 ชั่วโมงต่อมา

2.5.4 วิธีการเก็บตัวอย่างตรวจ

2.5.4.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

- | | |
|---|---------------------------------|
| -พลั่วขุดดินขนาดเล็ก 10 อัน | -ช้อนตักดินเหล็กปลอดสนิม 20 อัน |
| -แอลกอฮอล์ 95% และ 70% | -ตะเกียงแอลกอฮอล์ 2 อัน |
| -น้ำยาฆ่าเชื้อ | -ไม้ขีดไฟ |
| -หลอดพลาสติกที่ปลอดเชื้อขนาด 15 x 150 มล. พร้อมแรควางหลอด | |
| -ภาชนะปลอดสนิม 1 ใบ | -ถังใส่น้ำ 2 ใบ |
| -รถเข็น 1 คัน | -ถุงมือชนิดใช้แล้วทิ้ง |
| -ผ้าปิดจมูกชนิดใช้แล้วทิ้ง | -น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 มล./หลอด |

-ไฟฉาย 2 อัน

-ไม้บันทึก 10 อัน

2.5.4.2 วิธีเก็บตัวอย่างจากถังใส่ดินทดลอง

คิงทอ พี วี ซี ที่ฝังไว้ออกจะเกิดหลุมลึกในแนวตั้งจากผิวดินถึงก้นถังขนาดหลุมมีเส้นผ่าศูนย์กลางกว้าง 6 นิ้ว กรณีดินพังลงมากที่หลุมจะใช้ฟลั่วที่สะอาดตักดินออก วางไม้บันทึกลงในหลุมเพื่อหาระยะความลึกของชั้นดิน ใช้ช้อนตักดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตักดิน 3 กรัม ที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. แล้วใส่ในหลอดทดลองพลาสติกที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2 มล. โดยสังเกตปริมาตรน้ำกลั่นเพิ่มเป็น 5 มล. แล้วนำมาเขย่าด้วย Vertex Mixer ใช้ไปเปิดพลาสติกใช้แล้วทิ้งชนิดกะเปาะขนาด 2 มล. คูลน้ำส่วนบนลงใน TBSS เพื่อนำเข้าตู้บ่มที่ 42°C นาน 2 วัน ส่วนดินที่เหลือในหลอดจะนำไปวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.5.5 วิธีการเพาะแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2.5.5.1 การแยกเชื้อจากดิน

หลังจากนำตัวอย่างดินที่ใส่ในน้ำกลั่นเขย่าด้วย Vertex Mixer ใช้ไปเปิดพลาสติกใช้แล้วทิ้งชนิดกะเปาะขนาด 2 มล. คูลน้ำส่วนบนลงใน TBSS แล้วนำเข้าตู้บ่มที่ 42°C นาน 2 วัน ใช้หัวเข็มเชื้อแตะบนผิว TBSS จำนวน 2 ครั้งลงใน Ashdown medium แล้วนำไปบ่มที่ 37°C นาน 3 วันแล้วตรวจสอบลักษณะของโคโลนีของเชื้อ

2.5.5.2 การวินิจฉัยเชื้อ

ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบน Ashdown medium จะมีลักษณะสีม่วง สีม่วงจาง หรือชมพู-ม่วงและขนาดเล็กน้อยถึงมากมีกลิ่นเฉพาะคล้ายกลิ่นดินหลังฝนตกใหม่ สำหรับการทดสอบเชื้อทางชีวเคมีโดยเชื้อ *B. pseudomallei* จะให้ผล A/N บน TSI สร้าง Oxidase สามารถเคลื่อนที่ได้ใน Motility medium สามารถใช้ Citrate เปลี่ยนไนเตรท (Nitrate) เป็นไนไตรท์ (Nitrite) และให้แก๊สไนโตรเจน ให้ผลบวกกับการทดสอบ OF-glucose, lactose, maltose, mannose, fructose, และ mannitol และ ให้ผลบวกกับการทดสอบ Arginine dihydrolase

2.5.6 วิธีการตรวจวิเคราะห์

-pH meter วัดความเป็น กรด-ด่างของดิน

-เพาะแยกหาจำนวนเชื้อในดินโดยใช้ TBSS-C 20 & Asdown's agar

2.5.7 การวัดผล (Outcome measurement)

- ปริมาณปูนขาวที่โรยต่อพื้นที่ที่มีผลจำนวนเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- สัดส่วนปูนขาวที่ผสมในดินที่มีผลต่อจำนวนเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- ระดับความลึกชั้นดินที่มีผลจำนวนต่อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- ระดับ pH ที่มีผลยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน
- ระยะเวลาที่ทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* Ara⁻ ในดิน

2.5.8 แผนการวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis plan):

รวบรวมข้อมูลที่ได้จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและแบบบันทึกเสริมที่ผู้วิจัยจัดทำขึ้นเองแล้วนำมาวิเคราะห์สรุปผลการทดลอง

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.1 ผลการทดลอง

จากตารางที่ 1 คินนาที่ซื้อจากนาของเกษตรกร 3 แหล่งในเขตจังหวัดขอนแก่น (เส้นทางขอนแก่น-มหาสารคาม) แหล่งแรกคือกลุ่มที่ 1 และ 5 คินมีลักษณะร่วนปนทราย แหล่งที่ 2 คือกลุ่มที่ 2 และ 3 คินมีลักษณะเป็นร่วนปนทรายและดินเหนียวปนมากกว่าเป็นดินร่วนตามลำดับ และแหล่งที่ 3 คือกลุ่มที่ 4 คินมีลักษณะร่วนปนทราย โดยทั้ง 3 แหล่งอยู่ใกล้แหล่งน้ำธรรมชาติมีความชุ่มชื้นสูง ผลการตรวจแยกเชื้อ *B. pseudomallei* จากคินตัวอย่างไม่พบเชื้อนี้ในกลุ่มที่ 1 และ 4 ส่วนในกลุ่มที่ 2, 3, และ 5 สามารถตรวจแยกเชื้อนี้จากคินตัวอย่างได้จำนวนร้อยละ 54.55, 9.09, และ 18.18 ตามลำดับ สำหรับความเป็นกรด-ด่างของคิน (ตารางที่ 2) กลุ่มที่ 1 มี pH เฉลี่ย 4.24 กลุ่มที่ 2 มี pH ก่อนทดลองเฉลี่ย 5.13 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 8.93 กลุ่มที่ 3 มี pH ก่อนทดลองเฉลี่ย 5.39 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.49 และกลุ่มที่ 5 มี pH ก่อนทดลองเฉลี่ย 4.79

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมโดยผสมเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) คินมีค่า pH ตลอดการทดลอง 35 วันอยู่ระหว่าง 4.76-5.90 ที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 10, 10, 11, 11, 11, 9, และ 11 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 6, 7, 5, 7, 7, 7, 7, 7, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 3, 11, รูปที่ 1, 2)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ใส่เชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) และผสมปูนขาวที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2.50, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 45.0, และ 50.0 คินก่อนทดลองมีค่า pH เฉลี่ย 5.13 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 8.93

-คินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 2.50 คินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 6.20 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.93 ตลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.64, 7.65, 7.67, 7.65, 7.60, 7.61, และ 7.60 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 1, 2, 0, 0, 0, 0, และ 0 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 1, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, และ 1 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-คินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 5.0 คินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.09 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 8.50 ตลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH

เฉลี่ย 8.16, 8.18, 8.27, 8.18, 8.22, 8.18, และ 8.0 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 2, 1, 0, 1, 0, 0, และ 2 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 2, 0, 0, 0, 3, 0, 0, 1, 0, 0, และ 0 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 10.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.40 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 8.61 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 8.30, 8.40, 8.48, 8.46, 8.41, 8.61, และ 8.30 ตามลำดับ หลังจากผสมปูนขาว 24 ชม. ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 15.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.40 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 8.90 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 8.84, 8.80, 8.34, 8.79, 8.79, 8.88, และ 8.71 ตามลำดับ หลังจากผสมปูนขาว 24 ชม. ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 20.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 6.0 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 10.12 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 9.02, 9.05, 9.07, 9.03, 8.96, 8.91, และ 8.75 ตามลำดับ หลังจากผสมปูนขาว 24 ชม. ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 25.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.0 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.25 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.24, 7.25, 7.28, 7.27, 7.23, 7.36, และ 7.23 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 4, 6, 2, 8, 5, 5, และ 6 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 2, 1, 0, 4, 2, 1, 4, 6, 6, 6, และ 4 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 30.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.20 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 9.46 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 8.64, 8.74, 8.78, 8.76, 8.87, 8.63, และ 8.79 ตามลำดับ หลังจากผสมปูนขาว 24 ชม. ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 35.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.20 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 9.81 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 9.11, 8.99, 8.98, 9.07, 9.09, 9.15, และ 8.92 ตามลำดับ หลังจากผสมปูนขาว 24 ชม. ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 40.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.40 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 9.68 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า

pH เฉลี่ย 9.10, 9.01, 9.08, 9.09, 9.07, 9.04, และ 9.02 ตามลำดับ หลังจากผสมปูนขาว 24 ชม. ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 45.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.50 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 10.09 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 9.40, 9.26, 9.40, 9.37, 9.35, 9.41, และ 9.37 ตามลำดับ หลังจากผสมปูนขาว 24 ชม. ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 50.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 6.0 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.89 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.63, 7.50, 7.52, 7.52, 7.51, 7.34, และ 7.40 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 2, 1, 4, 2, 3, 4, และ 4 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 0, 2, 3, 2, 2, 0, 0, 2, 0, 5, และ 4 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 3, 4, 7, 12, รูปที่ 1, 2)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มทดลองผสมปูนขาวและเชื้อในดินเหมือนกับกลุ่มที่ 2 แต่ถ้าตรวจไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) จะเดิมเชื้อลงใหม่ ดินก่อนทดลองมีค่า pH เฉลี่ย 5.39 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.49

