

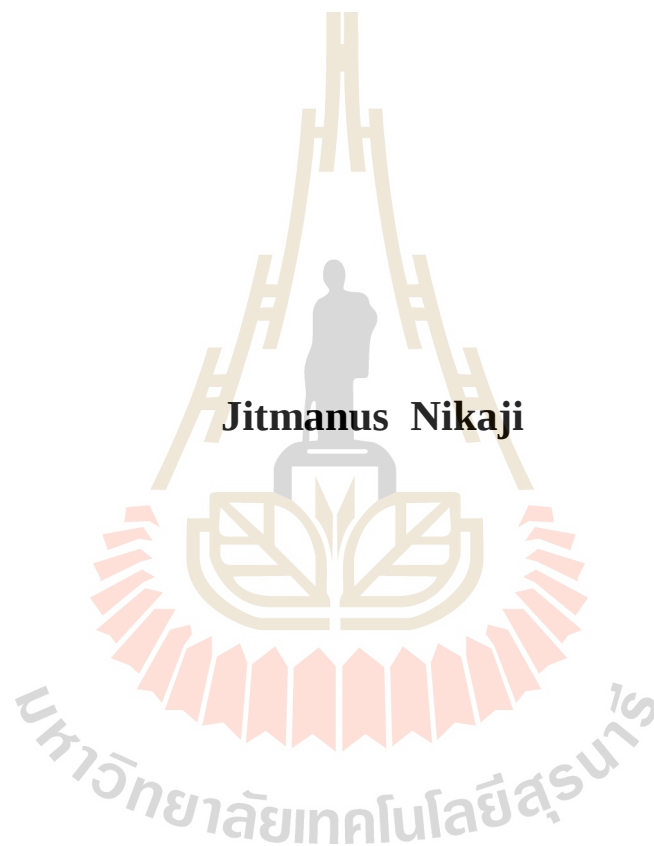
การพัฒนาสูตรและวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อ
ควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี



นางสาวจิตมณัส นิกากิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2559

**DEVELOPMENT OF FORMULATION AND
APPLICATION OF *Bacillus subtilis* FOR CONTROLLING
SOFT ROT DISEASE OF CHINESE MUSTARD**



Jitmanus Nikaji

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science Program in Crop Science**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2016

การพัฒนาสูตรและวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุม
โรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. ดร.ฐิติพร มะณีโกวา)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.ดุสิต อธิณวัฒน์)

กรรมการ

(ดร.โสภณ วงศ์แก้ว)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)

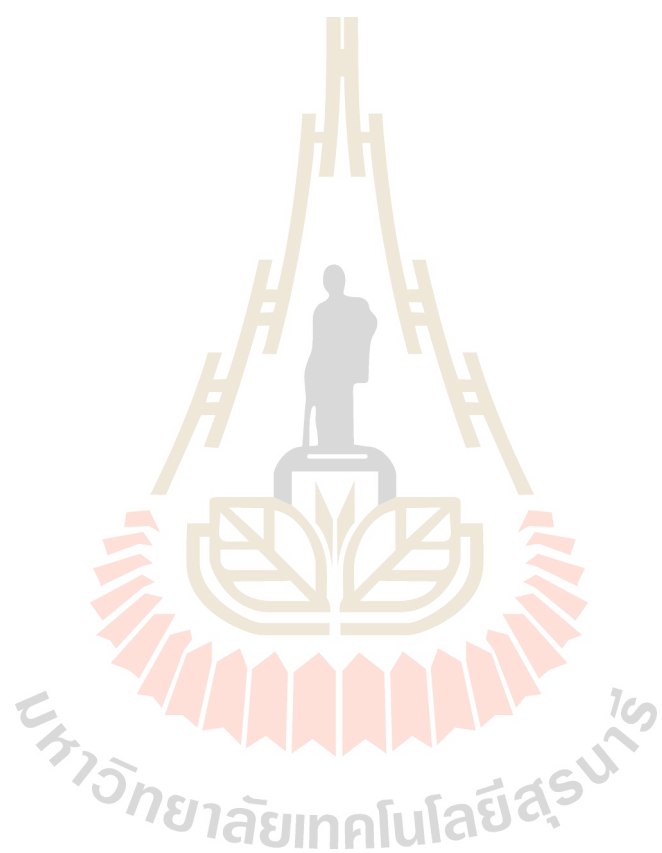
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จิตมนัส นิกากิจ : การพัฒนาสูตรและวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี (DEVELOPMENT OF FORMULATION AND APPLICATION OF *Bacillus subtilis* FOR CONTROLLING SOFT ROT DISEASE OF CHINESE MUSTARD) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธินา เบือนสันเทียะ, 121 หน้า.

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 (CaSUT007) เพื่อควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี (*Brassica juncea*) โดยทำการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อ จำนวน 3 สูตร พบว่า สูตร molasses ผสม diamonium phosphate และ yeast extract (MDY) มีปริมาณเชื้อเพิ่มสูงที่สุดเท่ากับ $1.30 \pm 0.16 \times 10^9$ cfu.ml⁻¹ หลังจาก 48 ชั่วโมง นำสูตรดังกล่าวไปพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์แบบผงแห้งจากการพ่นฝอย (spray dry) ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม และใช้เป็นก้ำเชื้อในการทดสอบวิธีการเพิ่มขยายในอาหารสูตรขยาย 3 สูตร พบว่า สูตรที่สามารถเพิ่มปริมาณก้ำเชื้อได้สูงที่สุดคือ สูตร MDY และที่กรรมวิธีการขยายทุก 6 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่า เชื้อสามารถเพิ่มปริมาณได้เท่ากับ 8.2×10^7 cfu.ml⁻¹ จากการทดลองหาอัตราส่วนของสารชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ พบว่า การใช้สารชีวภัณฑ์สูตร SJN007 อัตราส่วน 0.5 กรัม ต่ออาหารขยาย 1 ลิตร สามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อได้ 1.7×10^8 cfu.ml⁻¹ การทดสอบประสิทธิภาพการทำให้อาหารขยายปลอดเชื้อและลดอัตราการปนเปื้อนจำนวน 5 กรรมวิธี พบว่า กรรมวิธีการเติมสารโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (K₂S₂O₈) ความเข้มข้น 250 ppm ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงก้ำเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเพียง $1.0 \pm 0.14 \times 10^1$ cfu.ml⁻¹ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีมาตรฐานคือ การนิ่งมาเชื้อที่ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ การเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างก้ำเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยายที่เติมสารโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ พบว่า อัตราส่วน 1:10 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.47 \pm 0.86 \times 10^8$ cfu.ml⁻¹ และเมื่อนำเชื้อที่ผ่านการเพิ่มปริมาณจากก้ำเชื้อสูตรสำเร็จมาใช้ในการควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ในผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ในสภาพเรือนทดลอง จำนวน 9 กรรมวิธี พบว่า กรรมวิธีการคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยายจากก้ำเชื้อสูตร SJN007 อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับการฉีดพ่น 3 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10, 20 และ 30 วัน สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรรมวิธีการควบคุมโรคด้วยสารเคมี และสูตรสำเร็จ *Bacillus* ทางการค้า ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคเน่าและได้ เท่ากับ 69 และ 27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อนำตัวอย่างผักกาดเขียวปลีที่ได้จากการทดลองในสภาพเรือนทดลองไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีโดยใช้เทคนิค FT-IR spectroscopy พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของสาร

ในกลุ่มไขมันเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม lipid และ triglycerides (1739 cm^{-1}) กลุ่ม lipids (1460 cm^{-1}) และกลุ่มของ amino acid และ fatty acids (1406 cm^{-1}) และพบว่ามีปริมาณโปรตีน β -sheet protein (1631 cm^{-1}) amide I (1642 cm^{-1}) และกลุ่ม amide II (1560 cm^{-1}) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น และมีการสะสมของ pectin และ lignin จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การใช้ชีวภัณฑ์กล้าเชื้อสูตร SJN007 ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและให้กับผักกาดเขียวปลีได้อย่างมีประสิทธิภาพ





JIDMANUS NIKAJI : DEVELOPMENT OF FORMULATION AND
APPLICATION OF *Bacillus subtilis* FOR CONTROLLING SOFT ROT
DISEASE OF CHINESE MUSTARD. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.
NATTHIYA BUENSANTEAI, Ph.D., 121 PP.

CHINESE MUSTARD/*Bacillus subtilis*/SOFT ROT/*Erwinia carotovora*/
FORMULATION/APPLICATION/FTIR SPECTROSCOPY

The aim of this study was to develop formulation and application of *Bacillus subtilis* strain CaSUT007 to control soft rot disease in Chinese mustard (*Brassica juncea*). The strain CaSUT007 was cultured in 3 different media. It was found that molasses supplemented with diamonium phosphate and yeast extract (MDY) gave the highest concentration of bacteria at $1.30 \pm 0.16 \times 10^9$ cfu.ml⁻¹ after 48 hr. The CaSUT007 was subsequently formulated into a spray dry starter formulation (JN007 bioproduct) under a suitable air temperature. Then, the JN007 starter was cultured in 3 different multiplication media, and the bacterial growth was monitored. It was found that the MDY medium gave the highest concentration of CaSUT007 cells at 8.2×10^7 cfu.ml⁻¹ after 24 h with twice shaking at 6 h. A suitable ratio of the JN007 starter to the multiplication medium was observed at 0.5 g per 1 liter, yielding the cell concentration of 1.7×10^8 cfu.ml⁻¹ after 24 h. Five different decontamination methods were tested to reduce other microbial populations in the multiplication medium. It was found that 250 ppm of potassium metabisulfite could reduce the contamination significantly, having only $1.0 \pm 0.14 \times 10^1$ cfu.ml⁻¹ of other contaminants compared to none when the standard autoclave was used. The ratio of multiplied culture and multiplication media was observed, and it was found that the ratio 1:10 gave maximum

bacterial cell at the concentration of $1.47 \pm 0.86 \times 10^8$ cfu.ml⁻¹. The formulation was further tested for its induced resistance ability against soft rot bacterial pathogen, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* (ECC) in Chinese mustard, MAX018 cultivar under a greenhouse condition. The result revealed that seed soaking combined with root dipping and foliar spray at 10, 20 and 30 days after planting with the multiplication culture of JN007 at the ratio 1:50 showed the significantly highest percentage of disease reduction at 92% compared to those of the chemical and commercial *Bacillus*, which were only 69 and 27%, respectively. Biochemical component changes in the treated Chinese mustard leaves were analyzed at 7 days after the ECC challenged inoculation by FT-IR spectroscopy. The result revealed higher amount of lipid and triglycerides (1739 cm⁻¹), lipids (1460 cm⁻¹), amino acid and fatty acids (1406 cm⁻¹), β -sheet protein (1631 cm⁻¹), protein amide I (1642 cm⁻¹), and amide II (1560 cm⁻¹). The biochemical changes were suggested to associate with pectin and lignin accumulation, making the induced Chinese mustard more resistant to soft rot disease. Therefore, the starter formulation SJN007 of *B. subtilis* strain CaSUT007 can be effectively used to reduce soft rot disease.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2016

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอัลเลาะห์พระเจ้าผู้ทรงสร้างนบีผู้เป็นแบบอย่างที่ดี และอัลกุรอานคือทางนำอันเที่ยงตรง

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา เปือนสันเทียะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ชี้แนะแนวทาง อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างยิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ดร. โสภณ วงศ์แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำ ติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ให้ความเมตตาและคอยอบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษางานบางส่วน

คุณกิตติมา ชาญกิจโกศล และเจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ และคุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาซิน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดุสิต อธิณัฐวัฒน์ ดร.กาญจนา ธรรมนุ คุณรุ่งทิพย์ สังข์เผือก และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ผู้ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่ให้คำปรึกษา คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณบิดา มารดา ป้าป๊า และครอบครัวอันเป็นที่รักยิ่งที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอนและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดี อีกทั้งให้ความช่วยเหลือ และคอยให้กำลังใจทุกเวลาที่เหนื่อยล้าที่ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี

จิตมนัส นิกากิจ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตผักกาดเขียวปลี.....	4
2.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp.....	5
2.2.1 อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของ <i>Bacillus</i> sp.....	6
2.2.2 ลักษณะทั่วไปของ <i>Bacillus</i> sp.....	6
2.2.3 การนำ <i>Bacillus</i> มาใช้ในการควบคุมโรคพืช.....	6
2.3 กลไกของเชื้อ <i>Bacillus</i> ในการควบคุมโรค.....	8
2.3.1 การแข่งขัน (competition).....	8
2.3.2 การทำลายชีวิต (antibiosis).....	9
2.3.3 การเป็นปรสิต (parasitism).....	11
2.3.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced resistance).....	12
2.4 กระบวนการชักนำพืชให้เกิดความต้านทานโรค (induced resistance: IR).....	13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1	กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defenses mechanism)	14
2.4.2	กลไกทางชีวเคมี (biochemical defenses)	15
2.4.2.1	สารเคมีที่พืชผลิตขึ้นก่อนการถูกเข้าทำลาย (pre-existing biochemical defense)	15
2.4.2.2	สารชีวเคมีที่พืชสร้างขึ้นหลังจากการถูกเข้าทำลาย (induced biochemical defense)	15
2.5	ตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดความต้านทาน (IR inducers/ elicitor/activators)	15
2.5.1	เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโต (PGPR) และชักนำความต้านทานพืช	16
2.5.2	สารสังเคราะห์ที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (synthetic resistance inducer)	19
2.5.2.1	Benzo	19
2.5.2.2	กรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA)	20
2.5.2.3	ไทามีน (thiamine)	20
2.5.2.4	กรดจัสโมนิค (jasmonic acid, JA)	20
2.5.3	สารธรรมชาติที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (natural resistance inducer)	21
2.6	การศึกษากลไกการป้องกันตนเองของพืชและองค์ประกอบของเซลล์พืช	22
2.6.1	การศึกษาการกลไกการป้องกันตนเองของพืชด้วยวิธีทางชีวเคมีพื้นฐาน	22
2.6.2	การศึกษาการกลไกการป้องกันตนเองของพืชด้วยวิธีทางชีวเคมี ด้วยเทคนิค infrared (IR) spectroscopy	23
2.7	วิธีการใช้ <i>B. subtilis</i> ในการควบคุมโรคพืช	28
2.7.1	การคลุกหรือเคลือบเมล็ด	28
2.7.2	การแช่รากหรือหัวพันธุ์	29
2.7.3	การโรยหรือราดลงดิน	30
2.7.4	การพ่นทางใบหรือผล	30
2.8	รูปแบบของสูตรสำเร็จ <i>B. subtilis</i> ในการควบคุมโรคพืช	31

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.8.1	สูตรน้ำ (liquid formulate)	31
2.8.2	สูตรแห้ง (dry formulate)	32
2.9	การผลิตแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในรูปแบบของชีวภัณฑ์	33
2.10	การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry)	34
2.10.1	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในระหว่าง การทำแห้งแบบพ่นฝอย	37
2.10.1.1	อายุของเชื้อจุลินทรีย์	38
2.10.1.2	จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนทำแห้ง	38
2.11	ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	39
2.11.1	สารพา (carrier)	39
2.11.2	สารเชื่อม (binder)	39
2.11.3	สารป้องกันเซลล์ (protectant)	40
2.12	การพัฒนาสูตรสำเร็จกล้าเชื้อ <i>B. subtilis</i>	41
2.13	การป้องกันการปนเปื้อนในอาหาร	42
2.13.1	วิธีทางกายภาพ (physical method)	42
2.13.1.1	การใช้ความร้อนแห้ง (dry heat)	42
2.13.1.2	การใช้ความร้อนชื้น (moist heat)	43
2.13.1.3	การใช้รังสี (radiation)	44
2.13.1.4	การกรอง (filtration)	44
2.13.2	วิธีทางเคมี (chemical method)	44
3.	วิธีดำเนินงานวิจัย	47
3.1	การพัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	47
3.1.1	การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	47
3.1.2	การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> โดยวิธีอบแห้ง แบบพ่นฝอย (spray dry)	47
3.1.3	การประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ที่ผลิตโดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย	48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2	การพัฒนาวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	48
3.2.1	ทดสอบสูตรอาหาร อัตราส่วน และวิธีการเขย่าที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อ	48
3.2.2	การทดสอบวิธีการทำให้อาหารสูตรขยาย ปลอดเชื้อ และเปรียบเทียบปริมาณอัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (mortification media)	49
3.2.3	การทดสอบการเพิ่มปริมาณของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 ที่ผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยในระดับการทดลองขนาดกลาง	49
3.2.4	การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักสูตรเกษตรกรรมในการใช้เป็นอาหารสูตรขยาย	50
3.2.5	การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัตราการใช้เชื้อขยายที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคเน่าและในระยะกล้าของผักกาดเขียวปลี	50
3.2.6	การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรค	51
3.2.7	ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางองค์ประกอบของเซลล์ผักกาดเขียวปลีด้วยเทคนิค Infrared (IR) Spectrometer	52
3.3	การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ	53
4.	ผลการทดลอง	54
4.1	การพัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	54
4.1.1	การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	54
4.1.2	การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> โดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry)	55
4.1.3	การประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ที่ผลิตโดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย	57
4.2	การพัฒนาวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	59
4.2.1	ทดสอบสูตรอาหาร อัตราส่วน และวิธีการเขย่าที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์	59