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 2.50 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.40 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.43 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.20, 7.30, 7.24, 7.25, 7.27, 7.20, และ 7.20 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 8, 3, 5, 4, 4, 4, และ 2 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 1, 7, 4, 0, 3, 7, 2, 7, 4, 1, และ 1 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 5.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.80 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.12 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.25, 7.18, 7.19, 7.16, 7.12, 7.12, และ 7.07 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 9, 9, 9, 10, 8, 8, และ 5 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 7, 7, 7, 3, 5, 7, 7, 7, 6, 2, และ 6 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 10.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.80 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.34 ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.27, 7.26, 7.24, 7.22, 7.12, 7.12, และ 7.13 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 9, 6, 4, 0, 6, 8, และ 5 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่

ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 4, 5, 5, 3, 2, 7, 2, 6, 5, 2, และ 6 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 15.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 6.0 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.16 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.31, 7.29, 7.31, 7.48, 7.69, 7.81, และ 7.75 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 6, 6, 6, 5, 1, 2, และ 1 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 6, 4, 5, 1, 1, 4, 0, 2, 2, 1, และ 2 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 20.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.40 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.18 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.46, 7.35, 7.33, 7.26, 7.23, 7.21, และ 7.18 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 5, 6, 4, 5, 7, 6, และ 4 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 12 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 5, 5, 5, 2, 5, 7, 1, 7, 5, 0, 1, และ 0 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 25.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.60 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.21 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.41, 7.42, 7.37, 7.36, 7.37, 7.25, และ 7.20 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 4, 7, 6, 6, 7, 5, และ 6 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 12 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 7, 3, 4, 0, 6, 7, 6, 7, 7, 2, 2, และ 2 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 30.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.20 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 9.90 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.43, 7.50, 7.56, 7.58, 7.86, 7.46, และ 7.38 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 2, 0, 4, 1, 2, 4, และ 1 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 12 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 2, 1, 2, 0, 2, 7, 2, 5, 6, 0, 6, และ 1 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 35.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.25 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.25 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.76, 7.70, 7.85, 8.02, 8.15, 8.25, และ 8.33 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 3, 3, 2, 1, 0, 1, และ 0 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 12 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 4, 1, 2, 0, 3, 6, 2, 1, 2, 1, 0, และ 0 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 40.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.06 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.46 ผลการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.82, 7.67, 7.66, 7.74, 7.87, 8.0, และ 7.95 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 3, 4, 4, 4, 5, 4, และ 2 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 12 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 6, 0, 5, 2, 7, 6, 4, 2, 3, 1, 0, และ 6 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 45.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.0 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.12 ผลการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 8.03, 7.96, 8.13, 8.34, 8.50, 8.53, และ 8.48 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 3, 7, 3, 0, 1, 0, และ 2 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 12 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 3, 3, 0, 0, 0, 3, 2, 3, 1, 1, 0, และ 0 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

-ดินที่ใส่เชื้อและผสมปูนขาวร้อยละ 50.0 ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.80 และหลังผสมปูนขาวมี pH เฉลี่ย 7.20 ผลการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.75, 7.65, 7.63, 7.64, 7.66, 7.60, และ 7.53 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 3, 3, 3, 3, 2, 3, และ 5 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 12 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 6, 0, 4, 0, 0, 7, 0, 0, 2, 0, 2, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 2, 5, 6, 8, 13, รูปที่ 3, 4)

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ผสมเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) ในดินแล้วโรยปูนขาวบนผิวดิน ปริมาณ 0.25, 0.50, 1.0, 1.50, 2.0, 2.50, 3.0, 3.50, 4.0, 4.50, และ 5.0 กก./ตร.ม.

-ดินที่โรยปูนขาว 0.25 กก./ตร.ม. ผลการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.01, 6.94, 6.45, 6.07, 5.74, 5.77, และ 5.84 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 5, 6, 7, 5, 8, 9, และ 9 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 5, 3, 3, 7, 6, 3, 2, 6, 7, 7, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, 14, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 0.50 กก./ตร.ม. ผลการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.71, 6.60, 5.97, 5.20, 4.85, 5.11, และ 5.10 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 6, 5, 8, 9, 8, 9, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 7, 4, 4, 7, 7, 3, 0, 6, 7, 7, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, 14, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 1.0 กก./ตร.ม. ผลการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.71, 6.85, 6.84, 6.81, 6.56, 6.28, และ 6.39 ตามลำดับ สามารถตรวจแยก

เชื้อได้จำนวน 5, 4, 6, 4, 5, 6, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 4, 0, 0, 7, 3, 3, 0, 7, 5, 7, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, 14, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 1.50 กก./ตร.ม. ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.68, 6.65, 6.02, 5.41, 5.28, 5.25, และ 5.77 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 6, 8, 8, 7, 7, 8, และ 9 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 7, 2, 1, 7, 6, 4, 0, 7, 6, 6, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, 14, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 2.0 กก./ตร.ม. ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.75, 6.49, 6.38, 5.86, 5.69, 5.69, และ 5.90 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 6, 5, 4, 6, 6, 10, และ 6 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 7, 1, 1, 7, 6, 4, 0, 6, 4, 4, และ 3 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, 14, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 2.50 กก./ตร.ม. ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.94, 6.96, 6.97, 6.86, 6.77, 6.58, และ 6.57 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 7, 3, 3, 5, 2, 5, และ 3 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 5, 3, 3, 7, 3, 1, 0, 1, 2, 2, และ 1 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, 14, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 3.0 กก./ตร.ม. ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.95, 6.89, 6.62, 6.10, 5.84, 5.65, และ 5.66 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 4, 5, 8, 6, 7, 6, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 6, 6, 0, 7, 6, 5, 4, 5, 3, 7, และ 2 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, 14, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 3.50 กก./ตร.ม. ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.74, 6.80, 6.76, 6.29, 6.10, 6.14, และ 6.25 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 4, 4, 5, 5, 6, 2, และ 4 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 4, 6, 0, 7, 3, 3, 4, 0, 1, 2, และ 2 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, 14, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 4.0 กก./ตร.ม. ตลอดจนการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.79, 6.92, 6.69, 6.70, 6.62, 6.66, และ 6.79 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 4, 4, 3, 3, 5, 5, และ 4 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด

11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 6, 6, 0, 6, 0, 1, 1, 2, 5, 3, และ 1 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 4.50 กก./ตร.ม. ผลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.99, 7.02, 6.58, 6.69, 6.57, 6.33, และ 6.66 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 4, 5, 7, 8, 8, 9, และ 6 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 6, 7, 0, 7, 2, 4, 4, 5, 7, 3, และ 3 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, รูปที่ 5, 6)

-ดินที่โรยปูนขาว 5.0 กก./ตร.ม. ผลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.08, 7.01, 6.96, 6.90, 6.90, 6.74, และ 6.47 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 6, 3, 4, 5, 4, 5, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 1, 7, 0, 3, 3, 3, 1, 2, 6, 3, และ 5 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 9, รูปที่ 5, 6)

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่ผสมเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) ในดินแล้วโรยปูนขาวบนผิวดินเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 4 แต่ถ้าตรวจไม่พบเชื้อจะใส่เชื้อลงไปใหม่

-ดินที่โรยปูนขาว 0.25 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 6.35 ผลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.93, 6.55, 6.44, 6.27, 6.27, 6.36, และ 6.45 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 8, 8, 9, 8, 7, 8, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 2, 6, 7, 4, 3, 7, 5, 7, 6, 1, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 0.50 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.53 ผลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.93, 6.22, 5.74, 5.76, 5.69, 5.76, และ 5.81 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 8, 6, 9, 9, 8, 9, และ 5 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 2, 5, 6, 4, 3, 6, 1, 7, 7, 6, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 1.0 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.56 ผลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.95, 6.72, 6.85, 6.72, 6.68, 6.37, และ 6.29 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 9, 11, 8, 7, 8, 3, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 2, 2, 7, 5, 6, 6, 3, 7, 6, 6, และ 6 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 1.50 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.85 ผลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.02, 6.72, 6.38, 6.03, 6.10, 6.07, และ 6.37 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 8, 8, 8, 8, 6, 9, และ 6 ตัวอย่าง/ระดับความลึก

ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 0, 3, 7, 6, 5, 7, 4, 7, 3, 5, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 2.0 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 5.04 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.86, 6.78, 6.44, 6.52, 6.28, 6.26, และ 6.26 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 9, 9, 9, 9, 9, 10, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 0, 6, 7, 6, 7, 7, 4, 7, 6, 5, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 2.50 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.84 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.90, 6.50, 6.35, 6.30, 6.13, 5.98, และ 6.36 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 10, 9, 10, 11, 8, 10, และ 9 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 2, 6, 7, 6, 7, 7, 7, 7, 5, 7, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 3.0 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.47 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.05, 6.84, 6.76, 6.54, 6.49, 6.43, และ 6.61 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 10, 12, 11, 10, 9, 7, และ 8 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 5, 6, 7, 7, 6, 1, 7, 7, 4, 5, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 3.50 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.36 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.13, 6.60, 6.42, 5.96, 6.12, 6.35, และ 6.42 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 6, 7, 8, 7, 8, 10, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 4, 7, 7, 5, 4, 2, 3, 7, 4, 2, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 4.0 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.32 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.09, 6.67, 6.59, 6.26, 6.10, 6.13, และ 6.35 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 6, 9, 6, 8, 8, 6, และ 7 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 4, 6, 7, 3, 3, 0, 2, 7, 7, 4, และ 6 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 4.50 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.58 ผลของการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 6.96, 6.96, 6.90, 6.78, 6.67, 6.80, และ 6.74 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 8, 8, 9, 9, 10, 9, และ 9 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับ จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 6, 5, 7, 6, 7, 0, 6, 7, 6, 5, และ 7 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 145, รูปที่ 7, 8)

-ดินที่โรยปูนขาว 5.0 กก./ตร.ม. ดินก่อนทดลองมี pH เฉลี่ย 4.84 ตลอดการทดลองที่ระดับความลึก 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ซม. มีค่า pH เฉลี่ย 7.13, 7.12, 7.09, 6.96, 6.61, 6.64, และ 6.47 ตามลำดับ สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวน 4, 6, 3, 6, 5, 4, และ 8 ตัวอย่าง/ระดับความลึก ตามลำดับจากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อได้จำนวน 0, 0, 6, 0, 7, 1, 2, 6, 6, 3, และ 5 ตัวอย่าง/ครั้ง (ตารางที่ 10, 15, รูปที่ 7, 8)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินก่อนการทดลอง

ลำดับที่	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ 5
1	-	-	-	-	-
2	*	+	-	-	-
3	*	+	-	-	+
4	*	-	-	-	-
5	*	-	-	-	-
6	*	+	-	-	-
7	*	+	-	-	+
8	*	+	+	-	-
9	*	+	-	-	-
10	*	-	-	-	-
11	*	-	-	-	-
จำนวนร้อยละการพบเชื้อ	0	54.55	9.09	0	18.18

*ไม่ได้ทดลอง

ตารางที่ 2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดินทดลอง

ลำดับที่	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2: ผสมปูนขาว		กลุ่มที่ 3: ผสมปูนขาว		กลุ่มที่ 4:	กลุ่มที่ 5:
	ก่อนทดลอง	ก่อนผสม	หลังผสม	ก่อนผสม	หลังผสม	โรยปูนขาว	ก่อนโรยปูนขาว
1	4.24	6.20	7.93(2.5%)	5.40	7.43(2.5%)	ไม่ได้วัด	6.35
2		5.09	8.50(5%)	5.80	7.12(5%)	ไม่ได้วัด	4.53
3		5.40	8.61(10%)	4.80	7.34(10%)	ไม่ได้วัด	4.56
4		4.40	8.90(15%)	6.0	7.16(15%)	ไม่ได้วัด	4.85
5		6.0	10.12(20%)	5.40	7.18(20%)	ไม่ได้วัด	5.04
6		5.0	7.25(25%)	5.60	7.21(25%)	ไม่ได้วัด	4.84

7		5.20	9.46(30%)	5.20	9.90(30%)	ไม่ได้วัด	4.47
8		4.20	9.81(35%)	5.25	7.25(35%)	ไม่ได้วัด	4.36
9		4.40	9.68(40%)	5.06	7.46(40%)	ไม่ได้วัด	4.32
10		4.50	10.09(45%)	5.0	7.12(45%)	ไม่ได้วัด	4.58
11		6.0	7.89(50%)	5.80	7.20(50%)	ไม่ได้วัด	4.84
ค่าเฉลี่ย	4.24	5.13	8.93	5.39	7.49	-	4.79

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย pH ของดินที่ตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* ในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มควบคุม

วันที่เก็บตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย pH ของดิน				
	กลุ่มควบคุม	ปุ๋ยขาว 2.5%	ปุ๋ยขาว 5%	ปุ๋ยขาว 25%	ปุ๋ยขาว 50%
1	4.80	7.80	8.26	7.10	-
2	5.46	-	-	7.02	7.27
3	5.07	7.63	-	-	7.60
4	5.42	-	-	7.08	7.25
5	5.10	-	8.12	7.16	7.23
6	5.24	-	-	7.07	-
7	4.76	-	-	7.11	-
14	5.11	-	8.02	7.73	7.98
21	5.90	-	-	7.30	-
28	5.41	-	-	7.47	7.57
35	4.86	7.44	-	7.57	7.62

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย pH ของดินที่ไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* ในกลุ่มที่ 2

วันเก็บตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย pH ของดิน										
	L2.5	L5	L10	L15	L20	L25	L30	L35	L40	L45	L50
1	-	-	8.24	8.60	8.64	-	8.26	8.75	8.87	9.14	7.17
2	7.68	8.24	8.43	8.80	8.99	-	8.71	8.97	9.12	9.13	-
3	-	8.16	8.68	8.77	9.04	7.32	8.80	8.43	9.0	9.26	-
4	7.49	8.01	8.20	8.74	8.79	-	8.57	9.08	9.11	9.26	-
5	7.67	-	8.33	8.69	8.94	-	8.64	9.03	8.86	9.17	-
6	7.59	7.80	8.30	8.73	8.99	-	8.67	9.0	8.83	9.31	7.14

7	7.69	8.08	8.05	8.73	8.52	-	8.76	8.99	8.72	9.35	7.23
14	7.27	8.02	8.14	8.84	9.01	-	8.81	9.02	8.99	9.52	-
21	7.86	8.24	8.73	9.10	9.26	-	8.29	9.32	9.49	9.61	8.32
28	7.81	8.44	8.60	9.23	9.33	-	9.11	9.40	9.30	9.64	-
35	-	8.47	8.70	8.65	9.17	-	9.09	9.21	9.35	9.59	-

หมายเหตุ: L2.5, 5, 10,... หมายถึงร้อยละความเข้มข้นของปนขาวที่ผสมในดิน

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ย pH ของดินที่ตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* ในกลุ่มที่ 3

วันเก็บ ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย pH ของดิน										
	L2.5	L5	L10	L15	L20	L25	L30	L35	L40	L45	L50
1	7.08	6.86	6.96	7.60	7.25	7.17	7.54	8.33	8.03	8.81	7.49
2	6.97	6.97	7.02	7.40	7.35	7.28	7.39	8.32	7.93	8.36	-
3	7.16	7.05	7.12	7.49	7.34	7.50	7.98	8.14	8.04	-	7.80
4	-	7.08	7.04	7.24	7.21	-	-	-	7.46	-	-
5	7.19	7.14	7.07	7.49	7.15	7.37	7.40	7.58	7.81	-	-
6	7.33	7.36	7.35	7.51	7.37	7.34	7.49	7.91	7.82	8.15	7.87
7	7.62	7.32	7.43	-	7.53	7.56	8.33	8.29	8.0	8.70	-
14	7.21	7.26	7.11	7.47	7.29	7.22	7.38	7.99	7.79	8.14	-
21	7.43	7.24	7.46	7.47	7.24	7.32	7.42	7.79	7.53	8.21	7.43
28	7.30	7.24	7.24	7.61	-	7.33	-	7.94	7.56	8.44	-
35	7.21	7.16	7.33	7.68	7.21	7.45	7.35	-	-	-	7.72
40	*	*	*	*	-	7.38	7.54	-	7.97	-	7.45

ตารางที่-6 ค่าเฉลี่ย pH ของดินที่ตรวจไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* ในกลุ่มที่ 3

[illegible]

6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	7.70	-	-	-	-	-	-	-	7.83
14	-	-	-	-	-	-	-	-	7.43
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	7.36	-	-	-	-	-	7.37
35	-	-	-	-	-	7.87	7.98	8.12	-
40	-	-	7.18	-	-	8.04	-	8.42	-

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของดินที่ผสมปูนขาวของกลุ่มที่ 2 ตลอดการทดลอง

ความเข้มข้นปูนขาว (%)	ระดับความลึกของชั้นดิน (ซม.)							ค่าเฉลี่ย
	0	5	10	15	20	25	30	
2.5	7.64	7.65	7.67	7.65	7.60	7.61	7.60	7.63
5.0	8.16	8.18	8.27	8.16	8.22	8.18	8.0	8.17
10.0	8.30	8.40	8.48	8.46	8.41	8.61	8.30	8.42
15.0	8.84	8.80	8.34	8.79	8.79	8.80	8.71	8.72
20.0	9.02	9.05	9.07	9.03	8.96	8.91	8.75	8.97
25.0	7.24	7.25	7.28	7.27	7.23	7.36	7.23	7.27
30.0	8.64	8.74	8.78	8.76	8.87	8.63	8.79	8.74
35.0	9.11	8.99	8.98	9.07	9.09	9.15	8.92	9.04
40.0	9.10	9.01	9.08	9.09	9.07	9.04	9.02	9.06
45.0	9.40	9.26	9.40	9.37	9.35	9.41	9.37	9.37
50.0	7.63	7.50	7.52	7.52	7.51	7.34	7.40	7.49

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของดินที่ผสมปูนขาวของกลุ่มที่ 3 ตลอดการทดลอง

ความเข้มข้นปูนขาว (%)	ระดับความลึกของชั้นดิน (ซม.)							ค่าเฉลี่ย
	0	5	10	15	20	25	30	
2.5	7.20	7.30	7.24	7.25	7.27	7.20	7.20	7.24
5.0	7.25	7.18	7.19	7.16	7.12	7.12	7.07	7.16
10.0	7.27	7.26	7.24	7.22	7.12	7.12	7.13	7.19
15.0	7.31	7.29	7.31	7.48	7.69	7.81	7.75	7.52
20.0	7.46	7.35	7.33	7.26	7.23	7.21	7.18	7.29

25.0	7.41	7.42	7.37	7.36	7.37	7.25	7.20	7.34
30.0	7.43	7.50	7.56	7.58	7.86	7.46	7.38	7.54
35.0	7.76	7.70	7.85	8.02	8.15	8.25	8.33	8.0
40.0	7.82	7.67	7.66	7.74	7.87	8.0	7.95	7.82
45.0	8.03	7.96	8.13	8.34	8.50	8.53	8.48	8.28
50.0	7.75	7.65	7.63	7.64	7.66	7.60	7.53	7.64