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2	การทดสอบวิธีการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยายเปรียบเทียบ ปริมาณอัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (mortification media).....	62
4.2.3	การทดสอบการเพิ่มปริมาณของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 ที่ผ่านกระบวนการอบแห้งแบบ พ่นฝอยในระดับการทดลองขนาดกลาง.....	66
4.2.4	การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักสูตรเกษตรกรรมในการ ใช้เป็นอาหารสูตรขยาย.....	67
4.2.5	การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัตราการใช้เชื้อขยายที่เหมาะสม ต่อการควบคุมโรคเน่าและในระยะกล้าของผักกาดเขียวปลี.....	68
4.2.6	การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรค.....	70
4.2.7	ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางองค์ประกอบของเซลล์ผักกาดเขียวปลี ด้วยเทคนิค Infrared (IR) Spectrometer.....	73
5.	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	76
	รายการอ้างอิง.....	96
	ภาคผนวก.....	116
	ประวัติผู้เขียน.....	121

สารบัญตาราง

หน้า

1	แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานนำมาใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำภูมิคุ้มกันต้านทานพืชเพื่อควบคุมโรค.....	19
2	แสดงลักษณะของการดุดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล.....	27
3	รูปแบบชีวภัณฑ์ <i>Bacillus</i> ที่ผลิตในเชิงการค้าเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชเป้าหมายแต่ละชนิด.....	34
4	ประเภทของสารชีวภัณฑ์และสารที่ใช้ผสมในชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> sp.....	41
5	ปริมาณ PMS ที่ใช้ในโวน์ชนิดต่าง ๆ.....	46
4.1	การเพิ่มประชากรของเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร.....	54
4.2	ปริมาณการรอดชีวิตของประชากรของเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ในกระบวนการฟ่นฝอยทั้ง 3 อุณหภูมิ.....	57
4.3	แสดงการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 สูตร spray dry ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน.....	58
4.4	การปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 เป็นเวลา 6 เดือน.....	59
4.5	ประสิทธิภาพของสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อแบคทีเรียของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007.....	61
4.6	ผลของอัตราส่วนสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อแบคทีเรียของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007.....	61
4.7	ประสิทธิภาพของวิธีการแช่ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อแบคทีเรียของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007.....	62
4.8	ประสิทธิภาพของวิธีการฆ่าเชื้ออาหารสูตรขยาย.....	63
4.9	การเปรียบเทียบปริมาณอัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (mortification media).....	65
4.10	คะแนนการเกิดโรคและดัชนีการยับยั้งโรคเน่าละในผักกาดเขียวปลีควบคุมโรคด้วยชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ด้วย วิธีและอัตราต่างกัน.....	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

4.11 คะแนนการเกิดโรคและดัชนีการยับยั้งโรคเน่าละในผักกาดเขียวปลีควบคุม	
โรคด้วยชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ด้วยวิธีและอัตราต่างกัน.....	71
5.1 ประเภทของสารชีวภัณฑ์และสารที่ใช้ผสมในชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณ <i>Bacillus</i> spp.....	81

ตารางภาคผนวกที่

1	แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 กับเวลา (ชั่วโมง) ในการเพิ่มปริมาณ.....	118
2	แสดงเปรียบเทียบปริมาณเชื้อเริ่มต้นของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 ต่ออัตราส่วนชีวภัณฑ์.....	119
3	เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง nutrient glucose broth (NGB) และ molasses diamonium phosphate and yeast extract (MDY).....	120
4	ต้นทุนการผลิตสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007.....	120

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

1	ลักษณะการแข่งขัน (competition) ของเชื้อ <i>B. subtilis</i>	9
2	ลักษณะการทำลายชีวิต (antibiosis) ของเชื้อ <i>B. subtilis</i>	11
3	การเป็นปรสิต (parasitism) ของเชื้อ <i>B. subtilis</i>	12
4	การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced resistance).....	13
5	กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defenses mechanism).....	14
6	แสดงลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล.....	26
4.1	ลักษณะโคโลนีและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X ของเชื้อแบคทีเรีย ที่มีประโยชน์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ.....	55
4.2	ลักษณะชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 ของสูตรที่ 2 ที่ผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	56
4.3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 ในผลิตภัณฑ์ spray dry ประเมินทุกเดือนในสภาพอุณหภูมิห้อง.....	58
4.4	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยาย.....	64
4.5	แสดงการทดสอบความเหมาะสมของอัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อ (starter) กับ อาหารสูตรขยาย (murtification media).....	65
4.6	การทดสอบสูตรอาหาร Molasses diamonium phosphate and yeast extract (MDY) ในการเพิ่มปริมาณของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	66
4.7	ภาพแสดงการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักสูตรเกษตรกรในการใช้เป็นอาหาร สูตรขยาย.....	67
4.8	แสดงลักษณะอาการของโรคเน่าและผักกาดเหี่ยวปสีหลังจากการทดสอบเพื่อหา ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคจนถึงระยะเก็บเกี่ยวและหลังปลูก เชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>Carotovora</i>	72
4.9	ผลการทำ Second derivative ของผักกาดเหี่ยวปสีที่ถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 (SJN 007) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในช่วงความยาวคลื่น 2005-759 cm ⁻¹	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

4.10 ผลการวิเคราะห์ Principal component analysis (PCA) เพื่อสร้างแบบจำลองฐานข้อมูล ของผักกาดเขียวปลีที่ถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 (SJN 007) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม	75
5.1 วิธีพัฒนาการชีวภัณฑ์และเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	80
5.2 ขั้นตอนการพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์	91
5.3 การพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อม	93
5.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณและการนำไปใช้ของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ เชื้อแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007	94
5.5 ตัวอย่างชีวภัณฑ์สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007	95
 ภาพภาคผนวกที่	
1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กับจำนวนเซลล์ (Log of cell (cfu.ml ⁻¹) ของเชื้อ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007	118
2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 กับเวลา (ชั่วโมง) ในการเพิ่มปริมาณ	119

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำความต้านทานพืช (Plant growth promoting rhizobacteria : PGPR) ถูกนำมาวิจัยและประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันกำจัดโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. เนื่องจากมีกลไกที่สำคัญ อาทิ การสร้างสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชแบบกระจายทั่วทั้งต้น (induced systemic resistance : ISR) (สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2552; นลินา เหมสนิท และคณะ, 2552; Kloepper et al., 2004; Choudhary et al., 2009) ในประเทศไทยได้มีการศึกษาการใช้ *B. subtilis* จำนวนหลายสายพันธุ์และมีการวิจัยสูตรสำเร็จชนิดต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *B. subtilis* เช่น สูตรน้ำ สูตรผงแห้ง สูตรเม็ด แต่ยังไม่มีการใช้แพร่หลายนัก (อัจฉรา เฟื่องหนู, 2550; กุศล ถมมา, 2556; Jayaraj et al., 2006) ซึ่งเชื้อ *Bacillus* ดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. licheniformis* สายพันธุ์ SP009s มาทำการคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นต้นกะหล่ำดอก พบว่า เชื้อดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและลดความรุนแรงของโรคเน่าและได้ 84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (วิลาวรรณ เชื้อบุญ และคณะ, 2551) นอกจากนี้ การใช้ *B. firmus* ควบคุมโรคใบจุดบนของถั่วเหลืองได้โดยลดความรุนแรงของโรค 37.4-51.3 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มผลผลิต 5.60-22.44 เปอร์เซ็นต์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี (สุพจน์ กาเซ็ม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2546) และในปี 2557 ชานนทร์ แสงจันทร์ ได้ทำการศึกษาการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ร่วมกับฉีดพ่นกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 200 ppm สามารถลดการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ 47.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในรูปเซลล์สด (fresh culture) และสูตรหัวเชื้อชนิดผงผสมสารพา (powder formulation) ซึ่งจะมีอายุการเก็บรักษาสั้น และเมื่อนำไปใช้จริงในสภาพไร่ของเกษตรกรพบว่า ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชลดลง เนื่องจาก 1) ความไม่คงตัวของผลิตภัณฑ์ 2) เชื้อมีจำนวนลดลงระหว่างการเก็บรักษาส่งผลให้ปริมาณเชื้อไม่

เพียงพอที่จะควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นงานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาวิธีการผลิตหัวเชื้อ (inoculum) ในรูปผงแห้ง แล้วนำไปเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (starter medium) เพื่อกระตุ้นการเจริญและเพิ่มปริมาณ จากนั้นจึงใช้หัวเชื้อที่ผลิตได้ไปเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรขยาย (multiplication media) เพื่อให้ได้ปริมาณมากพอในอาหารก่อนนำไปใช้ฉีดพ่นในสภาพไร่อต่อไป วิธีการปฏิบัติลักษณะนี้คล้ายกับขั้นตอนการผลิตน้ำหมักชีวภาพที่เกษตรกรมีประสบการณ์ในการใช้อยู่แล้ว ดังนั้นการนำหัวเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในรูปแบบแห้งมาเพิ่มปริมาณในอาหารสูตรจำเพาะ จึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจในการที่จะเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยในการทดลองนี้จะทดสอบในผักกาดเขียวปลีเพื่อควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เหมาะสมในรูปแบบผงแห้งด้วยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry)
2. เพื่อศึกษาวิธีการใช้ชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้เหมาะสมจะสามารถเพิ่มปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อจากกระบวนการผลิตแบบแห้งได้
2. วิธีการใช้ชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและให้กับผักกาดเขียวปลีได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงการพัฒนาชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 โดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย พัฒนาวิธีการใช้ที่เลียนแบบกระบวนการหมัก และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและผักกาดเขียวปลีที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ในสภาพโรงเรือนทดลอง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เหมาะสมในรูปแบบผงแห้งด้วยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย
2. ทราบวิธีการใช้ชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ที่มีประสิทธิภาพ



บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตผักกาดเขียวปลี

ผักกาดเขียวปลี (*Brassica juncea* L.) มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย (Tindall, 1968; Bantoc, 1970) ชื่อสามัญมีหลายชื่อ ได้แก่ Leaf mustard หรือ Indian mustard หรือ Chinese mustard (เต็ม สมิตินนทน์, 2544) หรือ Swatow mustard (เกษม พิสิก, 2524) การผลิตผักกาดเขียวปลีในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามวัตถุประสงค์ของการผลิต คือ ผักสด เมล็ดพันธุ์ และผักดองหรือผักแปรรูป ซึ่งผักกาดดองบรรจุกระป๋องเป็นสินค้าผักแปรรูปอีกรายการหนึ่งที่มีความนิยม ซึ่งในระยะแรกจะเป็นการดองในระดับครอบครัว และเริ่มมีการขยายตัวของบริษัทผู้ผลิตผักดองหลายราย โดยมีมูลค่าการขายผักดองกระป๋องภายในประเทศประมาณ 950 ล้านบาทต่อปี แต่ต่อมาความต้องการในตลาดสูงขึ้นมีการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าสถานการณ์การส่งออกในปี 2558 มีการส่งออกผักกาดดองเปรี้ยวไปยังทวีปยุโรปและอเมริกา มากกว่า 90 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีการรับซื้อไม่ต่ำกว่า 300 ล้านบาท เพิ่มขึ้นปีละไม่ต่ำกว่า 10-15 เปอร์เซนต์ (สุรัช ไซนิคย์, 2558) ในปัจจุบันระบบการผลิตผักกาดเขียวปลีของเกษตรกรมักประสบปัญหาการเข้าทำลายของโรคพืชต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากการปลูกพืชเดิมติดต่อกันเป็นเวลานานทำให้เกิดการสะสมของโรค โดยโรคที่สำคัญโรคหนึ่งคือ โรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* (New name: *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum*) (วิลาวรรณ เชื้อบุญ, 2551; Hauben et al., 1999) โรคดังกล่าวนี้สามารถเกิดได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยก่อนเก็บเกี่ยวสามารถเข้าทำลายพืชร่วมกับการเข้าทำลายของแมลง เช่น หนอนกระทู้ผัก ค้างคาวหัวผัก และร่วมกับโรคอื่นๆ อาทิ โรคเน่าคอดิน รา น้ำค้าง (ไทยเกษตรศาสตร์, 2555; Zhao et al., 2013) ส่วนหลังเก็บเกี่ยวสามารถเข้าทำลายโดยเข้าทางบาดแผลที่เกิดจากการเก็บเกี่ยวผลผลิต ทำให้ผลผลิตลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพมากกว่า 50 เปอร์เซนต์ ของผลผลิตทั้งหมด ภายในระยะเวลาเพียง 6-24 ชั่วโมงหลังจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าทำลาย (ไทยเกษตรศาสตร์, 2556) นอกจากนี้ เชื้อยังสามารถสะสมอยู่ในดินและเศษซากพืชที่เป็นโรคได้เป็นเวลานาน (ข้าวเดือนการระบาดศัตรูพืชประจำสัปดาห์, 2553) และมีรายงานพบว่า มีการระบาดทั่วไป และสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ทำให้มีการระบาดไปสู่พื้นที่ใหม่ (Zhao et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีแมลงบางชนิดที่ นอกจากเป็นตัวช่วยแพร่กระจาย เชื้อแล้วยังเป็นที่อาศัยอยู่ข้ามฤดูของเชื้อ (Doane and Chapman, 1964) การป้องกัน โรคเน่าและนั้นเกษตรกรมีการใช้สารเคมีในการ

ควบคุมโรค เช่น copper hydroxide อัตรา 30-50 กรัม ผสมน้ำ 20 ลิตรฉีด พ่นป้องกันโรคทุก ๆ 7-10 วัน (ชนวน รัตนวราหะ, 2537 ; ศศิธร วุฒิวิเศษย์, 2545) ซึ่งมีรายงานว่าถ้าหากเชื้อโรคพืชโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย ได้รับสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะมีความต้านทานต่อสารเคมีชนิดนั้นได้ในที่สุด (Burr et al., 1988) แต่การใช้สารเคมีมากเกินไปจนความจำเป็น และผิดวิธี ก่อให้เกิดปัญหาด้านทุนการผลิตสูง ปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตซึ่งส่งผลกระทบต่อ การส่งออก เป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้ ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม เนื่องจากผู้ผลิตและผู้บริโภคจะคำนึงถึง สุขอนามัย ความปลอดภัยและมลพิษในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น

2.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณต์สกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มที่ได้รับความนิยมในอันดับต้น ๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ที่ทนทานต่อสารเคมี รังสี และความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ปกติ เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีความทนต่ออุณหภูมิ ช่วงกว้างตั้งแต่ -5 ถึง 75 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ใน pH 2-8 ทนความเค็มของเกลือ NaCl ได้ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ แบคทีเรียสกุล *B. subtilis* ยังมีกลไกการเป็นปฏิบัณต์ที่สำคัญหลายรูปแบบ เช่น สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ได้โดยสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin เป็นต้น สารเหล่านี้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้นอกจากนั้นยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ glucanase ที่สามารถย่อยสลาย glucans และ chitinase ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้ แบคทีเรียสกุล *Bacillus subtilis* บางชนิดเมื่ออยู่ในสภาพที่ขาดธาตุเหล็ก จะสามารถสร้างสาร siderophore ได้ ซึ่งสารดังกล่าว จะไปจับกับ ferric iron แล้วเคลื่อนย้ายเข้าสู่ตัวรับ (receptor) ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งจะรบกวนกระบวนการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อยู่บริเวณเดียวกัน ทำให้การเกิดโรคของพืชลดลงนอกจากนี้ ยังพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. หลายชนิด เป็น PGPR ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ข้าวฟ่าง พริก มะเขือเทศ และในพืชตระกูลกะหล่ำ เป็นต้น (สุตฤดี ประเทืองวงศ์, 2552; กฤติเดช อนันต์ และคณะ, 2559; Rajet et al., 2003; Domenech et al., 2006; Kumar et al., 2011)

2.2.1 อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของ *Bacillus* sp.