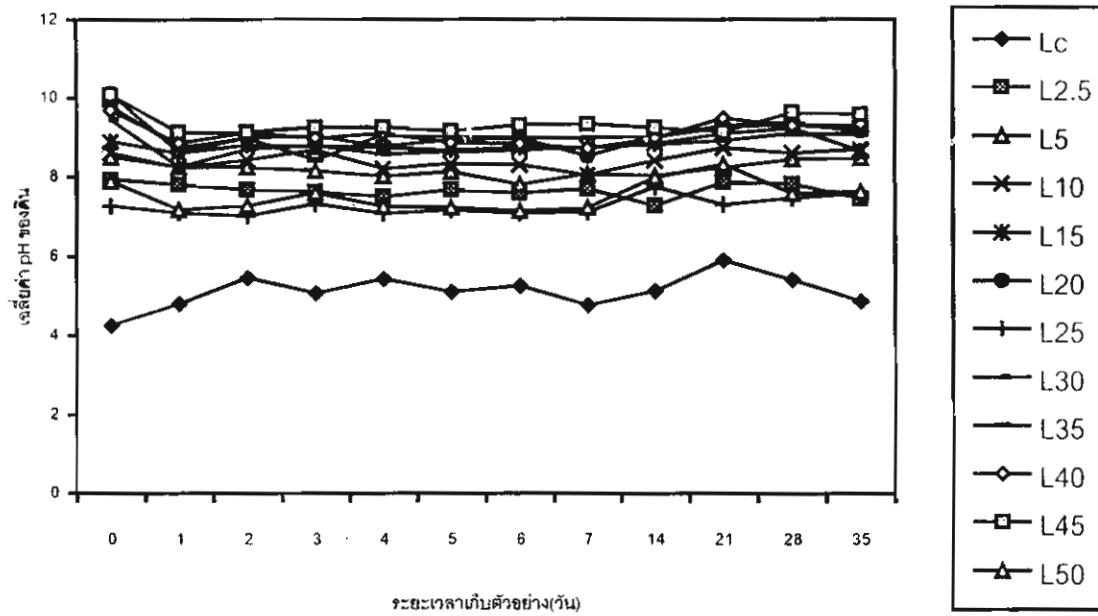
ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของดินที่โรยปูนขาวของกลุ่มที่ 4 ตลอดจนการทดลอง

ความเข้มข้นปูนขาว (กก./ตรม ²)	ระดับความลึกของชั้นดิน (ซม.)							ค่าเฉลี่ย
	0	5	10	15	20	25	30	
0.25	7.01	6.94	6.45	6.07	5.74	5.77	5.84	6.26
0.5	6.71	6.60	5.97	5.20	4.85	5.11	5.10	5.65
1.0	6.71	6.85	6.84	6.81	6.56	6.28	6.39	6.63
1.50	6.68	6.65	6.02	5.41	5.28	5.25	5.77	5.87
2.0	6.75	6.49	6.38	5.86	5.69	5.69	5.90	6.11
2.50	6.94	6.96	6.97	6.86	6.77	6.58	6.57	6.81
3.0	6.95	6.89	6.62	6.10	5.84	5.65	5.66	6.24
3.50	6.74	6.80	6.76	6.29	6.10	6.14	6.25	6.44
4.0	6.79	6.92	6.69	6.70	6.62	6.66	6.79	6.74
4.50	6.99	7.02	6.58	6.96	6.57	6.33	6.66	6.73
5.0	7.08	7.01	6.96	6.90	6.90	6.74	6.47	6.87

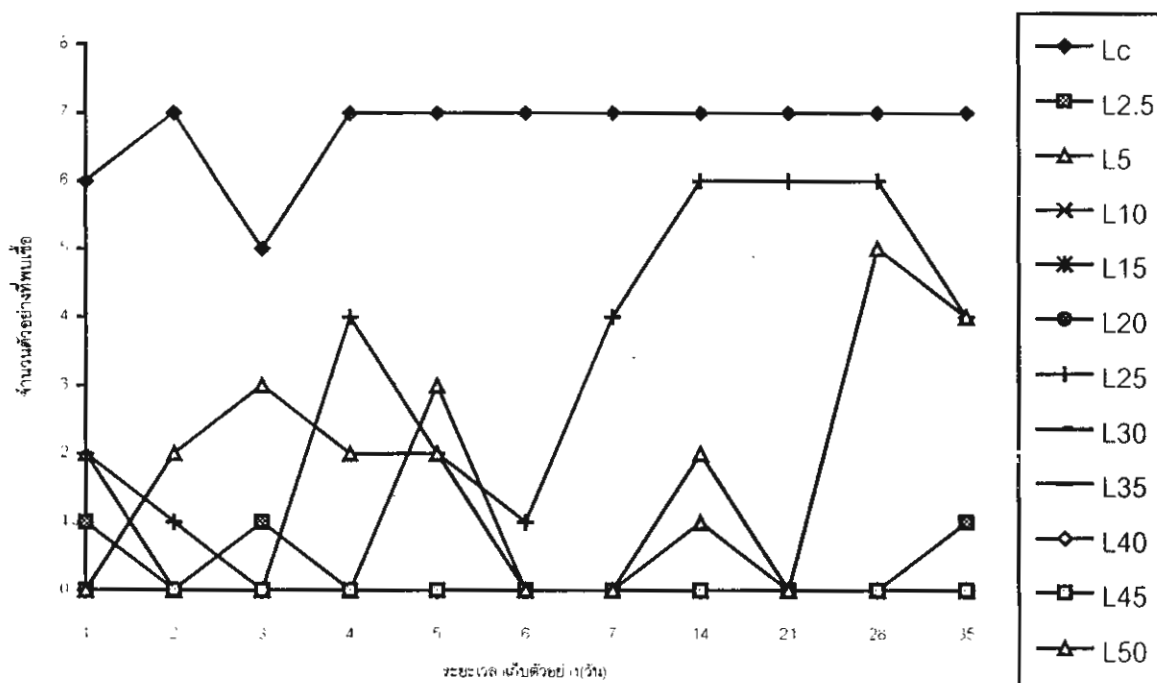
ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของดินที่โรยปูนขาวของกลุ่มที่ 5 ตลอดจนการทดลอง

ความเข้มข้นปูนขาว (กก./ตรม ²)	ระดับความลึกของชั้นดิน (ซม.)							ค่าเฉลี่ย
	0	5	10	15	20	25	30	
0.25	6.93	6.55	6.44	6.27	6.27	6.36	6.45	6.47
0.5	6.93	6.22	5.74	5.76	5.69	5.76	5.81	5.99
1.0	6.95	6.72	6.85	6.72	6.68	6.37	6.29	6.65
1.50	7.02	6.72	6.38	6.03	6.10	6.07	6.37	6.38
2.0	6.86	6.78	6.44	6.52	6.28	6.26	6.26	6.49
2.50	6.90	6.50	6.35	6.30	6.13	5.98	6.36	6.36

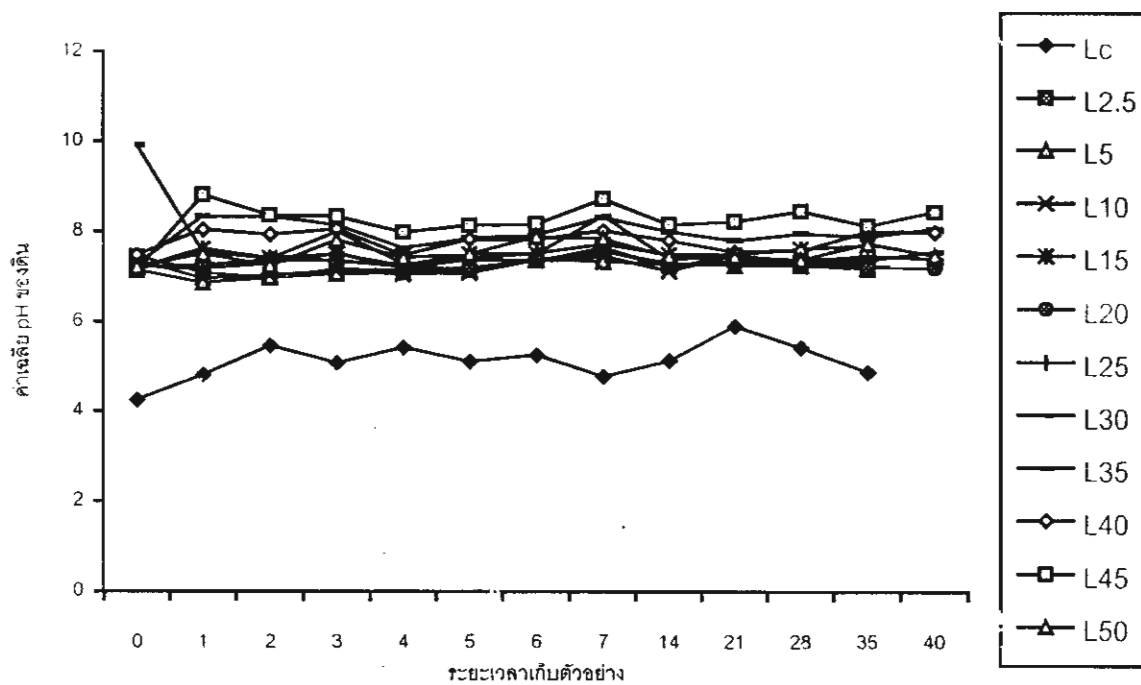
3.0	7.05	6.84	6.76	6.54	6.49	6.43	6.61	6.67
3.50	7.13	6.60	6.42	5.96	6.12	6.35	6.42	6.43
4.0	7.09	6.67	6.59	6.26	6.10	6.13	6.35	6.46
4.50	6.96	6.96	6.90	6.78	6.67	6.80	6.74	6.83
5.0	7.13	7.12	7.09	6.96	6.61	6.64	6.47	6.86



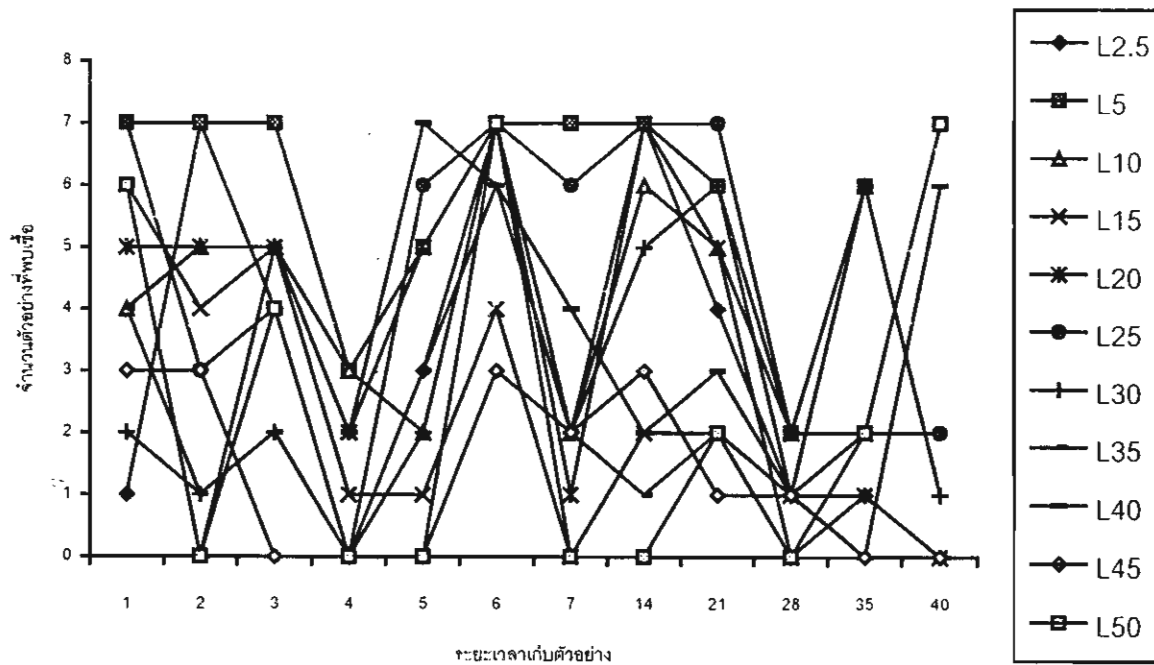
รูปที่ 1 : ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย pH ของดิน ระยะเวลาและความเข้มข้นของปุ๋ยขาวในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มควบคุม (Lc)



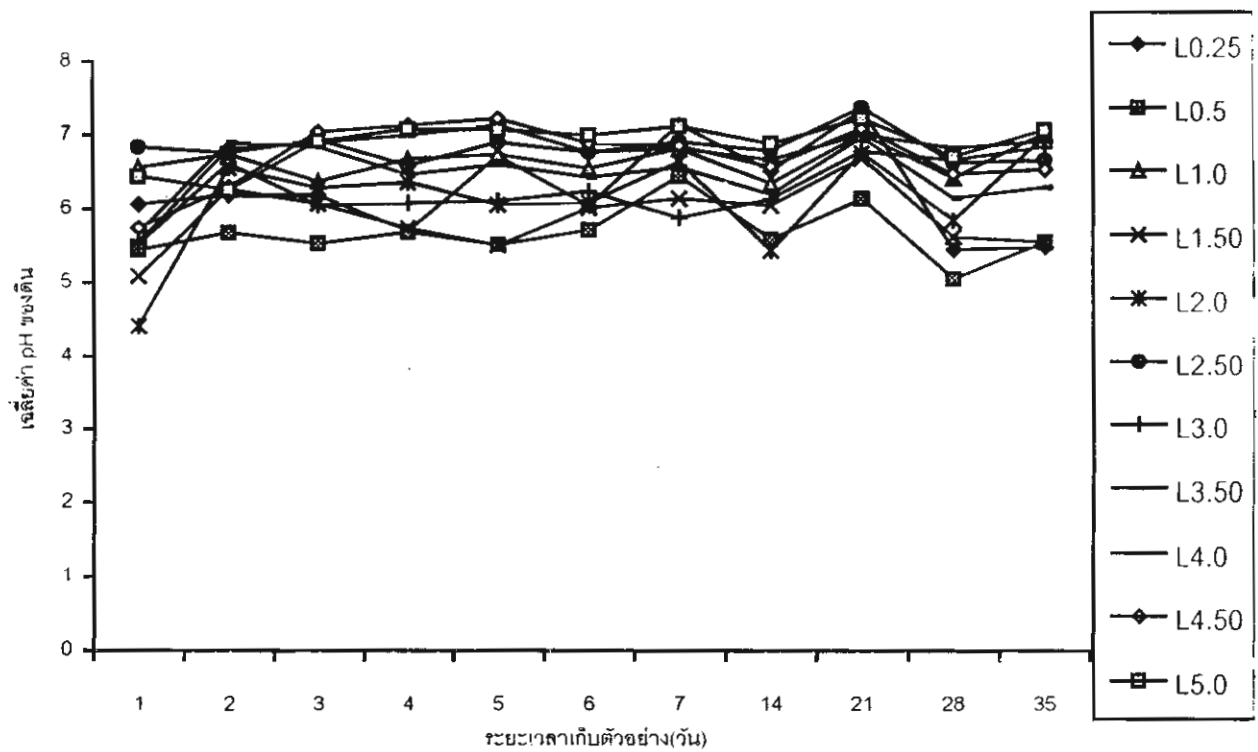
รูปที่ 2 : จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อของกลุ่มที่ 2 และกลุ่มควบคุม (Lc)



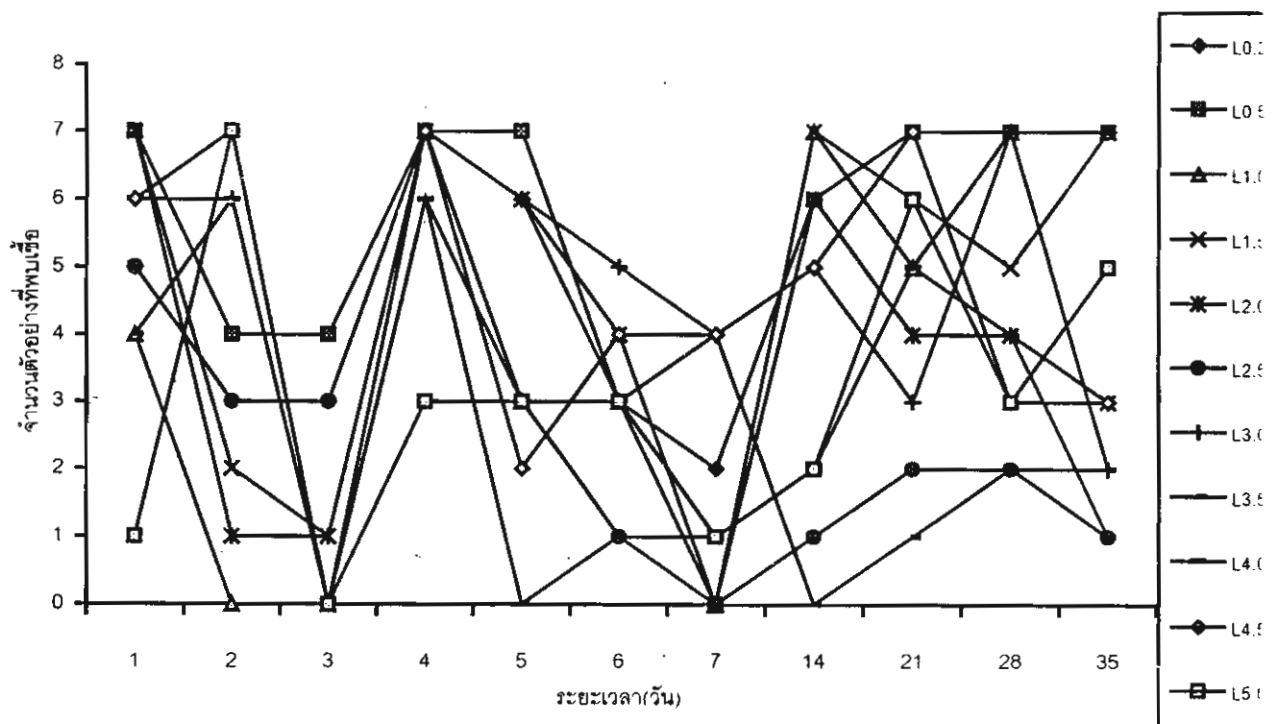
รูปที่ 3 : ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย pH ของดิน ระยะเวลาและความเข้มข้นของปุ๋ยไนโตรเจนในกลุ่มที่ 3 และกลุ่มควบคุม (Lc)



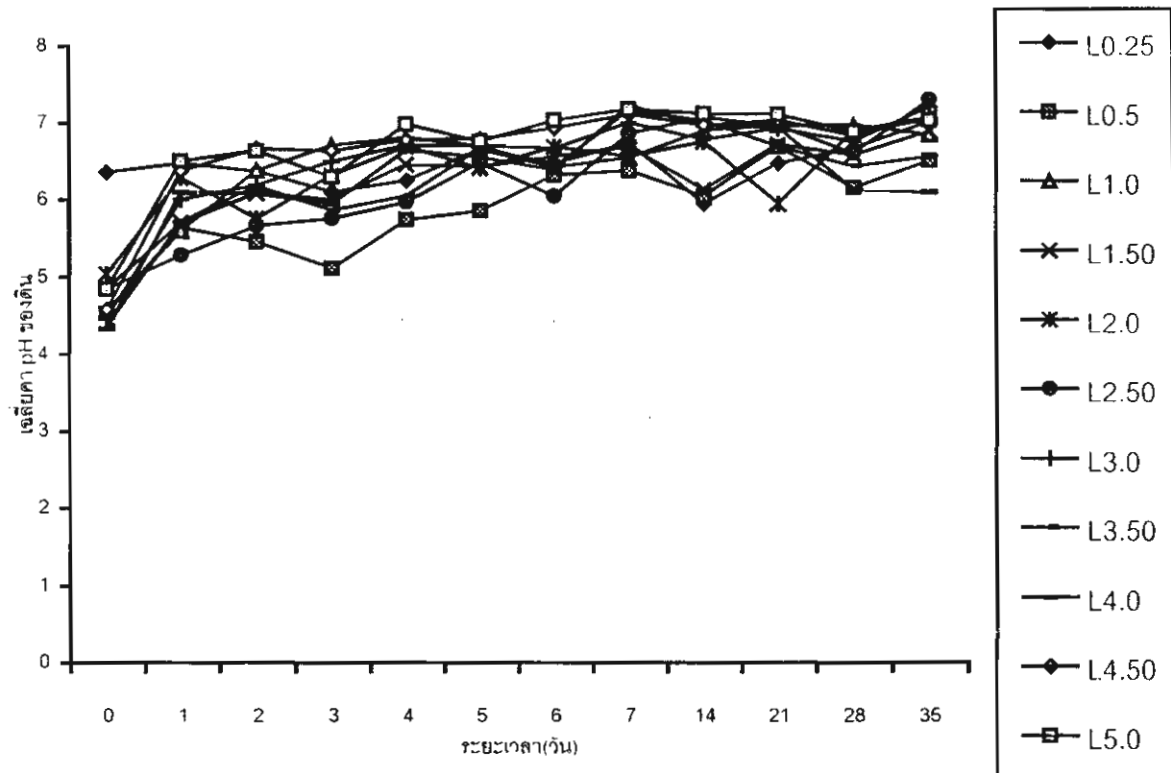
รูปที่ 4 : จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อของกลุ่มที่ 3