Subkingdom : Firmicutes

Division : Bacilli

Order : Bacillales

Family : Bacillaceae

Genus : *Bacillus*

Species : *Bacillus subtilis*

Binomial name : *Bacillus subtilis*

2.2.2 ลักษณะทั่วไปของ *Bacillus* sp.

Bacillus คือ แบคทีเรีย (bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) อยู่ในวงศ์ Bacillaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ Clostridium และ Desulfotomaculum เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flagella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) แต่บางชนิดเป็น facultative anaerobe เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) ที่สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) สปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) ของ *Bacillus* จะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี (ภัทรชัย กิริตสิน, 2551; Frandberg et al., 1994; Brooks et al., 2015)

Bacillus เป็น proteolytic bacteria มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโน เป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) และทำให้อาหารที่เน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็นของ *B. subtilis* จะเป็นแบบท่อนและอาจมีลักษณะยื่นเป็นสักริมถึงสีน้ำตาล (ภัทรชัย กิริตสิน, 2551; Frandberg et al., 1994; El-Hassan and Gowen, 2006; Brooks et al., 2015)

2.2.3 การนำ *Bacillus* มาใช้ในการควบคุมโรคพืช

มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำ *B. subtilis* มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคโดยชีววิธีและการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งมีความสำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรเพื่อเป็นการลดปัญหาการใช้สารเคมีในพืชได้เป็นอย่างดีโดย ในปี 1996 Asaka and Shoda ได้ศึกษา *B. subtilis* สายพันธุ์ RB14 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชคือสารปฏิชีวนะ iturin A และ surfactin ซึ่งพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคโคนเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ในมะเขือเทศ Brian et al., (2002) ได้ทำการศึกษากการฆ่าเหล่าโดยใช้สารเคมีทำให้ได้ *Bacillus* สายพันธุ์ M04 ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้ง *Botrytis cinerea* (grey mould), *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt) และ *E. carotovora* pv. *carotovora* (bacterial soft rot) และพบสร้างสารปฏิชีวนะเมื่อทดสอบทางเคมีและคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะแล้ว พบว่าเป็นสารพวก

extracellular ที่ทนความร้อนได้และสามารถละลายได้ใน methanol สารนี้ดูคล้ายคลึงแสงที่ 212 นาโนเมตร ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับกลุ่ม cyclic antibiotic lipopeptides เช่น iturin และในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการใช้ *Pseudomonas fluorescens* SP007s และ *B. subtilis* SP009s ในการควบคุมโรคเน่าและ โรคขอบใบทอง โรคเน่าคอดิน และโรคใบจุด *Alternaria* ของกะหล่ำดอก โดยสามารถลดความรุนแรงของโรคเน่าและ โรคขอบใบทอง โรคเน่าคอดิน และโรคใบจุด *Alternaria* ของกะหล่ำดอก 52.6, 75.0, 28.0 และ 79.7 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มน้ำหนักสด ความสูงต้น และความยาว ใบเฉลี่ย 82.5, 21.0 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และให้ผลผลิตรวมเพิ่มขึ้น 41.7 เปอร์เซ็นต์ (วิลาวรรณ และคณะ, 2549; วิลาวรรณ และคณะ, 2550; Prathuangwong et al., 2004; Prathuangwong et al., 2005) และการใช้ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. pabuli* SW01/4 ลดความรุนแรงของโรคเน่าและ โรคขอบใบทอง และโรคใบจุด *Alternaria* sp. ของพืชตระกูลกะหล่ำ 43.0, 52.0 และ 45.0 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มน้ำหนักสด ความสูงต้น และความยาวใบเฉลี่ย 91.0, 45.5 และ 39.8 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตรวมเพิ่มขึ้น 30.8 เปอร์เซ็นต์ (Prathuangwong et al., 2004, Prathuangwong et al., 2006a; Prathuangwong et al., 2006b) นอกจากนี้ Cho et al. (2003) ได้ศึกษาเชื้อที่แยกได้จากฟางข้าว พบว่าเป็น *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 สามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพที่ยับยั้งโรคแอนแทรกคโนสจากเชื้อรา *Gloeosporium gloeosporioides* และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 ไปทำการแยกบริสุทธิ์พบว่า สารที่ให้ผลการยับยั้งคือสารปฏิชีวนะ iturin A2 นอกจากนี้ Swain et al. (2006) และ Liu et al. (2006) ยังพบว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดถั่ว *Cicerarietinum* สามารถส่งเสริมความยาวราก 70–74 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และคณะ (2549) ได้ศึกษาแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้พืชต้านทานต่อโรคสำคัญหลายชนิด รวมทั้งเพิ่มคุณภาพให้ผักถั่วเหลืองสมบูรณ์ได้มาตรฐานส่งออก โรคเหล่านั้นได้แก่ ใบจุดหนูน ราน้ำค้าง แอนแทรกคโนส (ผักเป็นรอยเปื้อน) เน่าคอดิน โคนเน่า และโรคเหี่ยว โดยเฉพาะโรคไวรัส (SMV และ SCLV) ที่สร้างความเสียหายให้ถั่วเหลืองผักสดเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ในปี 2551 ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 ที่คัดเลือกได้จากดินบริเวณรอบรากถั่วเหลือง ที่สามารถควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิดทั้งในสภาพเรือนทดลองและแปลงปลูก โดยศึกษาอิทธิพลที่เกี่ยวกับกระบวนการส่งเสริมการเจริญเติบโต และชักนำความต้านทานในถั่วเหลือง พบว่า เมื่อปลูกเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ด้วยเชื้อสายพันธุ์ KPS46 สามารถเพิ่มความยาวราก ความยาวต้น น้ำหนักสดและเพิ่มน้ำหนักแห้งมากกว่า 20-40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และเมื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยการชักนำให้ถั่วเหลืองพันธุ์ Spencer เกิดความต้านทานต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* พบว่า ถั่วเหลืองที่เจริญมาจากเมล็ดที่ผ่านการคลุกก่อนปลูกด้วยเชื้อ KPS46 มีการสะสม defense related proteins ที่มี

ความสามารถในการยับยั้งพัฒนาการของโรคใบจุด เช่นเดียวกับ ชานนทร์ แสงจันทร์ (2557) ได้ทำการศึกษาการใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ในการควบคุมโรคเน่าและผกาดเหี่ยวปาล์ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 มีคุณสมบัติในการชักนำความต้านทานและลดการเกิดโรคได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและในแปลงปลูกของบริษัทสันติภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี และในงานวิจัยของ กฤติเดช อนันต์และคณะ (2559) ได้มีการใช้ *B. subtilis* TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทอง และใบจุดอัลเทอร์นาเรีย พบว่า TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *X. compestris* pv. *compestris* (Xcc) และ *Alternaria* sp. โดยแสดงบริเวณยับยั้ง 5.0-5.1 มิลลิเมตร และ 80.0-83.3 เปอร์เซ็นต์ Berger et al. (1996) รายงานว่า การใช้ เชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพืชสกุล photinia และ brassica

2.3 กลไกของเชื้อ *Bacillus* sp. ในการควบคุมโรค

การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธีอาจจะเกิดบริเวณที่ห่างจากพืชอาศัยบนหรือในส่วนต่าง ๆ ของพืชอาศัยได้ แม้ว่าแนวทางหลักของวิธีการนี้มักขึ้นอยู่กับบทบาทของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นส่วนใหญ่ก็ตามโดยเชื้อจะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้มี 4 ลักษณะดังนี้

2.3.1 การแข่งขัน (competition) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่นการใช้ธาตุอาหารอากาศและการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโตหรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรงมีผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบมาก คือ การแข่งขันโดยการแย่งชิงอาหารเป็นลักษณะของ biocontrol agent ที่จะไปลดปริมาณสารอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อโรค เนื่องมาจาก biocontrol agent เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการใช้อาหารหรือมีความสามารถในการเจริญเร็วมาก ดังแสดงในภาพที่ 1 ชนิดของอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ดิน และพืชอาศัย ซึ่งได้แก่ ธาตุหลัก คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน และ micronutrient มีการศึกษาพบว่า แบคทีเรียกลุ่ม Fluorescent และ Pseudomonads มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้หลายชนิดและเจริญบริเวณรากพืชได้รวดเร็ว และแข็งแรงในตำแหน่งของการยึดเกาะ (site of infection) เป็นกลไกสำคัญของการยับยั้งเชื้อที่ทำลายราก และกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (อุไรจนา กลกิกรมพิบูลย์, 2534) เช่น เชื้อ *P. fluorescent* จะผลิตสาร siderophore ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรค Take-all ของข้าวสาลี ทำให้เชื้อราไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลีช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ และให้ผลผลิตดีขึ้น และพบว่า เชื้อ *B. cereus* UE8 สามารถตรึงธาตุแคลเซียมจากดินมาใช้ในการสร้างสปอร์ในเซลล์แล้วยัง

ปลดปล่อยแอมโมเนียออกมาทำให้สภาพดินเป็นด่าง ทำให้เชื้อ *Phytophthora* spp. ไม่สามารถสร้าง zoospore ได้ (Gilbert et al., 1990)



ภาพที่ 1 ลักษณะการแข่งขัน (competition) ของเชื้อ *B. subtilis*
(ที่มา : Bautista et al., 2014)

2.3.2 การทำลายชีวิต (antibiosis) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้นจะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่โดยเชื้อปฏิปักษ์นี้มีความสามารถในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (Toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งเป็นการสร้างผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งมักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ในประเทศบราซิลมีรายงานการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* PBRS-1 และ *B. subtilis* AP-3 เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของถั่วเหลือง 5 ชนิด ได้แก่ *Ralstonia solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* และ *Phomopsis* sp. และยังพบว่า *Bacillus* ดังกล่าวนี้อาจสามารถผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่ม iturin ได้ โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* มีการสร้าง antibiotic ได้มากกว่า 60 ชนิด และมีความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในพืชหลากหลายชนิด เช่น *B. subtilis* ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในข้าว พืช ถั่วเหลืองและพืชตระกูลแตง ได้แก่ ชูโกนี และ สควอช เป็นต้น (Araujo et al., 2005) และเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* A-13 ที่สร้างสารปฏิชีวนะสารซึ่งออกฤทธิ์กว้างโดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ถึง 9 ชนิด นอกจากนี้ ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อีกหลายชนิดที่ผลิตสารปฏิชีวนะหรือสารพิษ (toxin) ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ สารเมตาโบไลต์ในกลุ่ม lipopeptide ที่สร้างโดยแบคทีเรีย *Bacillus* และ *Pseudomonas* มีบทบาทช่วยให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถแข่งขันกับสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่บริเวณเดียวกัน เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว ไส้เดือนฝอย และพืช โดยสารดังกล่าวมีบทบาทเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ช่วยในการครอบครองพื้นที่อาศัยใหม่ และมีหน้าที่สร้างและพัฒนา biofilm (Raaijmakers et al.,

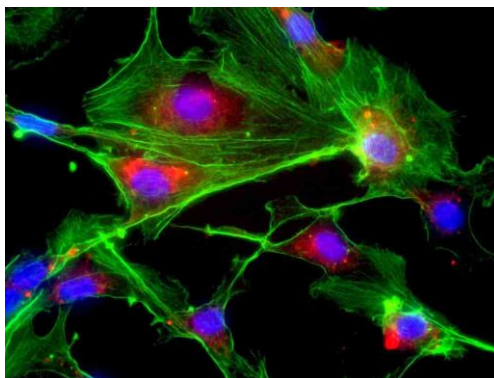
2010) อย่างไรก็ตาม การผลิตสารเหล่านี้ แบคทีเรียต้องการสภาพที่เหมาะสม และกิจกรรมของสารปฏิชีวนะยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น จากการศึกษาสารปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ iturin A และ surfactin พบว่า surfactin มีความคงทนอยู่ในดินได้ดีกว่า iturin A ซึ่งความไม่คงตัวของสารดังกล่าว มีสาเหตุมาจากการถูกชะล้างออกจากดินระหว่างการให้น้ำ จากกิจกรรมการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ และเกิดจากองค์ประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ในดิน เช่น กรดฮิวมิก เป็นต้น (Manjula et al., 2005) ต่างกับงานวิจัยของ Ting และคณะ (2009) ที่นำสารเมตาโบไลต์ ของ *B. pumilus* strain BSH-4 มาทดสอบในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae*, *A. solani* และ *R. solani* โดยพบว่า ให้ผลยับยั้งได้ดีในสภาพห้องปฏิบัติการ และเมื่อทดสอบความเสถียร (stable) ของสาร พบว่าสารดังกล่าวมีความเสถียรสูง แม้ผ่านความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และยังทนต่อรังสี UV นานถึง 10 ชั่วโมง และยังคงประสิทธิภาพอยู่ใน pH ตั้งแต่ 6-8 จากความแปรปรวนของสารเมตาโบไลต์แบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละชนิดนี้เอง เป็นสาเหตุให้การใช้จุลินทรีย์ปฏิชีวนะแต่ละครั้งให้ผลการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ไม่แน่นอน ในปี 1996 Asaka and Shoda ได้ศึกษา *B. subtilis* สายพันธุ์ RB14 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชคือ สารปฏิชีวนะ iturin A และ surfactin ซึ่งพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคโคนเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ในมะเขือเทศ นอกจากนี้ Sharga (1998) พบว่าในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ BS107 สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะในช่วงแรกของการเจริญเติบโตและจะสร้างสารปฏิชีวนะสูง สุดเมื่ออาหารใกล้หมดสาร ปฏิชีวนะที่ *B. subtilis* สายพันธุ์ BS107 สร้างขึ้นมีฤทธิ์ต้านทานปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease), โปรติเอส (Protease) และไลเปส (Lipase) นอกจากนี้ ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *E. carotovora* sub sp. *atroseptica* และ *E. carotovora* sub sp. *carotovora* เมื่อใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ BS107 หรือสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นนำไปใช้บริเวณรอยตัดมันฝรั่งจะช่วยป้องกันและลดอาการโรคได้ เมื่อสกัดสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นนี้ออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บไว้ได้นานมากกว่า 1 ปี



ภาพที่ 2 ลักษณะการทำลายชีวิต (antibiosis) ของเชื้อ *B. subtilis*

(ที่มา : https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=antibiosis&lang=1)

2.3.3 การเป็นปรสิต (parasitism) เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) เข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบได้ไม่มากนัก การใช้ควบคุมโรคพืช ยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนปฏิกิริยาแบบการทำลายชีวิต เช่น พบว่าโรคโคนเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* เมื่อควบคุมด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ RB14-C และสารเคมีที่ใช้ฆ่าแมลงและศัตรูพืช ซึ่งมีชื่อว่า flutolanil พบว่าการใช้ร่วมกันระหว่าง *B. subtilis* สายพันธุ์ RB14-C และสาร flutolanil สามารถลดการใช้สารเคมี flutolanil จากปกติที่ต้องใช้ 375 ไมโครกรัมต่อกระถาง ลดลงเหลือเพียง 94 ไมโครกรัมต่อกระถาง แต่ยังคงความสามารถในการลดการเกิดโรคได้เท่าเดิมสำหรับการทดลองระดับโรงเรือน (Kondoh et al., 2000) นอกจากนี้ ศุภลักษณ์ มณีแสง และคณะ (2551) ได้ศึกษา *Bacillus* sp. จำนวน 503 ไอโซเลตจากดินรอบโคนต้น และใบของถั่วฝักยาวทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Cercospora cruenta*, *Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. พบว่า *B. megaterium* สายพันธุ์ HT-NK-460 และ *B. brevis* สายพันธุ์ TZ-CP-342 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. cruenta*, *U. vignae* และ *Oidium* sp. ได้สูง 97.22–100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำ *B. subtilis* ทั้ง 2 ไอโซเลตมาชักนำให้กลายพันธุ์ด้านสารปฏิชีวนะ rifampicin เพื่อใช้ติดตามจำนวนประชากรที่พ่นลงบนต้นถั่วฝักยาว พบว่า *B. subtilis* ทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ 35.85–65.52 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพผลผลิตถั่วฝักยาวเพิ่มขึ้น