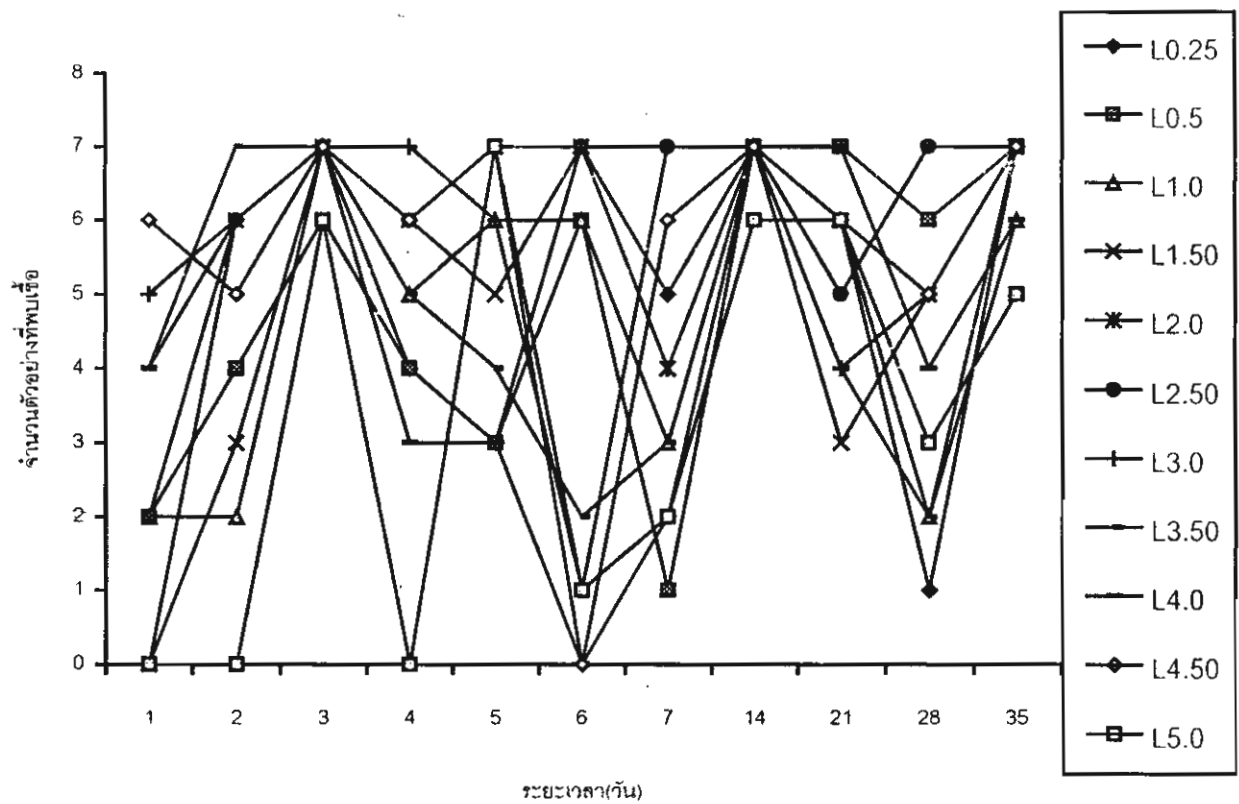
รูปที่ 5 : ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย pH ของดิน ระยะเวลาและความเข้มข้นของปุ๋ยขาวของกลุ่มที่ 4



รูปที่ 6 : จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อของกลุ่มที่ 4



รูปที่ 7 : ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย pH ของดิน ระยะเวลาและความเข้มข้นของปุ๋ยของพันธุ์ 5



รูปที่ 8 : จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อของพันธุ์ 5

3.2 วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของปูนขาวต่อการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) ในดินนาในครั้งนี้พบว่าปัจจัยที่มีเกี่ยวข้องในการส่งเสริมการออกฤทธิ์ของปูนขาวและการออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) มีดังนี้

- รูปแบบการใช้ของปูนขาวจะให้ผลกำจัดเชื้อได้ดีต้องผสมคลุกเคล้ากับดิน
- ปริมาณปูนขาวที่ใช้ควรอยู่ระหว่าง 10-45% สำหรับดินร่วนปนทรายจึงจะสามารถทำลายเชื้อได้ทั้งหมดใน 24 ชม.

- ปูนขาวต้องมีคุณภาพดียิ่งใหม่ยิ่งดีและมีสิ่งปลอมปนน้อยที่สุด

- ลักษณะของดินนาที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของปูนขาวควรเป็นดินร่วนปนทราย แต่อย่างไรก็ตามการใช้ปูนขาว 30-45% ในดินที่มีลักษณะเป็นดินเหนียวปนกับดินร่วน หลังผสมปูนขาว 35-42 วัน มีแนวโน้มว่าเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) จะไม่สามารถเจริญในดินทดลองได้

- ปริมาณน้ำที่ใช้ต่อการเกิดปฏิกิริยาของปูนขาวต้องเหมาะสม พบว่าดินทดลองที่มีน้ำท่วมขังจะไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) ปูนขาวต้องการน้ำมากพอในการแตกตัวเป็นด่าง ในดินที่ผสมปูนขาว 50% ไม่พบมี pH เพิ่มขึ้นมากนักอาจเนื่องจากมีปูนขาวมากเกินไป เมื่อใช้จำนวนมากๆ ขึ้นก็ต้องเพิ่มปริมาณน้ำมากขึ้นตามลำดับจนเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีแตกตัวเป็นด่าง

- ระดับ pH ที่เกิดจากปฏิกิริยาแตกตัวของปูนขาวในดิน พบว่า เมื่อ pH มากกว่า 8.30 จะทำลายเชื้อได้ทั้งหมด

- ระยะเวลาการทำลายเชื้อขึ้นกับปริมาณของปูนขาวที่ใช้ต้องใช้ปริมาณที่เหมาะสม ลักษณะของดินถ้าเป็นดินเหนียวปนกับดินร่วนก็จะใช้เวลามาก และปริมาณน้ำที่ใช้ต้องเหมาะสมมากพอต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของปูนขาว

ในกลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม ดินมีสภาพเป็นดินร่วนปนทราย ระหว่างการทดลองมี pH อยู่ระหว่าง 4.76-5.90 สามารถตรวจแยกเชื้อได้จำนวนสูงอยู่ตลอดการทดลอง จากการเก็บตัวอย่างดิน 11 ครั้งๆ ละ 7 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่มีเชื้อจำนวน 6, 7, 5, 7, 7, 7, 7, 7, 7, และ 7 ตัวอย่าง ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 ดินมีสภาพเป็นดินร่วนปนทราย ยกเว้นถึงที่ผสมปูนขาว 25% มีลักษณะเป็นดินเหนียว ถึงที่ผสมปูนขาว 2.5% ดินมี pH อยู่ระหว่าง 7.60-7.67 สามารถตรวจแยกเชื้อได้ครั้งละ 1 ตัวอย่างในวันที่ 1, 3, และ 35 ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 5% สามารถตรวจแยกเชื้อจากดินได้ในวันที่ 1, 5, และ 14 หลังจากวันที่ 21 ไม่สามารถแยกเชื้อได้ ในถึงที่ผสมปูนขาว 10-20% และ 30-45% มี pH อยู่ระหว่าง 8.30-9.41 หลังผสมปูนขาว 24 ชม. ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้ สำหรับถึงที่ใช้ปูนขาว 25% พบว่าปูนขาวไม่ออกฤทธิ์มากพอที่จะมีผลต่อการทำลายเชื้อ ดินมี pH อยู่ระหว่าง 7.23-7.36 สามารถตรวจพบเชื้อได้ตลอดการทดลอง และถึงที่ใช้ปูนขาว 50% พบว่าปูนขาวไม่ออกฤทธิ์มากพอที่จะมีผลต่อการทำลายเชื้อ ดินมี pH อยู่ระหว่าง 7.34-7.63 สามารถตรวจพบ

เชื้อได้ตลอดการทดลองอาจเนื่องจากปุ๋ยขี้วัวคุณภาพไม่ดี ดินมีลักษณะเป็นดินเหนียวปนกับดินร่วนปนขาวออกฤทธิ์ได้ไม่ดี และกรณีใช้ปุ๋ยขี้วัว 50% อาจใช้มากเกินไปทำให้แตกตัวได้ไม่ดี การร่อนน้ำให้ชุ่มทุกวัน น้ำยังไม่มากพอเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาแตกตัวเป็นค่าสูงพอที่จะฆ่าเชื้อได้

กลุ่มที่ 3 ดินมีลักษณะเป็นดินเหนียวปนกับดินร่วน เวลารดน้ำทุกวันพบว่าน้ำจะซึมผ่านด้านข้างถึงมากกว่าจะซึมผ่านดิน เมื่อน้ำไม่เพียงพอ ปุ๋ยขี้วัวก็ไม่แตกตัวเป็นค่าสูงพอที่จะมีฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อ ถึงที่ผสมปุ๋ยขี้วัว 2.5-15% มี pH อยู่ระหว่าง 7.07-7.81 สามารถตรวจแยกเชื้อได้ตลอดการทดลอง ถึงที่ผสมปุ๋ยขี้วัว 20%, 35%, และ 45% มี pH อยู่ระหว่าง 7.18-7.46, 7.70-8.33, และ 7.96-8.53 ตามลำดับ มีแนวโน้มจะมีฤทธิ์ทำลายเชื้อในวันท้ายๆ ของการทดลองคือวันที่ 35-42 ส่วนถึงที่ผสมปุ๋ยขี้วัว 25%, 30%, 40, และ 50% มี pH อยู่ระหว่าง 7.20-7.42, 7.38-7.86, 7.66-8.0, และ 7.53-7.75 สามารถตรวจแยกเชื้อได้ตลอดการทดลองอาจเนื่องจากสภาพเป็นดินเหนียวปนดินร่วน คุณภาพปุ๋ยขี้วัวไม่ดีและกรณีใช้ปุ๋ยขี้วัวปริมาณสูงแต่น้ำที่ให้ไม่เพียงพอต่อการแตกตัวเป็นค่าสูงพอที่จะมีฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ ส่วนการเติมเชื้อลงใหม่ขนาดความเข้มข้นของเชื้อเท่าเดิมในถึงที่ผสมปุ๋ยขี้วัวความเข้มข้น 20%, 35%, 40%, 45%, และ 50% พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ภายใน 14 วัน, มากกว่า 28 วัน, ภายใน 14 วัน, มากกว่า 28 วัน, และภายใน 1-14 วัน ตามลำดับ

สำหรับกลุ่มที่ 4 และ 5 ดินมีลักษณะร่วนปนทรายน้ำซึมผ่านเร็ว เมื่อโรยปุ๋ยขี้วัวบนผิวดินที่ผสมเชื้อแล้วรดน้ำให้ชุ่มทุกวัน ปริมาณน้ำที่รดไม่มากพอที่จะมาทำปฏิกิริยาในการแตกตัวเป็นค่าของปุ๋ยขี้วัวบนผิวดินได้ทำให้การไม่เกิดค่าที่สูงพอที่จะมีผลต่อการทำลายเชื้อได้ ซึ่งสังเกตจากค่า pH ของดินที่ยังเป็นกรดและ สามารถตรวจแยกเชื้อได้ตลอดการทดลอง

3.3 ประโยชน์ที่ได้จากการทดลอง

3.3.1 ทราบปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการออกฤทธิ์ของปุ๋ยขี้วัวในดินนาที่มีผลต่อการกำจัดเชื้อ

B. pseudomallei (Ara-) ซึ่งได้แก่

- รูปแบบของการใช้คือต้องผสมคลุกเคล้ากับดินที่มีใช้ดินเหนียวปนอยู่มากๆ
- ปริมาณปุ๋ยขี้วัวที่ใช้ถ้าเป็นดินร่วนปนทรายใช้ 10-45% จะกำจัดเชื้อได้ภายใน 24 ชม. แต่ถ้าเป็นดินเหนียวปนดินร่วน ควรใช้ 30-45% จะกำจัดเชื้อได้ ประมาณวันที่ 35-42 วันหลังผสมปุ๋ยขี้วัว
- ปุ๋ยขี้วัวต้องมีคุณภาพดียังใหม่ยังดีและไม่ควรมีสั่งเจือปน
- ปุ๋ยขี้วัวต้องการนำปริมาณมากพอต่อการเกิดปฏิกิริยาแตกตัวเป็นค่า ยังใช้ปริมาณมากยิ่งต้องเพิ่มการใช้น้ำมากขึ้นตามลำดับแต่ถ้าใช้ปริมาณมากตั้งแต่ 50% ขึ้นไปพบว่าจะแตกแตกตัวไม่ดี

3.3.2 การประยุกต์ใช้ปุ๋ยขี้วัวในบริเวณที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) โดยเฉพาะในนาข้าวของเกษตรกรควรทำในช่วงการเตรียมดินเพื่อเพาะปลูก เช่น ในช่วงไถนา คาคานา เตรียมแปลงปลูก ผัก เป็นต้น ไม่ควรใช้ในนาข้าวที่มีต้นข้าว หรือ ไร่-สวนที่มีพืชผักเพราะเมื่อดินมี pH มากกว่า 7 ขึ้นไปจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชได้

3.4 ปัญหาและอุปสรรคในการทำวิจัย

3.4.1 การทดลองใช้สารเคมีหลายชนิดในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซึ่งทั้งหมดต้องนำเข้าจากต่างประเทศต้องใช้เวลานานรอคอยถึง 45 วันหรือมากกว่านั้นในการสั่งซื้อแต่ละครั้ง ทำให้งานล่าช้ากว่ากำหนด

3.4.2 ขั้นตอนเตรียมดินทดลอง การเก็บตัวอย่าง การเตรียมอุปกรณ์และสารเคมี การตรวจวิเคราะห์และการกำจัดเชื้อ มีการใช้บุคลากรมากต้องใช้ต้นทุนสูงกว่ากำหนดในงบประมาณ

3.4.3 ระยะเวลาตรวจวิเคราะห์เชื้อใช้เวลานานอย่างน้อย 5 วัน และการวัด pH เนื่องจากมีเพียงเครื่องเดียวต้องเวลาในการตรวจกับตัวอย่างครั้งละหลายๆ ซึ่งทำให้งานล่าช้ากว่ากำหนด

3.4.4 ไม่สามารถหาดินมาทดลองจากแหล่งเดียวกันได้เนื่องจากใช้ดินทดลองมาก เจ้าของที่นาแต่ละรายขายดินให้จำนวนไม่มากพอเพราะจะทำให้নাเสียหายและไม่สามารถเลือกกำหนดแหล่งดินและสภาพดินได้

3.4.5 เนื่องจากดินทดลองในถังไม่เหมือนดินในธรรมชาติมีการทรุดตัวและพังทะลายของชั้นดินตลอดเวลา ถ้าเป็นดินเหนียวจะอุ้มน้ำคูดซับน้ำไม่ดี เกิดน้ำท่วมขังระบายออกไม่ได้ ทำให้เก็บตัวอย่างด้วยความลำบากใช้เวลามากในการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งจำเป็นต้องใช้บุคลากรจำนวนมากเพื่อจะให้งานเสร็จในวันเดียว

3.4.6 การกำจัดดินทดลองและภาชนะใส่ดินที่มีเชื้อจำนวน 45 ถึง 75 กก. ต้องใช้เวลาและบุคลากรจำนวนมากใช้งบประมาณสูงกว่ากำหนด

3.4.7 ดินทดลองที่อบและตากแห้งสำหรับผสมกับปูนขาวมีความชื้นไม่เท่ากันแม้จะอบและตากแห้งระยะเวลาเท่ากันก็ตามทำให้น้ำหนักดินต่อปริมาณปูนขาวอาจคลาดเคลื่อนได้

3.5 วิจัยผลการทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่า การผสมปูนขาวคลุกเคล้ากับดินที่ใส่เชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) ขนาด 10^5 cfu/ml ในดินร่วนปนทรายเมื่อใช้ปูนขาวขนาด 10-45% สามารถกำจัดเชื้อได้ภายใน 24 ชม. แต่ถ้าเป็นดินเหนียวปนดินร่วนควรใช้ปูนขาวขนาด 30-45% จึงจะสามารถกำจัดเชื้อได้ในวันที่ 35-42 วัน การแตกตัวของปูนขาวเป็นด่างในดินเหนียวปนดินร่วนเกิดปฏิกิริยาได้ไม่ใช่อาจเนื่องจากน้ำซึมผ่านดินเหนียวได้ไม่ดี หรืออาจมีสารบางชนิดในดินเหนียวที่ขัดขวางการแตกตัวของปูนขาว นอกจากนี้คุณภาพของปูนขาวก็เป็นสิ่งสำคัญถ้าคุณภาพไม่ดีไม่สม่ำเสมอมีการปลอมปนก็จะมีผลทำให้ฆ่าเชื้อได้ไม่ดี สำหรับการโรยปูนขาวบนผิวดินที่ผสมเชื้อให้ผลการทำลายเชื้อได้ไม่ใช่อาจเนื่องจากน้ำซึมผ่านปูนขาวบนผิวดินเร็วเกินไปทำให้ปูนขาวแตกตัวไม่ดีทำให้เกิดด่างน้อยไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อ

ปัจจัยที่สำคัญที่จะกำจัดเชื้อ *B. pseudomallei* (Ara-) ในดินตามธรรมชาติ ก่อนการใช้ปูนขาวควรศึกษาสภาพของดินว่าเหมาะสมหรือไม่ มีปริมาณน้ำเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาที่จะให้ด่างปริมาณสูงพอที่จะทำลายเชื้อได้ และสุดท้ายต้องคำนึงคือปูนขาวต้องมีคุณภาพดีไม่เก่าและไม่มีส่วน

เจือปน การใช้ปุ๋ยขาวปริมาณน้อยเกินไปก็จะให้ค่าไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อแต่ถ้ามากเกินไปก็จะไม่เกิดปฏิกิริยาทำให้ไม่สามารถทำลายเชื้อได้

การใช้ปุ๋ยขาวในพื้นที่การเกษตรถ้าไม่ระมัดระวังอาจมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้ เมื่อสภาพเป็นด่างสูงจะมีผลต่อการใช้แร่ธาตุของพืช ซึ่งควรใช้ปุ๋ยขาวปริมาณต่ำสุดที่จะทำลายเชื้อได้ และควรใช้ร่วมกับปุ๋ย NPK

เอกสารอ้างอิง

- Blood, D.C., Radostits, O.M., and Henderson, J.A. 1983. Melioidosis. Veterinary Medicine: A Text Book of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats and Horses, 6th ed. Bailliere Tindall, England.
- Johnson-Ifearulundu-Y and Kaneene-JB. 1999. Distribution and environmental risk factors for Paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. American-Journal-of-Veterinary-Research. 60 (5): 589-596.
- Leelarasamee, A. 2000. Melioidosis in southeast Asia. Acta Tropica. 74: 129-132.
- Smith, M.D., Wuthiekanun., Walsh. A.L., and White, N.J. 1995. Quantitative recovery of *B. pseudomallei* from soil in Thailand. Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg. 89: 488-490.
- Stevens, R.J., and Laughlin, R.J. 1996. Effects of lime and nitrogen fertilizer on two sward types over a 10-year period. J. Agr. Sci., Cambridge. 127: 45-461.
- Tong, S., Yang, S., Lu, Z., and He, W. 1996. Laboratory investigation of ecological factors influencing the environmental presence of *B. pseudomallei*. J. Microbiol. Immunol. 40: 451-453.
- Vuddhakul, V., Tharavichitkul, P., Na-ngam, N., Jitsurong, S., Kunthawa, B., Noimay, P., Noimay, P.P., Binla, A. and Thamalikitkul, V. 1999. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. . 60(3): 458-461.
- Wuthiekanun, V. Smith, M.D. Dance, D.A.B. and White, N.J. 1995. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in North-eastern of Thailand. Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg. 89: 41-43.