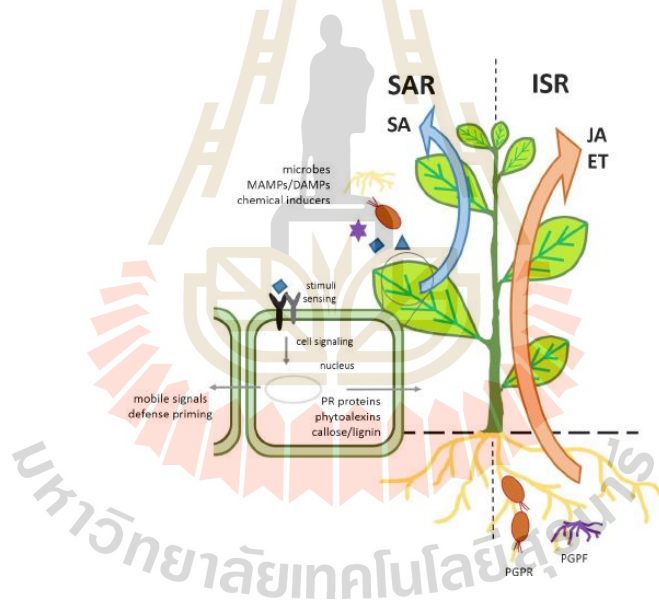


ภาพที่ 3 การเป็นปรสิต (parasitism) ของเชื้อ *B. subtilis*

(ที่มา : <http://www.yourarticlelibrary.com/bacteria/useful-notes-on-parasitic-saprophytic-and-symbiotic-bacterias/6791/>)

2.3.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced resistance) พืชสามารถสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้เมื่อได้รับการชักนำจากอีลิซิเตอร์ (elicitor) สามารถทำได้โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์เป็นตัวกระตุ้นซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถชักนำกระบวนการป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคพืช ด้วยกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์พืช (สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2550) ส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์และสารชีวเคมีเพื่อปกป้องตนเองของพืช (defense mechanism) และสร้างโครงสร้างพิเศษเพื่อป้องกันตัวขึ้น ได้แก่ การสร้างผนังเซลล์ใหม่ cellulose และ hemicelluloses เพิ่มขึ้น ทำให้พืชมีความทนทานต่อการทะลุผ่านมากขึ้น การสร้างเนื้อเยื่อพิเศษ (cork layers) เพื่อปกคลุมและจำกัดขอบเขตแพร่กระจายของเชื้อไปยังส่วนอื่น ๆ การสะสมยางเหนียว (gums) จะยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อโรคบางชนิดและการสร้าง abscission layer เพื่อป้องกัน แพร่กระจายของเชื้อ (Agrios, 1997) มีรายงานของ Shetty et al. (2009) ศึกษาการใช้ β -1,3-glucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเชื้อรา *Septoria tritici* สาเหตุโรคใบจุดในข้าวสาลี พบว่า มีการสะสม callose ในผนังเซลล์และเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ เชื้อ *B. subtilis* ยังมีความสามารถในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) โดยการผลิตสาร toxic metabolite บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการชักนำหรือกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia sclerotium* (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2535) นอกจากนี้ ชานนทร์ แสงจันทร์ (2557) มีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก จำนวน 4 ความเข้มข้นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ด้วยวิธี blotter method พบว่าไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ด ความยาวรากและความสูงของต้นกล้าผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด และ

ศึกษาประสิทธิภาพและกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตจากสิ่งกระตุ้นในผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่าการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดซัลฟิวริก 200 ppm จำนวน 5 ครั้ง ทำให้พืชมีความกว้างทรงพุ่มความสูงทรงพุ่ม และปริมาณของหัวสูงที่สุด Bargabus และคณะ (2002) รายงานว่าเมื่อใช้ *B. mycoides* strain Bac J. และ *B. pumilus* strain 203-6 กับ sugar beet แล้วทำให้พืชเพิ่ม peroxidase, chitinase และ β -1, 3-glucanase นอกจากนี้ ยังมีรายงานที่ระบุว่า แบคทีเรีย *Bacillus* หลายชนิดสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานได้ เช่น *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* และ *B. sphaericus* ซึ่งช่วยลดการเกิดโรคและความรุนแรงในการเกิดโรคของพืชหลายชนิด ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อรา โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ไส้เดือนฝอยรากปม โรคโคนเน่า โรคลำต้นและใบไหม้ เป็นต้น (Kloepper et al., 2004) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า การเติม *B. pumilus* ลงในดินปลูกสามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อไวรัส Cucumber mosaic virus ในมะเขือเทศลงได้ (Zehnder et al., 2000)



ภาพที่ 4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced resistance)

(ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/271389442_fig1_Fig-1-Scheme-of-different-types-of-systemic-resistance-The-systemic-acquired)

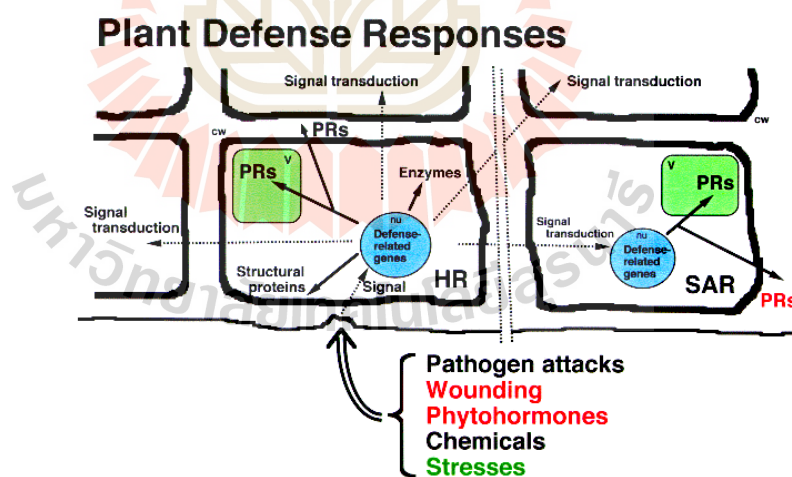
2.4 กระบวนการชักนำพืชให้เกิดความต้านทานโรค (induced resistance: IR)

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรคที่เข้าทำลายพบว่า พืชมีกระบวนการป้องกันตัวจากการเข้ารุกรานของเชื้อทั้งในเชิงกลไกทางโครงสร้างและกลไกทางชีวเคมีในปัจจุบันได้ทำความเข้าใจในเรื่องดังกล่าวจึงนำมาพัฒนาเป็นวิธีการควบคุมโรคเพื่อเป็นแนวทางเลือกหนึ่งใน

การป้องกันโรคพืชโดยอาศัยกลไกความต้านทานของพืชซึ่งถูกชักนำจากสารกระตุ้นให้เกิดกลไกการปกป้องตนเอง ดังนี้

กลไกการป้องกันการรุกรานจากเชื้อก่อโรค (plant defense mechanisms) โดยทั่วไปพืชจะมีกลไกการป้องกันและยับยั้งเชื้อโรค 2 ทางได้แก่กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defense mechanism) และกลไกทางชีวเคมี (biochemical defense mechanism) ซึ่งเกิดขึ้นได้โดยไม่เฉพาะเจาะจงกับพืชและเชื้อโรค

2.4.1 กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defenses mechanism) พืชจะสร้างโครงสร้างพิเศษทางธรรมชาติสามารถเกิดได้ทั้งก่อน และหลังการเข้าสารรุกรานจากเชื้อ ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าทำลายพืชได้ง่าย โครงสร้างของพืชก่อนเชื้อเข้าทำลาย ได้แก่ การสร้างเคลือบผิวใบ (wax) ให้หนาขึ้นเพื่อป้องกันการเกาะติดของน้ำการที่ชั้น cuticle หนาขึ้นช่วยให้พืชทนทานต่อการแทงทะลุผ่านของเชื้อ นอกจากนี้ตำแหน่งและรูปร่างของปากใบมีความสำคัญต่อเชื้อที่เข้าทำลายทางปากใบรวมทั้งความหนาของผนังเซลล์จะช่วยป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อราให้ยากมากขึ้น (ยุรฉัตรยอดโยธี, 2554) ส่วนโครงสร้างที่พืชสร้างขึ้นหลังถูกรุกรานจะเกิดขึ้นหลังจากที่เชื้อก่อโรคเริ่มเข้าทำลายเนื่องจากเชื้อหลายชนิดปล่อยสารเคมีออกมาสู่พืช เช่น การผลิตสารพิษสาร glycoprotein และเอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้แก่ cutinase, cellulase และ hemicellulase เป็นต้น



ภาพที่ 5 กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defenses mechanism)

(ที่มา : Kumar, 2013)

2.4.2 กลไกทางชีวเคมี (biochemical defenses)

นอกจากพืชจะป้องกันเชื้อโรคเข้าทำลายจากกลไกทางโครงสร้างได้แล้ว พืชยังสร้างสารป้องกันทางชีวเคมี โดยการผลิตสารเคมีที่เป็นพิษต่อเชื้อโดยตรง เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อลุกลามกระจายไปทั่วต้นพืชซึ่ง

การสร้างสารชีวเคมีสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการเข้าทำลายของเชื้อ (Agrios, 1997)

2.4.2.1 สารเคมีที่พืชผลิตขึ้นก่อนการถูกเข้าทำลาย (pre-existing biochemical defense) โดยทั่วไปพืชจะสร้างสารเคมีเพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้แก่ในธรรมชาติพืชจะปลดปล่อยสารที่เป็นพิษกับเชื้อโดยตรง (fungitoxic exudates) ในพืชบางชนิดยังสร้างสาร phytoanticipins ก่อนถูกเข้าทำลายนอกจากนี้พืชยังสร้างพวก hydrolytic enzymes เช่น chitinase และ glucanase ช่วยยับยั้งเชื้อโรค (Agrios, 1997)

2.4.2.2 สารชีวเคมีที่พืชสร้างขึ้นหลังจากการถูกเข้าทำลาย (induced biochemical defense) เมื่อเชื้อโรคเข้ารุกรานพืช พืชจะเริ่มส่งสัญญาณโมเลกุลจากบริเวณเชื้อหุ้มเซลล์ และจับกับสารบางอย่างของเชื้อ (elicitor) เช่น glycoprotein, fatty acid, carbohydrates และ peptides เป็นต้น จากนั้นจะสร้างสารชีวเคมีและเกิดปฏิกิริยาขึ้นเพื่อหยุดการพัฒนาและทำลายเชื้อโรคเกิดกระบวนการต้านทานของพืชปฏิกิริยาดังกล่าวได้แก่ 1) hypersensitive response คือเกิดการตาย ณ ตำแหน่งของเซลล์ที่เชื้อเข้าทำลายอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรค 2) salicylic acid (SA) เป็นสัญญาณโมเลกุลที่เกิดจาก HR เพื่อไปกระตุ้นการแสดงออกของ pathogenesis-related (PR) protein (Ryals et al., 1996; Maleck et al., 2000; Wang et al., 2006; Vleesschauwer et al., 2008) 3) การสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นการตอบสนองแรกของพืชเกิดขึ้นไม่เกิน 5 นาทีจะพบสารพวก superoxide และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อโรคโดยตรงและทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงขึ้น (Thordal-Christensen et al., 1997; Shetty et al., 2009) 4) การสร้าง nitric oxide (NO) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย ROS และ 5) การสร้าง pathogenesis related proteins (PR proteins) ประกอบด้วยโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลากหลายในกระบวนการต้านทานของพืช (อินชญา ประทองคำ, 2554; Van Loon, 1997; Chen et al., 2000)

2.5 ตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดความต้านทาน (IR inducers/ elicitors/ activators)

ในการกระตุ้นหรือชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชจะต้องอาศัยตัวกระตุ้น (inducers / elicitors/ activators) ซึ่งมี 2 ประเภท คือ สิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต อาทิ สารเคมีสังเคราะห์สารที่ได้จากธรรมชาติ และสารสกัดชีวภาพ และสิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต อาทิ เชื้อจุลินทรีย์ที่มี

ประโยชน์ เชื้อสาเหตุโรค (เชื้อราแบคทีเรียหรือไวรัส) ส่วนประกอบของเชื้อก่อโรค (coat protein จากไวรัส, glucan และ chitin จากเชื้อรา)

2.5.1 เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโต (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) และชักนำความต้านทานพืช

PGPR เป็นกลุ่มของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในสกุล *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* และ *Serratia* เป็นต้น โดย PGPR ส่วนใหญ่จะพบอยู่ในสิ่งแวดล้อมรากพืช แบคทีเรียเหล่านี้ จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้ผลผลิตของพืชสูงขึ้น กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชมีได้ 2 ทางคือ ทางตรง ได้แก่ กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง ได้แก่ ช่วยย่อยธาตุฟอสฟอรัสในดิน ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น สร้างปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชผลิตสาร phytohormones เช่น auxin, cytokinin, gibberellin เป็นต้น ช่วยลดความเข้มข้นของเอทิลีนในพืชสามารถผลิตซิดอร์โฟร์ (siderophores) ช่วยนำธาตุเหล็กไปให้พืชใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น และกระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและสร้างภูมิคุ้มกัน และทางอ้อม ได้แก่ ช่วยในการควบคุมโรคพืช ทั้งโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช ผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ผลิตสาร antifungal metabolites สามารถจำกัดปริมาณธาตุเหล็กที่เป็นประโยชน์ของเชื้อโรคพืชทำให้สามารถป้องกันการแพร่พันธุ์ และการขยายจำนวนของเชื้อโรคพืชได้โดยการผลิตซิดอร์โฟร์ (siderophores) (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2555) นอกจากนั้น ยังมีรายงานของ Domenech และคณะ (2006) ที่พบว่า *B. subtilis* และ *B. licheniformis* มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกและมะเขือเทศด้วย นอกจากนี้ การแช่ท่อนพันธุ์อ้อยในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย *B. subtilis* E7-17 ก่อนปลูกร่วมกับการราดเชื้อตามสามารถทำให้อ้อยมีการเจริญเติบโตได้ดี โดยให้น้ำหนักเฉลี่ย 3.12 กิโลกรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่มีการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะ คือ 1.75 กิโลกรัม/ต้น และในปี 2008 Buensanteai ได้ศึกษาการผลของการเจริญเติบโตและชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดบนถั่วเหลือง โดยใช้ extracellular proteome จาก *B. amyloliquefaciens* KPS46 เป็นตัวกระตุ้น และในปีถัดมาได้ทำการศึกษาศึกษาการเตรียมความพร้อมของถั่วเหลืองรวมถึงกลไกที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทานโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* KPS46 เป็นตัวกระตุ้น (Buensanteai et al., 2009) นอกจากนี้ วิลาวรรณ เชื้อบุญ (2551) ได้ทำการศึกษการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* สายพันธุ์ SP007s และ *B. licheniformis* สายพันธุ์ SP009s มาทำการคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นต้นกะหล่ำดอกด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและลดความรุนแรงของโรคเน่าและได้

Kloepper et al. (1980) และ Weller (1983) กล่าวว่าเมล็ดของ Chickpea ที่คลุกด้วย PGPR สายพันธุ์ *B. subtilis* AF1 และ *P. fluorescent* RBT13 ให้ผลดีในการลดลงของเชื้อ *Fusarium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์และเมื่อใช้คลุกกับเมล็ดข้าวสาลีหรือขึ้นมันฝรั่งจะแสดงถึงการครอบครองรากและสามารถตรวจพบที่บริเวณราก วิธีนี้เป็นการเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชได้ และพบว่าเชื้อ *Serratia plymuthica* สายพันธุ์ R1GC4 สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *Pythium ultimum* ซึ่งสามารถชักนำความต้านทานแบบ ISR (induced systemic resistance) ในแตงกวาได้