ภาคผนวก

ภาคผนวก. ก : อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อ *B. pseudolallei* จากดินทดลอง

Selective media:

สูตร Modified Ashdown's agar

Tryptic soy agar (TSA)	40 gm.
Glycerol	40 ml.
1% Neural red	5 ml.
0.1% Crystal violet	2.5 ml.
น้ำกลั่น pH 7.2	1,000 ml.

หลังจาก Autoclave ที่ 121°C, 15 lbs นาน 15 นาที แล้วนำไปแช่ใน Water bath ให้มี

อุณหภูมิ 45°C เติมยาเซนด้าไมซิน (Gentamycin) ขนาด 5 มก./ล. เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไป

เทลงในจานเพาะเชื้อ ผึ่งเพาให้แห้งก่อนนำไปใช้ ถ้าเหลือใช้ให้เก็บในตู้เย็น 4°C

Selective broth:

สูตร Threonine basal salt solution (TBSS)

KH ₂ PO ₄	0.451 gm.
K ₂ HPO ₄	1.730 gm.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.123 gm.
CaCl ₂	0.0147 gm.
NaCl	10.0 gm.
Nitritotriacetic acid	0.20 gm.
Solution A	20.0 gm.
น้ำกลั่น pH 7.2	900.0 ml.

ปรับ pH ครั้งสุดท้ายเป็น 7.2 ด้วย 1.0 N. KOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่ 121°C, 15 lbs นาน 15 นาที ที่ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม L-threonine 0.05 M. (5.956 gm./l.) เติมยา Colistin 20 mg./l. เขย่าให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดที่ปลอดเชื้อหลอดๆ ละ 8 มล. ถ้าเหลือใช้ให้เก็บในตู้เย็นที่ 4°C

การเตรียม Solution A:

H ₃ PO ₄ , 85%	2.306 ml. (1.96 gm./l.)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.556 gm.
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.297 gm.
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0218 gm.

MnSO ₄ H ₂ O	0.125 gm.
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.030 gm.
MoO ₃ Na ₂ 2H ₂ O	0.030 gm.
H ₃ BO ₃	0.062 gm.
น้ำกลั่น pH 7.2	1,000.0 ml.

L-threonine:

L-threonine	11.9 gm.
น้ำกลั่น pH 7.2	100.0 ml.

กรองโดยใช้ชุดกรองแบบที่เร็ว (กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน) หลังจากนั้นใช้ปริมาตร 50 มล. เติมลงไปใน TBSS ที่มีปริมาตร 950 มล. ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 M.

ภาคผนวก ข: การแยกเชื้อจากดิน

ตัวอย่างดิน 3 กรัม ใส่ใน 2 มล. น้ำกลั่นปลอดเชื้อในหลอดพลาสติกขนาด 15 x 150 มล.

↓
เขย่าให้เข้ากันด้วย Vertex Mixer

↓
แล้วใช้ไปเปิดพลาสติกชนิดกระเปาะใช้แล้วทิ้งขนาด 2 มล. ใส่น้ำส่วนบนใส่ในหลอดทดลองที่มี TBSS ปริมาตร 8 มล. บ่มที่ 42°C นาน 48 ชม.

↓
ใช้หัววงเย็บเชื้อและที่ผิวหน้าของ TBSS จำนวน 2 ครั้ง ลงใน Ashdown's agar

↓ บ่มที่ 37°C นาน 72 ชม.

อ่านผล: Colonial morphology & Biochemical test

ตารางที่ 11 ผลการตรวจของกลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (ดินนาใส่เชื้อ *B.pseudomallei* 10⁵ cfu/ml.)

กลุ่มตัวอย่างตรวจ- ความลึก (ซม.)-วันที่เก็บตัวอย่าง	ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ		
	ผลบวก	ผลลบ	pH
1 C-0/D-1	+		5.43
1 C-5/D-1	+		5.32
1 C-10/D-1	+		4.96
1 C-15/D-1	+		4.42
1 C-20/D-1	+		4.40
1 C-25/D-1		-	4.53

1 C-30/D-1	+	4.56
	ค่าเฉลี่ย	4.80
1 C-0/D-2	+	4.92
1 C-5/D-2	+	5.18
1 C-10/D-2	+	5.95
1 C-15/D-2	+	5.60
1 C-20/D-2	+	5.98
1 C-25/D-2	+	5.07
1 C-30/D-2	+	5.50
	ค่าเฉลี่ย	5.46
1 C-0/D-3	-	5.62
1 C-5/D-3	-	4.52
1 C-10/D-3	+	5.29
1 C-15/D-3	+	5.14
1 C-20/D-3	+	4.47
1 C-25/D-3	+	5.77
1 C-30/D-3	+	4.69
	ค่าเฉลี่ย	5.07
1 C-0/D-4	+	5.50
1 C-5/D-4	+	5.32
1 C-10/D-4	+	5.12
1 C-15/D-4	+	5.86
1 C-20/D-4	+	5.24
1 C-25/D-4	+	5.44
1 C-30/D-4	+	5.45
	ค่าเฉลี่ย	5.42
1 C-0/D-5	+	5.13
1 C-5/D-5	+	5.05
1 C-10/D-5	+	5.04
1 C-15/D-5	+	5.37
1 C-20/D-5	+	4.81

1 C-25/D-5	+	4.95
1 C-30/D-5	+	5.32
	ค่าเฉลี่ย	5.10
1 C-0/D-6	+	5.09
1 C-5/D-6	+	5.07
1 C-10/D-6	+	5.26
1 C-15/D-6	+	5.04
1 C-20/D-6	+	5.09
1 C-25/D-6	+	5.05
1 C-30/D-6	+	6.08
	ค่าเฉลี่ย	5.24
1 C-0/D-7	+	4.50
1 C-5/D-7	+	4.69
1 C-10/D-7	+	4.56
1 C-15/D-7	+	4.49
1 C-20/D-7	+	4.35
1 C-25/D-7	+	5.02
1 C-30/D-7	+	5.70
	ค่าเฉลี่ย	4.76
1 C-0/D-14	+	5.05
1 C-5/D-14	+	5.39
1 C-10/D-14	+	5.25
1 C-15/D-14	+	4.95
1 C-20/D-14	+	5.03
1 C-25/D-14	+	4.97
1 C-30/D-14	+	5.14
	ค่าเฉลี่ย	5.11
1 C-0/D-21	+	5.27
1 C-5/D-21	+	5.38
1 C-10/D-21	+	5.19
1 C-15/D-21	+	5.80

1 C-20/D-21	+	6.55
1 C-25/D-21	+	6.56
1 C-30/D-21	+	6.58
	ค่าเฉลี่ย	5.90
1 C-0/D-28	+	5.27
1 C-5/D-28	+	4.94
1 C-10/D-28	+	5.65
1 C-15/D-28	+	5.22
1 C-20/D-28	+	4.81
1 C-25/D-28	+	5.55
1 C-30/D-28	+	6.46
	ค่าเฉลี่ย	5.41
1 C-0/D-35	+	4.60
1 C-5/D-35	+	4.57
1 C-10/D-35	+	4.58
1 C-15/D-35	+	4.64
1 C-20/D-35	+	4.53
1 C-25/D-35	+	5.56
1 C-30/D-35	+	5.51
	ค่าเฉลี่ย	4.86

ตารางที่ 12 ผลการตรวจเชื้อของกลุ่มที่ 2 ในดินนาและใส่เชื้อ *B. pseudomallei* 10^5 cfu./ml.

กลุ่มตัวอย่างตรวจ-ปนขาว(%)-ระดับ ความลึก (ซม.)-วันที่เก็บตัวอย่าง	ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ		
	ผลบวก	ผลลบ	pH
2 MLS-2.5-0/D-1		-	7.67
2 MLS-2.5-5/D-1	+		7.87
2 MLS-2.5-10/D-1		-	8.03
2 MLS-2.5-15/D-1		-	8.06
2 MLS-2.5-20/D-1		-	7.60
2 MLS-2.5-25/D-1		-	7.46
2 MLS-2.5-30/D-1		-	7.88

	ค่าเฉลี่ย	7.80
2 MLS-5-0/D-1	+	7.85
2 MLS-5-5/D-1	+	8.50
2 MLS-5-10/D-1	-	8.45
2 MLS-5-15/D-1	-	8.02
2 MLS-5-20/D-1	-	7.99
2 MLS-5-25/D-1	-	8.50
2 MLS-5-30/D-1	-	8.54
	ค่าเฉลี่ย	8.26
2 MLS-10-0/D-1	-	8.0
2 MLS-10-5/D-1	-	8.35
2 MLS-10-10/D-1	-	8.21
2 MLS-10-15/D-1	-	8.15
2 MLS-10-20/D-1	-	8.04
2 MLS-10-25/D-1	-	8.79
2 MLS-10-30/D-1	-	8.11
	ค่าเฉลี่ย	8.24
2 MLS-15-0/D-1	-	8.48
2 MLS-15-5/D-1	-	8.46
2 MLS-15-10/D-1	-	8.60
2 MLS-15-15/D-1	-	8.45
2 MLS-15-20/D-1	-	8.22
2 MLS-15-25/D-1	-	8.86
2 MLS-15-30/D-1	-	9.14
	ค่าเฉลี่ย	8.60
2 MLS-20-0/D-1	-	8.50
2 MLS-20-5/D-1	-	8.96
2 MLS-20-10/D-1	-	8.71
2 MLS-20-15/D-1	-	8.70
2 MLS-20-20/D-1	-	8.29
2 MLS-20-25/D-1	-	8.39