Chunquan et al. (2000) ได้มีการศึกษาความสามารถในการชักนำความต้านทานให้เกิดขึ้นกับแตงต่อโรค root and crown rot ที่เกิดจาก *Pythium aphanidermatum* โดยการ PGPR สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานกับพืชได้ เช่น *P. corrugata* สายพันธุ์ 13 สามารถชักนำให้พืชเกิด phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ซึ่งเป็นตัวตั้งต้น (precursor) ของกระบวนการการสร้างสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้ง phytoalexins เป็นต้น และผลจากการกระตุ้นดังกล่าวสามารถอยู่ได้ถึงประมาณ 16 วัน เช่นเดียวกับ peroxidase (PO) และ polyphenol oxidase (PPO) ที่พืชถูกกระตุ้นให้มีการสร้างขึ้นมาภายหลังจากที่ใส่ PGPR เข้าไปประมาณ 2-5 วัน ทั้งนี้สารประกอบต่าง ๆ ที่พืชสร้างขึ้นมานั้นก็เป็นกลไกความต้านทานของพืชที่ทำให้พืชสามารถต้านทานต่อเชื้อ *P. aphanidermatum* สาเหตุโรคได้

Buensanteai et al. (2008) และ Buensanteai et al. (2009) พบว่า การใช้ *B. amyloliquefaciens* สามารถส่งเสริมให้ถั่วเหลืองมีการสังเคราะห์ปริมาณของฮอร์โมนพืชชนิด Indole-3-acetic acid (IAA) เพิ่มสูงขึ้น โดยจะไปส่งเสริมเจริญเติบโตได้ดีมากขึ้นกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกระตุ้นให้ถั่วเหลืองมีการแสดงออกของเอนไซม์ glucanase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, salicylic acid, jasmonic acid และอิธิซิเตอร์ปกป้องตนเองหลายชนิดในกระบวนการ defense mechanism ของถั่วเหลืองเพื่อให้ต่อต้านต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง

Liang et al. (2011) ได้ศึกษาความสามารถของ *B. megaterium* สายพันธุ์ L8 ที่เป็น PGPR ชักนำความต้านทานให้เกิดขึ้นในแตงกวาต่อโรคโคนเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่า เมื่อใช้ *B. megaterium* สายพันธุ์ L8 ชุบที่รากของแตงกวาที่เป็นโรค สามารถลดการเกิดโรคได้ดีกว่าการไม่ชุบ คือ 83.45 เปอร์เซ็นต์ และ 31.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ 28 วัน

ทั้งนี้ในงานวิจัยของ กัญชลี เจตยานนท์ (2550) พบว่า พืชที่กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียผสม 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ IN937a และ IN937b (plant growth promoting rhizobacteria: PGPR mixtures IN937a+b) มีกิจกรรมของเอนไซม์ปกป้องตนเองภายในต้นพืช เช่น total peroxidase และ total superoxide dismutase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการเข้า

ทำลายของเชื้อสาเหตุ นอกจากนึ่งานวิจัยของ Buensanteai และคณะ ในปี 2009 ที่ได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ PGPR *B. amyloliquefacien* สายพันธุ์ KPS46 ชักนำถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบน ซึ่งกระตุ้นการสร้าง Phytohormones jasmonate และ salicylate พร้อมทั้งเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง SAR และส่งสัญญาณใน ISR pathways (Vallad and Goodman, 2004; Buensanteai et al., 2009) นอกจากนี้ ชานนทร์ แสงจันทร์ (2557) มีการคลุกเมล็ดด้วย *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ในการควบคุมโรคเน่าและในผักกาดเขียวปลี พบว่า ผักกาดเขียวปลีมีสาร salicylic acid (SA) เพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง หลังฉีดเท่ากับ $4.27 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมง สำหรับสาร phenolic compound มีการเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ $2.35 \mu\text{g gallic acid equivalent/mg dry mass}$ และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมงเช่นกัน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลี พบว่า มีการสะสมของโพแทสเซียม (K) แมงกานีส (Mn) และเหล็ก (Fe) ลดต่ำลง ต่างจากการสะสมของธาตุแคลเซียม (Ca) ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ ธาตุเหล่านี้มีความสำคัญในการส่งสัญญาณการทำงานของเอนไซม์ ขณะที่แคลเซียมช่วยให้ผนังเซลล์พืชมีความแข็งแรงเพื่อปกป้องตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค และนอกจากนี้ ยังสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีต้านทานต่อโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Marten และคณะ (1999) รายงานว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B2g ซึ่งอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น แกรนูล สารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) และคลุกเมล็ด (seed treatment) สามารถทำลายเชื้อรา *R. solani* และ *F. oxysporum* ได้ผลดี ขณะเดียวกันสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของทานตะวัน กะหล่ำปลี และแตงกวาได้

นอกจากนี้ เชื้อที่ศึกษาทดลองบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติส่งเสริมการใช้ธาตุอาหารของพืช และเพิ่มปุ๋ยไนโตรเจนให้พืชด้วย เชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ จะผ่านการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคสำคัญของพืชต่าง ๆ ตลอดจนการทดสอบการชักนำให้พืชเจริญเติบโตและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานนำมาใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำภูมิคุ้มกันพืชเพื่อควบคุมโรค

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค/ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ^{1/}
<i>B. subtilis</i> CaSUT007	มันสำปะหลัง	มันสำปะหลัง: โรคใบไหม้ โรคใบจุด แตงกวา: โรคโคนเน่า รากปม พริก: โรคแอนแทรคโนส พืชตระกูลกะหล่ำ: โรคเน่าและ โรคใบจุด
<i>B. amyloliquefaciens</i> KPS 46	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง: BCA ควบคุมโรคใบจุด โรคแอนแทรคโนส โรคไวรัส SMV และ SCLV โรคเน่าคอดิน โรคเรงตาย; PGPR ข้าวโพด: BCA ควบคุมโรคเหี่ยว โรคดำ ต้นเน่า โรคใบไหม้แผลเล็ก; PGPR; ISR ทานตะวัน: BCA ควบคุมโรคใบจุดจากเชื้อราต่าง ๆ
<i>B. licheniformis</i> KS217	เมล็ดงา	งา: โรคใบจุดแบคทีเรีย (<i>Pseudomonas</i> และ <i>Xanthomonas</i>)
<i>Bacillus</i> sp. YP28	ข้าวโพด	ข้าวโพด: ใบไหม้แผลเล็ก, ลำต้นเน่า แบคทีเรีย, โรคเหี่ยวสจ๊วต

^{1/} BCA = เชื้อปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรคพืช, PGPR = ส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชและ ISR = ชักนำภูมิคุ้มกันพืช
ที่มา: คัดแปลงจากสุดฤดี ประเทืองวงศ์ ; 2552

2.5.2 สารสังเคราะห์ที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (synthetic resistance inducer)

สารสังเคราะห์ที่ชักนำให้เกิดความต้านทานเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่สามารถชักนำระบบภูมิคุ้มกันพืชให้ปกป้องตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชมีหลายชนิด อาทิ

2.5.2.1 Benzo (1,2,3)-thiadiazole-7-carbothionic acid S-methyl ester (BTH) เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่สามารถกระตุ้นการเกิด SAR โดยจะยับยั้ง catalase และ ascorbate peroxidase enzyme ได้ดีกว่าสาร SA (Wendehenne et al., 1997) สามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานได้ในพืชหลายชนิดและยับยั้งเชื้อก่อโรคได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ BTH ยังเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวของพืช เช่น phytoalexin biosynthetic enzymes, proteinase inhibitors, hydrolytic enzymes, antiviral factors และ pathogenesis-related (PR) proteins (Eikemo et al.,

2003) Anfoka, G. H. (2000) รายงานว่าหลังจากพ่น BTH 7 วันก่อนปลูกเชื้อไวรัส CMV-Y พบว่า อัตราการเกิดโรคลดลง 12.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมะเขือเทศไม่แสดงอาการด่างและการตายของเนื้อเยื่อ ใบและมีรายงานพบว่าหลังจุ่ม peach fruit ในสารละลาย BTH สามารถลดขนาดแผลและอัตราการเกิดโรคจากเชื้อรา *Penicillium expansum* ได้ดีเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenoloxidase (PPO) และ peroxidase (POX) ได้ดีขึ้น (Liu et al., 2005) มีรายงานถึงประสิทธิภาพการยับยั้งราเน่าค้ำในข้าวสาลีและสามารถมีประสิทธิภาพสูงถึง 10 สัปดาห์ แต่ที่น่าสนใจคือสามารถกระตุ้นความต้านทานในมะเขือเทศ และทานตะวันต่อวัชพืชพวก broomrape (*Orobanchaceae*) ได้ด้วย (Buschmann et al., 2005)

2.5.2.2 กรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA) ในพืชสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโน phenylalanine โดยเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) SA เป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตการสังเคราะห์แสง การหายใจ การขนส่งและการนำเอาไอออนต่าง ๆ ไปใช้ในพืช รวมทั้งยังมีบทบาทเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณภายในเซลล์เพื่อให้พืชเกิดกระบวนการป้องกันตนเองในพืช SA จึงมีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรคของพืชหลายชนิด SA มีบทบาทในการชักนำการต้านทานโรคของพืชโดยจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ที่จะทำหน้าที่ย่อย H_2O_2 ดังนั้น SA จะทำให้พืชมีการสะสม H_2O_2 ที่จะไปกระตุ้นระบบต่าง ๆ ได้แก่ กระบวนการหายใจ การสังเคราะห์แสง และการเกิด hypersensitive cell death จากการศึกษาของ Siddiqui and Shaikat (2003) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ CHAO สามารถกระตุ้นให้มะเขือเทศผลิต SA ซึ่งเป็นสารที่สำคัญต่อกระบวนการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานในพืช ทั้งนี้ งานทดลองของ ชานนท์ แสงจันทร์ (2557) ทำการศึกษาการใช้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm ในการฉีดพ่นหลังจากที่มีการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 สามารถควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด

2.5.2.3 ไทามิน (thiamine) หรือวิตามิน B1 หรือ Thio-วิตามิน (วิตามินที่มีกำมะถัน) เป็นวิตามินที่มีความสามารถละลายน้ำได้ อนุพันธ์ของวิตามิน B มีฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบ และเป็นส่วนสำคัญในการสร้าง pyrophosphate (TPP), coenzyme ของน้ำตาล และกรดอะมิโน มีรายงานว่า เช่น การใช้ thiamine สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. viticola* ซึ่งวิธีการนี้ จะไปชักนำให้เกิด HR หลังจากมีการเข้าทำลายของเชื้อ *P. viticola* (Boubakri et al., 2012) การใช้ β -aminobutyric acid ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อ *P. viticola* ในองุ่น (Cohen, 2002)

2.5.2.4 กรดจัสโมนิก (jasmonic acid, JA) เป็นสารสัญญาณอีกชนิดหนึ่งที่พืชสร้างขึ้น เมื่อถูกแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายซึ่งการทำให้เกิดการแตกแยกของผนังเซลล์พืช หรือการเกิดบาดแผลต่าง ๆ linolenic acid จะถูกสร้างขึ้นจากชั้น lipid membrane ของเยื่อหุ้มเซลล์จากนั้นจะถูกถูกเปลี่ยน

ให้เป็น JA ซึ่งจะถูกลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชทาง phloem จากนั้น JA จะไปกระตุ้นการทำงานของ R gene (Wasternack et al., 2006)

2.5.3 สารธรรมชาติที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (natural resistance inducer)

ในปัจจุบันมีการใช้สารสังเคราะห์ที่ได้จากธรรมชาติมาใช้ในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากมีกลไกในการต้านทานโรค เช่น ไคติน ไคโตซาน ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และสารสกัดที่ได้จากพืช แต่ไคโตซานเป็นสารสกัดที่มีความน่าสนใจเนื่องจากหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก

ไคโตซานเป็นสารพอลิเมอร์ไฮดรอลิกและเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ตัดหมู่อะซิetyl ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ออกตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติไม่เป็นพิษต่อพืชมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2551) พืชมีกลไกในการจดจำจุลินทรีย์ โดยจดจำจุลินทรีย์ที่เข้ามาบุกรุกด้วยโปรตีนตัวรับ (receptor) โปรตีนตัวรับจะได้รับการกระตุ้นให้เกิดการต้านทานต่อจุลินทรีย์ เมื่อพบส่วนประกอบต่าง ๆ ในจุลินทรีย์ เช่น ไคตินในผนังเซลล์ของเชื้อรา และแฟลกเจลล (flagella) เป็นระยะที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ตัวอย่างของโปรตีนตัวรับที่พบในพืชคือ MAMPs (microbe-associated molecular pattern) และ PAMPs (microbe-associated molecular pattern) ซึ่งตัวรับดังกล่าวถือว่าเป็นระบบภูมิคุ้มกันด่านแรกที่บริเวณผิวของเซลล์พืช (Hamel and Beaudoin, 2010) มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคสร้างความต้านทานต่อโรค และสามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ในกระบวนการกระตุ้น SAR ช่วยลดโอกาสการเกิดโรคได้ไคโตซานสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโรคพืช โดยกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านการบุกรุกของจุลินทรีย์ก่อโรค การสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ และกระตุ้นการสร้างผนังเซลล์ให้มีความแข็งแรงขึ้นปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยการใช้ไคโตซานในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชชนิดต่าง ๆ มีการศึกษาทดลองใช้ไคโตซานในการกระตุ้นการปกป้องใบเลี้ยงของต้นข้าวพบว่า เมื่อใช้ไคโตซานความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้มีการสะสม ROS เกิดขึ้น นอกจากนี้ ยังมีการผลิตสารฟีนอลิก (phenolic) ซึ่งเป็น secondary metabolite อีก Iriti et al. (2010) รายงานว่า การดูดซึมไคโตซานเข้าทางปากใบจะสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองในพืชได้โดยทำให้เกิดการสะสมแคลโลสเพิ่มขึ้นทำให้พืชที่ทดสอบมีความต้านทานต่อโรคเพิ่มขึ้น และนอกจากนี้ ยังมีการศึกษาในข้าวสาลีซึ่งเป็นพืชอาหารที่สำคัญในเขตหนาว (Burkhanova et al., 2007) สำหรับการใช้ไคโตซานเพื่อการเกษตรในประเทศไทยของเรามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากเนื่องจากไคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพที่มีความปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับทั้งมนุษย์สัตว์ และพืช นอกจากนั้น ยังสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งปัจจุบันมีการผลิตและวางจำหน่ายผลิตภัณฑ์ไคโตซานเพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพหลากหลายรูปแบบ เช่น แบบผง แบบน้ำ และแบบเม็ด เช่น ยี่ห้อปุ๋ยแดงไคโตซาน กุ้งหลวงไคโตซาน สตาร์ไคโตซาน และซูเปอร์ไคโตซาน เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ มี

ฤทธิ์ในการยับยั้งและสร้างความต้านทานโรคให้กับพืช ได้แก่ เชื้อไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา และสร้างความต้านทานโรคให้กับพืชที่ไม่ติดเชื้อซึ่งวิธีการใช้และปริมาณการใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้น ๆ (พรศิริ เพชรศรีช่วง, 2556) แต่การใช้ผลิตภัณฑ์โคโตซานอาจประสบปัญหาของความไม่คงตัวของผลิตภัณฑ์ หรือมีประสิทธิภาพไม่เต็มที่เมื่อนำไปใช้ ทั้งนี้พรณี อัสวตริรัตนกุล และคณะ (2555) พบว่าโคโตซานสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมะละกอเพิ่มขึ้นเป็น 1.1-1.6 เท่า เมื่อนำใบมะละกอไปทดสอบกับเชื้อราที่ก่อโรคพืช *Pythium palmivora* พบว่าใบมะละกอที่ได้รับโคโตซานจากเปลือกกุ้งเข้มข้น 40 mg L^{-1} สามารถต้านทานการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.6 การศึกษากลไกการป้องกันตนเองของพืชและองค์ประกอบของเซลล์พืช

2.6.1 การศึกษากลไกการป้องกันตนเองของพืชด้วยวิธีทางชีวเคมีพื้นฐาน

วิธีทางชีวเคมีเป็นการวิเคราะห์เพื่อให้ทราบชนิดและหน้าที่ของกลุ่มสารชีวเคมีภายในเซลล์พืช (functional group) หรือสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) ในตัวอย่าง ปริมาณมากน้อยเพียงใดอาศัยเทคนิคต่าง ๆ การศึกษาการกลไกการป้องกันตนเองของพืชด้วยวิธีทางชีวเคมีด้วยเทคนิคพื้นฐาน เช่น การชั่ง การตวง การไทเทรต การใช้สารเร่งการตกตะกอน หรือการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักทางเคมีฟิสิกส์ มาช่วยในการวิเคราะห์ เช่น การใช้หลักทางแสง (spectrophotometry) ได้แก่ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และเทคนิค UV-VIS spectroscopy เป็นต้น เช่น การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผักแว่นโดยวิธีการดูดกลืนแสง (วิไลพร ป้องเพียร, 2551) การหาปริมาณฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้แปรรูปด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (รวินิภา ศรีมูล และคณะ, ม.ม.ป.) การเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลรวมของเปลือกผลไม้ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (ปฎิวิทย์ ลอยพิมาย และคณะ, 2554) การวิเคราะห์หาปริมาณสาร SA ในกระบวนการชักนำให้กะเนาะต้านทานโรคขอบใบทอง ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (นลินา เหมสนธิ และคณะ, 2552) การวิเคราะห์หาปริมาณสาร SA ในกระบวนการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคสแคบในองุ่น ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (อัญญา ประคองคำ, 2555) การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในใบข้าวโพด ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (รังสิมา วิเศษศรี และคณะ, 2555) นอกจากนี้ ชานนทร์ แสงจันท์ (2557) ได้ศึกษาการศึกษากลไกความต้านทาน โดยการวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) และ phenolic compound ภายในเนื้อเยื่อพืช พบว่า การคลุกเมล็ดเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีปริมาณสาร salicylic acid (SA) เพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง หลังฉีดเท่ากับ $4.27 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมง สำหรับสาร phenolic compound มีการเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ $2.35 \mu\text{g gallic acid equivalent/mg dry mass}$ และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมงเช่นกัน และในปีเดียวกัน ธัญมน ผิวทอง (2557) ได้ศึกษาการใช้ SecCaSUT007 และโคโตซานไปวัด

ปริมาณ salicylic acid (SA), phenolic compound (PC) และ lignin พบว่า หลังจากปลูกเชื้อ *P. viticola* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ใช้ SecCaSUT007 และโคโคซานทำให้ปริมาณ SA เพิ่มขึ้น เป็น 113.28 ± 0.94 และ 115.83 ± 0.55 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ทั้งนี้ ในปี 2551 ณัฐริญา เบื่อนสันเทียะ ได้ศึกษาอิทธิพลของสารที่เกี่ยวกับกระบวนการส่งเสริมการเจริญเติบโต และชักนำความต้านทานในถั่วเหลือง เมื่อคลุกเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ด้วยเชื้อสายพันธุ์ KPS46 พบว่า IAA, surfactin lipopeptide และ extracellular protein สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการชักนำให้ถั่วเหลืองเกิดความต้านทานต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบน พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 ที่เจริญมาจากเมล็ดที่ผ่านการคลุกก่อนปลูกด้วยเชื้อ KPS46 มีการสะสม สารฟีนอลและ defense related enzymes ประกอบด้วย β -1,3-glucanase และ peroxidase activity มีปริมาณเพิ่มขึ้น งานวิจัยของ อภิวัฒน์ วงศ์จินดาคุณ และคณะ (2558) ได้ศึกษาประสิทธิภาพสารกรองของ *P. fluorescens* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ายางพาราซึ่งตรวจสอบด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าสารกรองดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้ต้นกล้ายางมีการผลิตฮอร์โมน IAA ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยกิจกรรมของ IAA จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเท่ากับ $3.54 \mu\text{g mg}^{-1}$ หลังต้นกล้าออก 7 วัน การศึกษาของ Kohler (2002) ซึ่งใช้ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จีดพ่น *Arabidopsis* หลังจากนั้น 3 วัน จึงจีดพ่นด้วยเชื้อ *P. syringae* pv. *tomato* แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของยีน พบว่า มีการแสดงออกของยีน PR-1 ในระดับสูงในขณะที่มีการติดเชื้อมากที่สุด

2.6.2 การศึกษาหลักการป้องกันตนเองของพืชด้วยวิธีทางชีวเคมีด้วยเทคนิค infrared

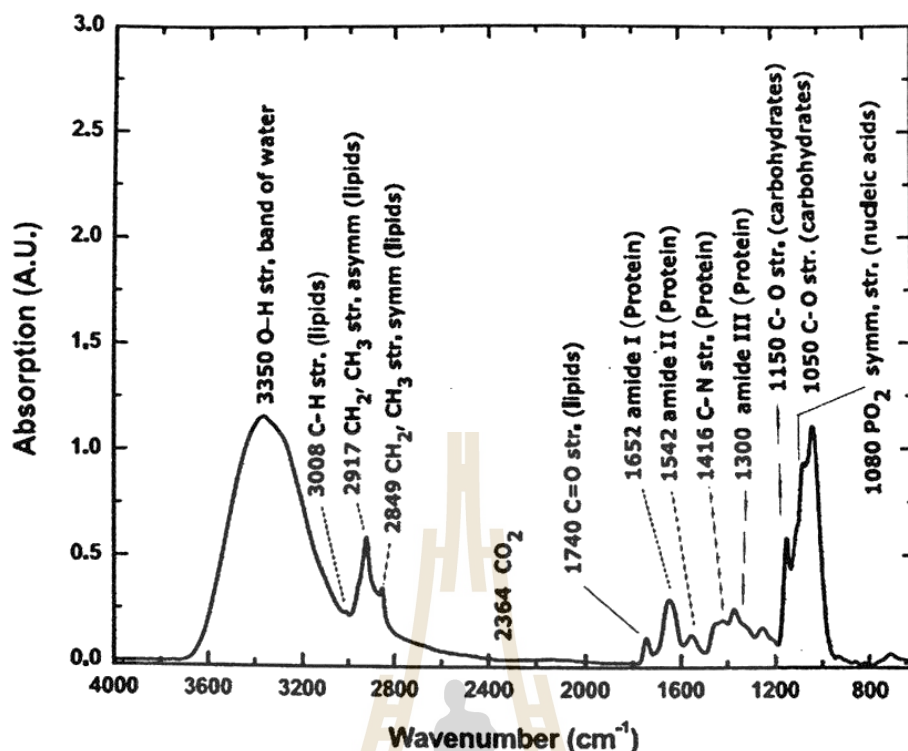
(IR) spectroscopy

เทคนิค infrared spectroscopy เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบเกี่ยวกับโมเลกุลของสาร ซึ่งประกอบด้วยอะตอมที่ยึดเกาะกันด้วยพันธะเคมีซึ่งปกติแล้วอะตอมเหล่านี้ จะมีการเคลื่อนไหวหรือสั่น (vibration) อยู่ตลอดเวลาการสั่นแบบพื้นฐานของพันธะเคมีมีอยู่ 2 แบบ คือ การยืด (stretching) และการงอ (bending) โดยใช้แสงอินฟราเรดช่วงกลาง 2.5-25 นาโนเมตร หรือ 4000-670 เซนติเมตร⁻¹ (สมเดช กนกเมธากุล, 2547; นิพนธ์ และคณะ, 2547) ทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสงแล้ววัดแสงที่ส่งผ่านออกมาแสดงผลเป็นความสัมพันธ์ของ ความถี่หรือ Wave Number กับค่าการส่งผ่านของแสง เรียกว่า IR Spectrum ลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะทำให้สามารถสร้างเป็น molecular fingerprint ขององค์ประกอบสารชีวเคมีในตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ซึ่งลักษณะสเปกตรัมที่ได้จากตัวอย่างทางด้านชีวภาพจะบ่งบอกถึงลักษณะสารประกอบของสารชีวเคมีภายในเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ฟอสโฟลิปิด ลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะขึ้นอยู่กับความแข็งแรง ของพันธะและน้ำหนักของอะตอมของ Functional Groups ในโมเลกุลนั้น ๆ

ซึ่งช่วง wave numbers $4000-400\text{ cm}^{-1}$ จะมีผลต่อการสั่นของพันธะเคมีแต่ละชนิดแตกต่างกันไป เช่น พลังงานในช่วง $4000-1500\text{ cm}^{-1}$ จะเป็นช่วงที่บ่งบอกถึงหมู่ฟังก์ชันนอลของโมเลกุลดังนี้ hydroxyl (-OH) methyl และ carbonyl (-CO) เป็นต้น (ภาพที่ 6)

ปัจจุบันนี้การนำเอาเทคนิค IR spectroscopy มาใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งนิยมเรียกว่า Infrared micro spectroscopy จะขยายขอบเขตการใช้งานได้อย่างมากมาย ซึ่งสามารถวัดตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่ไม่สามารถวัดได้โดยใช้ spectroscopy ข้อดีอีกประการหนึ่งของการใช้เทคนิคนี้ คือ การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไม่มีความยุ่งยากซับซ้อน ทำให้สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างแบบไม่ทำลาย (non-destructive) ได้ เพราะแสงที่ใช้อยู่ในย่านพลังงานที่ค่อนข้างต่ำเกินกว่าที่จะทำให้เกิดการทำลายพันธะทางเคมี หรือการทำให้เกิดปฏิกิริยาการแตกตัวของโมเลกุล (ionization) การใช้งานเทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงาน ด้านวัสดุศาสตร์ เช่น พอลิเมอร์ช่วยในการจำแนกชนิดของพอลิเมอร์ ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ และวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เช่น การตรวจสอบโครงสร้างของเนื้อเยื่อ เส้นผม ผิวหนัง กระดูก เนื่องจากเครื่องมือนี้มีค่าใช้จ่ายไม่แพง มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากใช้ตัวอย่างน้อย มีความแม่นยำสูง และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เกือบทุกชนิด (กาญจนา ชรรมนู, 2555) และได้มีการนำเทคนิคนี้ มาใช้ในด้านการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่สนใจ โดยสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของตัวอย่างใบพืชโดยลักษณะสเปกตรัมจาก IR จะให้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันนอล เช่น Amide I, Amide II, lipid, และ carbohydrate เป็นต้น ที่เป็นลักษณะสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในแต่ละชนิด การใช้เทคนิคนี้ สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต การสร้างภูมิต้านทานในพืช และกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เทคนิค FTIR ที่มีการนำมาใช้ในด้านโรคพืช เช่น การศึกษาการกระตุ้นการเจริญเติบโต รวมทั้งการกระตุ้นความต้านทานในมันสำปะหลังที่มีการชุบท่อนพันธุ์ด้วยแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* CaSUT007 (Buensanteai et al., 2012) พบว่า ใบของมันสำปะหลังที่ชุบท่อนพันธุ์ด้วยแบคทีเรีย PGPR มีการสะสมของสาร polysaccharide และ โปรตีน amide I ที่ผนังเซลล์ในปริมาณที่สูงกว่าใบปกติที่ไม่มีการชุบท่อนพันธุ์ สอดคล้องกับการศึกษาปริมาณฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid ที่วัดด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งยืนยันว่าการแช่ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* SUT007 นั้น ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังได้ในระดับเซลล์ ต่อมา ชานนทร์ แสงจันทร์ (2557) มีการใช้เทคนิค Fourier transformed infrared spectroscopy ศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีที่ เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก พบกลุ่มไขมันชนิด

C-H stretching กลุ่มไขมัน ชนิด C=O ester และกลุ่ม amide I มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่ในกลุ่ม คาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide มีปริมาณ ลดต่ำลง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืชมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้น ให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและในผักกาดเขียวปลีได้ ในปีเดียวกัน ฐญมน ศิวทอง (2557) ได้นำตัวอย่างอ่อนมาประเมินการเปลี่ยนแปลง องค์ประกอบของสารชีวเคมีภายในเซลล์พืชเพื่อศึกษากลไกปกป้องตนเองด้วยเทคนิค FTIR พบว่า กรรมวิธีที่ใช้สาร SecCaSUT007 และกรรมวิธีที่ใช้โคโคซานการเปลี่ยนแปลงไปของสารในกลุ่ม lipid , C=O ester, amide protein, C-H bending, cellulose, hemicellulose และ carbohydrate มีความแตกต่างกัน ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง และเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ ในขณะที่สารในกลุ่ม C=O ester ไม่มีความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลา ส่วนการแสดงออกของสารในกลุ่ม amide protein ในแต่ละช่วงเวลามีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ ปริมาณ phenolic compound PR protein และเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการชักนำให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค ขณะที่การเปลี่ยนแปลง ปริมาณสารในกลุ่ม C-H bending เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งสารในกลุ่มนี้ ประกอบไปด้วย ethylene ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช และการเปลี่ยนแปลงไปของ ปริมาณสารในกลุ่ม carbohydrate ลดลงเนื่องจาก สารใน กลุ่ม carbohydrate เป็นแหล่งพลังงาน สำคัญในกระบวนการ SAR จากตารางที่ 2



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล
(ที่มา : Salman, 2010)

สามารถแบ่งกลุ่มของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

1. ช่วง $4000-3100\text{ cm}^{-1}$ ส่วนใหญ่เกิดจากการดูดกลืนแสงของ OH (3400 cm^{-1}) และ NH Stretching mode (Amide A $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ และ Amide B $\sim 3030\text{ cm}^{-1}$)
2. ช่วง $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ การดูดกลืนแสงของ C-H Stretching vibration ของ CH_3 CH_2 ซึ่งเกิดจากการดูดกลืนแสงของกลุ่มไขมัน
3. ช่วง $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ การดูดกลืนแสงของ Amide I และ Amide II ของกลุ่มโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถบอกถึง secondary structure ของโปรตีน เช่น alpha-helix , beta-sheet, turn รวมไปถึงหมู่ C=O จาก ester group ของไขมัน
4. ช่วง $1300-1500\text{ cm}^{-1}$ การดูดกลืนแสงของ C-H bending vibration ของ CH^3 CH^2 ซึ่งเกิดจากการดูดกลืนแสงของกลุ่มไขมัน รวมไปถึง Stretching vibration COO^- จาก Amino acid side chains
5. ช่วง 1230 cm^{-1} เกิดจากการดูดกลืนแสงของ P=O asymmetric stretching vibrations ของ phosphodiester, free phosphate และ monoester phosphate ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการดูดกลืนแสงของ DNA/RNA Polysaccharide backbone structures

6. ช่วง $1200-900\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการดูดกลืนแสงของ PO^{2-} จาก nucleic acid และ พวกร C-OC C-O-P stretching vibrations ของพวกร oligo-polysaccharide การนำแสงซินโครตรอนย่านพลังงาน

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล

Wavenumber (cm^{-1})	Assignment
~ 3307	N-H and O-H stretching vibration : polysaccharides, protein
~2959	CH_3 asymmetric stretch :mainly lipids
~2927	CH_2 asymmetric stretch: mainly lipids, with the little contribution from proteins, carbohydrates, nucleic acids
~2876	CH_3 symmetric stretch: mainly proteins, with the little contribution from lipids, carbohydrates, nucleic acids
~2857	CH_2 symmetric stretch: mainly lipids, with the little contribution from proteins, carbohydrates, nucleic acids
~1739-1744	Ester C=O stretch: lipid, triglycerides
~ 1700-1600	Mainly $\gamma(\text{C=O})$ associated with protein as the amide I band
~1631	β -sheet protein secondary structure
~1653	α -helix protein secondary structure
~1682	Turn
~1541	Amide II (protein N-H bend, C-N stretch)
~1452	CH_2 Bending: lipids
~ 1391	COO^- symmetric stretch: amino acid side chains, fatty acids
~1236	Asymmetric stretching: mainly nucleic acids with the little contribution from phospholipids
~1152	CO-O-C asymmetric stretching: glycogen and nucleic acids
~1080	PO^{2-} symmetric stretching: nucleic acids and phospholipids

2.7 วิธีการใช้ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคพืช

การใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นเชื้อปฏิปักษ์ในทางการผลิตพืช สามารถใช้ได้ทั้งในรูปเซลล์และเอนโดสปอร์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการป้องกันและควบคุมโรคพืชโดยตรง ตลอดจนไปถึงการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในพืช ซึ่งมีการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* ให้สามารถใช้ได้หลายรูปแบบ ดังนี้

2.7.1 การคลุกหรือเคลือบเมล็ด

การคลุกเมล็ดด้วย *Bacillus* sp. อาจใช้ในรูปแบบเซลล์สดหรือแบบผงซึ่งอาจจะผสมน้ำหรือมีสารละลายตัวกลางก่อนการคลุกเมล็ด เพื่อให้จุลินทรีย์ติดกับผิวเมล็ดได้ ส่วนการเคลือบเมล็ด (seed coating) เป็นวิทยาการใหม่ทางด้านเมล็ดพันธุ์ ซึ่งได้พัฒนาเทคนิคการเคลือบมาจากอุตสาหกรรมเคลือบยา เป็นการใช้ polymer ที่มีความเหนียวผสมกับสารออกฤทธิ์ชนิดต่าง ๆ มาเคลือบบนเมล็ดพันธุ์อย่างบาง แนบแน่น และสม่ำเสมอ ซึ่งในตอนต้นได้ใช้สารเคลือบผสมกับสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชและแมลงศัตรูพืช ตลอดจนไปถึงปุ๋ยหรือธาตุอาหารพืช และสารประกอบอื่น ๆ ที่มีผลโดยตรงต่อเมล็ดพันธุ์ (Copeland and McDonal, 1995; สมคิด ดิสถาพร, 2540 ; นิพนธ์ ทวีชัย, 2550) การคลุกหรือเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยแบคทีเรียหรือชีวภัณฑ์แบคทีเรีย จะช่วยให้แบคทีเรียเจริญอยู่บริเวณรอบ ๆ รากพืชได้ดี เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชสูงขึ้นด้วย โดยเฉพาะการใช้เพื่อควบคุมโรค ที่เกิดกับระบบราก การทำให้เชื้อปฏิปักษ์ครอบครองพื้นที่รอบรากพืช (rhizosphere) เป็นกุญแจสำคัญในการป้องกันโรคพืชทางดิน การคลุกเมล็ด (seed treatment) ด้วยเชื้อปฏิปักษ์เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการนำเชื้อปฏิปักษ์ไปควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากการช่วยให้เชื้อปฏิปักษ์อยู่ใกล้เมล็ดและสามารถเจริญเพิ่มปริมาณไปพร้อมกับการเจริญของต้นกล้าเพื่อปกป้องพืชได้ทันทีเมื่อเมล็ดงอก (El-Hassan and Gowen, 2006)

จากการศึกษาของ Manjula and Podile (2005) ซึ่งใช้เซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AF1 ผสมกับตัวพาต่าง ๆ ได้แก่ พีท (peat) พีทผสมไคติน (peat+chitin) พีทผสมเส้นใยของ *Aspergillus niger* (peat+mycelium) ก้อนเชื้อเห็ดเก่า (spent compost) และอัลจิเนต (alginate) โดยชีวภัณฑ์ดังกล่าวสามารถเก็บได้นานกว่า 4 เดือน แล้วเมื่อนำมาใช้คลุกเมล็ดถั่วมะแฮะ เพื่อทดสอบในสภาพแปลง พบว่า รูปแบบที่ใช้พีทผสมไคติน เป็นตัวพา มีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกได้ 29 และ 30 เปอร์เซ็นต์ จาก 2 ฤดูปลูก และสามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งให้ถั่วมะแฮะ ได้ถึง 32 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการใช้แบคทีเรียในรูปแบบอื่น ๆ และพบว่าประชากรแบคทีเรียบริเวณรากพืชส่วนใหญ่จะเพิ่มขึ้นระหว่าง 20-40 วัน หลังการเพาะ และจะลดลงอย่างช้า ๆ จนกระทั่งครั้งที่ 100 วัน

El-Hassan and Gowen (2006) ได้นำชีวภัณฑ์ที่ใช้ *B. subtilis* ผสมลงในตัวพาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กลูโคส ผงทัลคัม และพีท โดยมี carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นสารเพิ่มการยึดเกาะ มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentil* สาเหตุโรคเหี่ยวของถั่วแขก โดยใช้ถั่วแขก 2

สายพันธุ์ ได้แก่ Precoz ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อนแอ และ Idlib-2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทาน พบว่ารูปแบบชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการควบคุมโรค คือ รูปแบบสปอร์ในกลูโคส และสปอร์ในผงทัลคัม เนื่องจากสามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรคได้ดีกว่ารูปแบบอื่น ๆ โดยรูปแบบสปอร์ในกลูโคสมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคเหี่ยวได้ดีที่สุดในพันธุ์อ่อนแอ พบอาการเหี่ยวเพียง 33.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยการเกิดโรคของพันธุ์ คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ และในพันธุ์ต้านทาน พบอาการเหี่ยว 6.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยการเกิดโรคของพันธุ์ คือ 26.67 เปอร์เซ็นต์

Marten และคณะ (1999) รายงานว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B2g ซึ่งอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น แกรนูล สารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) และคลุกเมล็ด (seed treatment) สามารถทำลายเชื้อรา *R. solani* และ *F. oxysporum* ได้ผลดี ขณะเดียวกันสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต ของทานตะวัน กะหล่ำปลี และแตงกวาได้

ในปี 2550 วิลาวรรณ เชื้อบุญ และคณะ ได้ศึกษาการใช้สารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SP009S คลุกเมล็ดและพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SP007s ร่วมกับสารชีวภัณฑ์ (เกอมาร์บี เอ็ม8®) มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ากะหล่ำดอก ในส่วนของ น้ำหนัก ความสูงและความยาวใบได้ดีที่สุด เท่ากับ 22.95, 19.03, และ 14.34 เซนติเมตร ตามลำดับ และสามารถควบคุม โรคเน่าและของกะหล่ำดอกที่เกิดจาก *E. carotovora* subsp. *carotovora* ได้ดีที่สุดโดยความรุนแรงของโรคเท่ากับ 17.30 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ผลผลิตในกรรมวิธีดังกล่าวดีที่สุดเท่ากับ 1.70 ตัน/ไร่

2.7.2 การแช่รากหรือหัวพันธุ์

การแช่รากหรือหัวพันธุ์พืชด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูก เป็นวิธีการที่ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อสาเหตุโรคพืชที่อยู่ในดินเข้าทำลายพืชได้ หรือช่วยลดความรุนแรงลงได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ดีกว่าเมื่อเกิดโรคแล้วจึงใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไปรักษา วงศ์บุญ สืบสกุล และคณะ (2550) ได้ทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ DOA-WB1, DOA-WB2, DOA-WB3, DOA-WB4 และ DOA-WB5 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยการแช่รากต้นกล้าอายุ 10 วัน ด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. subtilis* ความเข้มข้น 10^9 cfu.ml⁻¹ เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วปลูกในดินที่มีเชื้อ *R. solanacearum* ความเข้มข้น 10^6 cfu.ml⁻¹ หลังจากนั้นรดด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีความเข้มข้น 10^6 cfu.ml⁻¹ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อกระถาง โดยรด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถป้องกันการเกิดโรคเหี่ยวได้ 23.4-80 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต DOA-WB4 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีที่สุด และเมื่อทดสอบด้วยวิธีการเดียวกันในมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร พบว่า สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ 15.8-44.9 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรีย DOA-WB4 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีที่สุดเช่นกัน งานวิจัยของสุจินต์

แก้วนิค (2545) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะจากแหล่งต่าง ๆ จากใบ เมล็ด และดิน บริเวณรากข้าว พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. และเชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถควบคุมการเกิดโรคของใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในเรือนปลูกพืชทดลองโดยการจุ่มรากและฉีดพ่นทางใบ โดยเกิดโรคเพียง 27-34 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่ใช้เชื้อปฏิชีวนะจะเกิดโรค 69 เปอร์เซ็นต์

2.7.3 การโรยหรือราดลงดิน

เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกต่อการใช้อีกรูปแบบหนึ่ง จากการศึกษาของ EI-Hassan และ Gowen (2006) ซึ่งได้ทดลองเพาะเมล็ดถั่วแขกในถาดเพาะที่มีดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ดินปลูก 2 กิโลกรัม ต่อถาดเพาะ หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ ทำการปลูกเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *lentil* ที่มีความเข้มข้น 2.5×10^6 cfu.ml⁻¹ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร/ถาดเพาะ จากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *B. subtilis* ความเข้มข้น $2-3 \times 10^8$ cfu.ml⁻¹ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร/ถาดเพาะ ราดรอบ ๆ ต้นกล้า เริ่มพบอาการเหี่ยวของถั่วหลังการปลูก 48 วัน และในวันที่ 73 พบว่า ต้นถั่วที่ราดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียแสดงอาการเหี่ยวเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ control ที่แสดงอาการเหี่ยว 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชแล้ว ยังมีการนำไปใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยได้ด้วย ดังเช่น Metasebia et al., (2009) ได้ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ทางการค้าภายใต้ชื่อ BioNem ซึ่งเป็นชีวภัณฑ์ที่มี *B. firmus* เป็นส่วนประกอบหลัก ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ควบคุมการฟักตัวของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปมในมะเขือเทศ โดยวางถุงไข่ (egg mass) ลงในสารแขวนลอยแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากนั้น 3 วัน เริ่มตรวจนับจำนวนตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ BioNem มีผลยับยั้งการฟักตัวของ *M. incognita* ตั้งแต่ 3 วันแรก โดยประสิทธิภาพการยับยั้งจะลดลงเรื่อย ๆ หลังจาก 3 วัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 98 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยในกระถางปลูกซึ่งมีความจุของดิน 1,200 ซีซี และมีตัวอ่อนของ *M. incognita* อยู่ในดินปลูกมะเขือเทศจำนวน 1,000 ตัว/ต้น โดยใช้ BioNem อัตรา 1, 2, 4, 8 และ 16 กรัม พบว่าสามารถลดการเกิดปมที่รากของมะเขือเทศได้ตั้งแต่ 53 ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเพิ่มน้ำหนักของพืชได้ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ตามปริมาณการใช้ชีวภัณฑ์ แต่ที่อัตรา 16 กรัม/ต้น ทำให้เกิดพิษกับพืช ดังนั้น อัตราที่แนะนำให้ใช้ควบคุม *M. incognita* ได้ผลดีและไม่เป็นพิษกับพืชคือประมาณ 8 กรัม/ต้น

2.7.4 การพ่นทางใบหรือผล

ชัยสิทธิ์ ปรีชา และคณะ (2550) ได้ศึกษาวัสดุที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวพา (carrier) ของ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 เพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำหรับฉีดพ่นทางใบ ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถปลดปล่อยสารเมตาโบไลต์ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง โดยวัสดุที่นำมาทดสอบ ได้แก่ มูลโคแห้ง ทดกัม มูลโคหมัก

และถ่านแกลบ โดยมีปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. amyloliquefaciens* เริ่มต้น 8.85×10^{14} cfu.ml⁻¹ หลังการเก็บรักษา 60 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าในสูตรที่ใช้ถ่านแกลบ และมูลโคแห้งเป็นตัวพา มีปริมาณเชื้อ 1.29×10^{13} และ 1.03×10^{13} cfu.ml⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสูตรอื่น ๆ และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดบนของถั่วเหลืองฝักสด ในสภาพเรือนทดลอง ด้วยการละลายน้ำฉีดพ่นบนต้นถั่วเหลืองอายุ 30 วัน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/ต้น (ชีวภัณฑ์ 1 กรัม:น้ำ 1 มิลลิลิตร) หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง พ่นตามด้วยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu.ml⁻¹ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/ต้น พบว่ารูปแบบที่ใช้ถ่านแกลบ มูลโคแห้ง มูลโคหมัก และทลคัม มีระดับความรุนแรงในการเกิดโรค 33.44, 35.83, 36.33 และ 36.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีศักยภาพในการควบคุมโรคได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคอปเปอร์ออกไซด์ไฮดรอกไซด์และการใช้เชื้อสด ที่มีระดับความรุนแรงของโรค 33.33 และ 34.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ธรรมชาติ จันทรรัตน์ และคณะ (2552) ได้เตรียมสูตรชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะของ *B. amyloliquefaciens* DGg13 โดยเตรียมเป็นชีวภัณฑ์ 2 สูตร สูตรแรกใช้เซลล์แขวนลอย 2 มิลลิลิตร ผสมกับผงดิน 200 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง สูตรที่สองใช้เซลล์แขวนลอย 700 มิลลิลิตร ผสมกับผงทลคัม 1 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วบด เมื่อเก็บไว้นาน 6 เดือน พบว่าในสูตรที่ผสมผงดินมีปริมาณแบคทีเรียคงอยู่ 2.5×10^{11} cfu.ml⁻¹ ใกล้เคียงกับเดือนแรก (4×10^{11} cfu/กรัม) ต่างกับสูตรที่ผสมทลคัม ที่มีปริมาณแบคทีเรียลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยในเดือนที่ 6 จำนวนแบคทีเรียลดลงเหลือ 2×10^8 cfu.ml⁻¹ จากเดิม 6.3×10^{12} cfu.ml⁻¹ และพบว่า เมื่อนำสารชีวภัณฑ์ทั้งสองสูตรไปใช้กับผลพริก สามารถลดการเกิดโรคจาก *Colletotrichum* spp. ได้ 86.97 และ 84.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ชีวภัณฑ์ทั้งสองสูตรเมื่อผสมน้ำแล้วนำไปพ่นบนพืช มีปัญหาการอุดตันหัวฉีด และเกิดคราบขาวที่ผลและใบพริก

2.8 รูปแบบของสูตรสำเร็จ *B. subtilis* ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช

การใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ในการควบคุมโรค แม้ว่าเชื่อดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรคในระดับห้องปฏิบัติการ เรือนทดลองและแปลงทดสอบ เมื่อทำการใช้เชื้อในรูปแบบเชื้อสด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำเชื้อมาผ่านการพัฒนาเป็นสูตรผงและเกษตรกรนำไปใช้จริงในสภาพไร่ พบว่า ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคยังไม่ดีพอ ปัญหาเหล่านี้มักเกิดจากความไม่คงตัวของชีวภัณฑ์ในขณะเก็บรักษา จำนวนเชื้อที่ออกมาบริเวณเป้าหมายน้อยเกินไป หรือเกิดการสลายตัวของสารสำคัญในบริเวณเป้าหมายอย่างรวดเร็วและการเน่าของเชื้ออื่น ฯลฯ ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยมีรูปแบบของชีวภัณฑ์ในสกุล *Bacillus* ประกอบด้วย

2.8.1 สูตรน้ำ (liquid formulate) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิชีวนะจะอยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยในตัวทำละลายที่เป็นน้ำหรืออาจอยู่ในตัวทำละลายที่ไม่ละลาย มีความทนทานต่ออุณหภูมิและสารเคมีต่ำ อายุสั้นและต้องการการเก็บรักษาในภาชนะบรรจุที่พิเศษ ต้องมีระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซและ

ความชื้นที่เหมาะสมข้อดีคือ สามารถนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการ reactivation ในการผลิตสูตรสำเร็จอาจมีการเติมพอลิแซ็กคาไรด์ หรืออนุพันธ์ของพอลิแอลกอฮอล์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันเชื้อโรคพืช สมคิด คิสถาพร (2538) ได้รายงานการทดลองใช้ *B. subtilis* ในรูปเชื้อเข้มข้นทาบริเวณแผลของต้นทุเรียนที่เป็นโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. พบว่าทำให้แผลเน่าแห้งไม่เกิดยางไหล นอกจากนี้ การเก็บจุลินทรีย์ในสภาพของเหลวสามารถทำได้โดยเก็บรักษาโดยใช้ในโตรเจนเหลวทำได้โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญจนถึงระยะที่จุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุดและคงที่จากนั้นนำไปผสมกับสารช่วยป้องกันเซลล์ถูกทำลายในขณะแช่แข็ง เช่น กลีเซอรอลแล้วบรรจุลงในแอมพูลปิดให้สนิทนำไปแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสต่อ 1 นาทีเมื่ออุณหภูมิลดลงถึง -20 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -150 ถึง -196 องศาเซลเซียส การสูญเสียเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาโดยวิธีนี้จะเกิดขึ้นได้น้อยมากแต่อาจมีเซลล์บางส่วนตายไปได้บ้าง การเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ โดยวิธีนี้จะใช้เก็บจุลินทรีย์ได้เกือบทุกชนิดและเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานานเนื่องจากทำให้เมแทบอลิซึมของเซลล์ลดลงอย่างมากแต่วิธีนี้มีข้อเสียคือค่าบำรุงรักษาแพง

2.8.2 สูตรแห้ง (dry formulate) จากรายงานของ Paau (1988) กล่าวว่า การผลิตสูตรสำเร็จในรูปสูตรแห้งนิยมใช้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ และในการผลิตจะต้องมีการเติมสารป้องกันเซลล์เพื่อปกป้องเซลล์ จากความร้อนในระหว่างกระบวนการทำแห้ง เช่น หางนม และ เจลาติน เป็นต้น ซึ่งสารที่เติมลงไปบางชนิดช่วยเพิ่มผลได้ของเซลล์และช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา จากการศึกษาของ Rajet et al., (2003) ที่ได้นำชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis*, *B. pumilus* และ *B. amyloliquefaciens* ของมหาวิทยาลัย Auburn สหรัฐอเมริกา มาเคลือบเมล็ดข้าวฟ่างแล้วปลูกในสภาพแปลง พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวช่วยให้ความสูงต้น พื้นที่ใบ น้ำหนักเมล็ด และผลผลิตรวมของข้าวฟ่างสูงกว่าเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ไก่แก้ว สุธรรมมา (2552) พบว่า สูตรชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 ที่ 1 ประกอบด้วยผงเชื้อ *B. subtilis* + ทัลคัม+รำข้าว ให้ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* สูงที่สุด $1.88 \log \text{cfu.ml}^{-1}$ และพบว่า การใช้สูตรชีวภัณฑ์ที่ 1 ผสมกับซิลิโคนในรูปโซเดียมซิลิเกต มะเขือเทศมีการรอดตายสูงสุด 88 เปอร์เซ็นต์ และมีผลผลิตสูงที่สุด 240 กรัม/ต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีอื่น Vidhyasekaran (1995) พบว่า ในการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อ *P. fluorescens* โดยใช้ทัลคัมเป็นสารพาหะผสมกับการบอซีเมทิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ pH 7.0 เมื่อเก็บสูตรสำเร็จที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 240 วัน ปริมาณเชื้อลดลงจากเริ่มต้น 3.75×10^8 เป็น $1.3 \times 10^8 \text{cfu.ml}^{-1}$ ต่อมาในปี 1999 ได้ศึกษาการเก็บรักษาสูตรสำเร็จชนิดนี้ ในถุงพลาสติกปิดสนิทพบว่าเชื้อสามารถรอดชีวิตได้ดีและนานกว่า 30 วันปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ จากเชื้อเริ่มต้น $9 \times 10^8 \text{cfu.ml}^{-1}$ ช่อทิพย์ ถนอมถื่น (2538) ศึกษาการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ KK-TO3 และ CH6 โดยใช้โคโคคอมไบท์เป็นสารพาหะพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์

KK-TO3 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.8×10^8 และสายพันธุ์ CH6 7.1×10^8 cfu.ml⁻¹ หลังการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 180 วันปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 10^4 - 10^6 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เท่ากับ 8.8×10^7 และ 6.4×10^7 โคโลนีต่อผงเชื้อ 1 กรัมตามลำดับ จากรายงานการทดลองของ Lewis (1995) พบว่า การผลิตสูตรสำเร็จในรูปเม็ดเชื้อ *Gliocladium virens* G1-3 และ G1-21 และ *Trichoderma hamatum* TRI-4 โดยใช้แป้งข้าวโพด เจลาตินเป็นส่วนประกอบเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน เชื้อมีปริมาณการรอดชีวิตลดลงโดย G1-3, G1-21 และ TRI-4 ลดลงจาก 1.8×10^7 , 6.4×10^6 และ 1.2×10^6 เป็น 1.3×10^7 , 2.6×10^6 และ 3.7×10^4 cfu.ml⁻¹ ตามลำดับ

Kloepper (1980) ศึกษาการผลิตสูตรสำเร็จชนิดผงเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยมีทัลคัมและแซนแทนกัม 20 เปอร์เซนต์ เป็นส่วนผสม พบว่าหลังการทำแห้งเชื้อมีปริมาณลดลงจาก 10^9 เป็น 8.2×10^7 cfu.ml⁻¹ ในทำนองเดียวกันผลการทดลองของ Walker (1983) พบว่า การผลิตสูตรสำเร็จในรูปเม็ดจากเชื้อ *Phyllosticta* sp. ซึ่งประกอบด้วย clay 10-20 เปอร์เซนต์ และโซเดียมอัลจิเนต 1.33 เปอร์เซนต์ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^9 cfu.ml⁻¹ หลังผ่านการทำแห้งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 สัปดาห์เชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 1.8×10^7 cfu.ml⁻¹ นอกจากอุณหภูมิการเก็บรักษาจะเป็นปัจจัยที่สำคัญแล้วภาชนะบรรจุที่เหมาะสมก็เป็นปัจจัยที่สำคัญเช่นกันภาชนะบรรจุทำหน้าที่ควบคุมการถ่ายเทอากาศและความชื้นซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา และทำให้เชื้อไม่อยู่ในสภาวะคงที่ในรูปผงแห้งการผลิตสูตรสำเร็จในรูปแบบแห้งมีหลายวิธี

2.9 การผลิตแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในรูปแบบของชีวภัณฑ์

ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิด มาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของชีวภัณฑ์ เนื่องจากการผลิตในรูปแบบของชีวภัณฑ์จะทำให้เกิดความสะดวกต่อการนำไปใช้ ตัวอย่างชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น *B. subtilis* ได้แก่ ลาร์มิน่า® *P. fluorescens* ได้แก่ Top A506® และ *Streptomyces griseoviridis* ได้แก่ Mycostop® โดยในแต่ละสูตรของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ตัวเดียวกันอาจมีประสิทธิภาพสูงหรือต่ำแตกต่างกัน ซึ่งสูตรชีวภัณฑ์ดังกล่าวเป็นสูตรผงที่สามารถนำไปละลายน้ำและฉีดพ่นให้กับพืชโดยตรง สูตรชีวภัณฑ์จึงมีข้อจำกัดของการนำไปใช้คือจำนวนเชื้อที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชอาจมีจำนวนหรือปริมาณเชื้อไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการผลิตสูตรชีวภัณฑ์ และแนวทางการใช้งานที่เหมาะสมเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้ในแปลงเกษตร ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่มีประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อทำการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ปัจจุบันในต่างประเทศทั่วโลกมีการพัฒนาและผลิตชีวภัณฑ์ *Bacillus* ในเชิงการค้า รูปแบบต่าง ๆ เพื่อใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชเป้าหมายชนิดต่าง ๆ หลากหลายรูปแบบ เพื่อให้สะดวกต่อ

การเก็บรักษาและการนำไปใช้ โดยชีวภัณฑ์ที่จำหน่ายทางการค้ามีหลายลักษณะที่นำไปใช้ เช่น รูปแบบผงละลายน้ำ เช่น Bio-Fungus[®], Binab T[®], Rootshield[®] และในรูปแบบเม็ดที่จำหน่ายทางการค้า Bio-Fungus[®], Binab T[®], Rootshield[®], T-22 Planter Box[®] หรือในรูปแบบ pelleted เช่น Binab T[®] และในรูปแบบน้ำ เช่น Promote[®] (Haggag et al., 2011) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 รูปแบบชีวภัณฑ์ *Bacillus* ที่ผลิตในเชิงการค้าเพื่อใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชเป้าหมายแต่ละชนิด

ชื่อสินค้า	<i>Bacillus</i> spp.	ประเภทของชีวภัณฑ์	เชื้อโรคเป้าหมาย
Serenade	<i>B. subtilis</i> QST 713	WP Aqueous suspension	Fungi, bacteria on multiple vegetables, fruits
EcoGuard	<i>B. licheniformis</i> SB3086	Flowable	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i> on turf
Kodiak	<i>B. subtilis</i> GB03	WP (conc.) ¹ Flowable	Fungi on cotton, large-seeded
Yield shield	<i>B. pumillus</i> GB34	WP (conc.)	Fungi on soybeans
Bio yield	<i>B. amyloliquefaciens</i> B99 + <i>B. subtilis</i> GB122	Dry flake	Fungi on bedding plants in potting mixes
Subtilex	<i>B. subtilis</i> M1600	WP (conc.)	Fungi on cotton, large-seeded legumes, soybeans
Hi stick+	<i>B. subtilis</i> M1600+	Flowable	Fungi on soybeans, peanut
Subtilex	<i>Rhizobium</i>		

ที่มา : Schisler และคณะ (2004); กุศล ถมมา (2556)

¹ wettable powder concentration

2.10 การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying)

เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เป็นเทคนิคในกระบวนการเอนแคปซูเลชันที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตน้อยที่สุด มีกำลังการผลิตสูง ใช้งานง่าย ระยะเวลาการผลิตสั้น (Risch, 1995; Qi and Xu, 1999) สามารถควบคุม และปรับสภาวะการผลิตตามผลิตภัณฑ์ที่ผู้ผลิตต้องการเช่น ขนาดอนุภาค, ปริมาณความชื้น, ความสามารถในการไหล

(flowability), ความหนาแน่นของอนุภาค (bulk density), ความสามารถในการกระจายตัว (dispersibility), ลักษณะปรากฏและความแข็งแรงของโครงสร้าง เป็นต้น (Augustin and Sanguansri, 2008) เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นหนึ่งในกระบวนการที่ใช้กันมานานที่สุดในอุตสาหกรรมอาหารตั้งแต่ ปี 1930 (Dziezak, 1988)

เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย เป็นเทคนิคที่นิยมใช้สำหรับการทำแห้งสารละลายอินทรีย์ สารประเภทอิมัลชันและของเหลวชนิดต่าง ๆ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูปของผงแห้งจากการวิจัยและพัฒนาที่ต่อเนื่องกันมา ทำให้วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยกลายเป็นวิธีการทำแห้งที่มีประสิทธิภาพและนิยมนำมาทำแห้งผลิตภัณฑ์หลายชนิด โดยเฉพาะอุตสาหกรรมทางเคมี และอาหาร ซึ่งการอบแห้งด้วยวิธีนี้ นอกจากจะใช้สำหรับการทำแห้งอย่างรวดเร็วแล้ว ยังเป็นวิธีการที่มีประโยชน์มากในการลดขนาดและปริมาตรของของเหลวอีกด้วย ซึ่งกระบวนการนี้ ประกอบไปด้วย การพ่นของเหลว (feed) ออกมาจนเป็นละอองขนาดเล็กเข้าผสมกับอากาศร้อนที่ไหลผ่านอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำที่อยู่ในละอองของเหลวระเหยไปทั้งหมดและได้ผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของผงแห้ง โดยการทำงานของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย เริ่มจากอากาศจะถูกดูดผ่านตัวกรองและผ่านตัวให้ความร้อน จากนั้นจึงเข้าสู่ห้องอบแห้ง (drying chamber) ตัวอย่างของเหลวที่นำมาฉีดควรมีลักษณะเหลวที่ไม่ข้นมาก จากนั้น ของเหลวจะถูกดูดโดยปั๊มผ่านอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดละอองฝอยคือ atomizer ภายในห้องอบ เมื่อละอองสัมผัสกับอากาศร้อนจะทำให้เกิดการระเหยของน้ำอย่างรวดเร็ว และจะได้ผงของผลิตภัณฑ์ตกลงสู่ด้านล่างของห้องอบ ผงบางส่วนที่หลุดออกมากับอากาศจะถูกแยกโดยใช้ไซโคลนซึ่งจะรวมเข้าเป็นผลิตภัณฑ์ผงในที่สุด (เอกฉนัย กอกิมพงษ์, 2551)

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นวิธีที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะมีราคาถูกและสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับสารประกอบอื่น ๆ ได้หลายชนิด ทำให้สะดวกต่อการเพิ่มผลผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นผง (Dziezak, 1988) โดยงานทดลองของ Tsvetkov (1983) ได้นำ *Micrococcus varians* สายพันธุ์ M95 และ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ L4 ทำแห้งเชื้อแบบพ่นฝอยโดยใช้สารป้องกันเซลล์ 5 ชนิด ได้แก่ ซูโครส แลคโตส โซเดียมกลูตาเมต เปปโตน และนมผงขาดมันเนย ทำการเติมเจลาติน กรดกลูตามิกและ โซเดียมอะซิเตท ช่วยให้เชื้อมีจำนวนการรอดชีวิตสูงขึ้นหลังผ่านการทำแห้ง สามารถเก็บเชื้อได้ นาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

วัตถุประสงค์การทำแห้งจุลินทรีย์ คือ ต้องการเก็บรักษาเชื้อให้คงสภาพดีโดยไม่เกิดการสูญเสีย กิจกรรมของเชื้อ ระหว่างการขนส่งและเก็บรักษา จากรายงานของ Kim and Bhowmik (1990) พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* จะลดลงเมื่ออุณหภูมิลมออก (outlet air temperature) เพิ่มขึ้น โดยจะส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มากกว่าการเปลี่ยนแปลงของ ค่าอุณหภูมิลมเข้า (inlet air temperature) และค่า atomizing air pressure นอกจากนี้ Gardiner et al. (2000) ได้ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยกับจุลินทรีย์ *L. paracasei*

สายพันธุ์ NFBC 338 ที่อุณหภูมิลงต่ำ 170 องศาเซลเซียส และแปรรูปอุณหภูมิออกตั้งแต่ 70-120 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิออก 80-85 องศาเซลเซียส ทำให้ *L. paracasei* สายพันธุ์ NFBC 338 รอดชีวิตมากที่สุด โดย ผลผลิตแห้งมีความชื้นที่เหมาะสมคือ 4.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของ ค่าอุณหภูมิออก ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ และค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์แห้ง คือเมื่ออุณหภูมิออกสูงขึ้นการรอดชีวิตของเชื้อและความชื้นจะลดลง ในปี 2555 กนกวรรณ ศรีบุญญาวัฒน์ ได้ทำการศึกษาสภาวะในการทำแห้งแบบพ่นฝอยในการศึกษานี้ได้แก่ อัตราการป้อนสารละลาย 25 ml/min แรงลมที่หัวพ่นฝอย 15 kg/cm² และอุณหภูมิออกที่ 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส พบว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอยของเชื้อ *L. fermentum* 2311M มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 45.0, 32.4 และ 15.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและ *L. casei* sub.sp. *paracasei* สายพันธุ์ F-19 มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 21.5, 10.9 และ 2.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อุณหภูมิออกยังส่งผลกระทบต่อความชื้นเช่นกัน โดยความชื้นของผลิตภัณฑ์ *L. fermentum* สายพันธุ์ 2311M และ *L. casei* sub.sp. *paracasei* สายพันธุ์ F-19 ที่อุณหภูมิออก 85 องศาเซลเซียส มีค่าต่ำที่สุดคือ 3.2 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิออก 75 องศาเซลเซียส ความชื้นมีค่าใกล้เคียงค่ามาตรฐานผลิตภัณฑ์นมผงมากที่สุดคือ 5.2 และ 5.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่อุณหภูมิออก 65 องศาเซลเซียส มีความชื้นมากที่สุดคือ 7.9 และ 8.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เช่นเดียวกับวรรณทิชา ลากศิริ (2552) ได้ทำการศึกษาการใช้อุณหภูมิของอากาศขาเข้าและออก 130 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กล้าเชื้อ *L. plantarum* สายพันธุ์ KMITNB 53.4 ที่มี maltodextrin 10 เปอร์เซ็นต์+monosodium glutamate (MSG) 10 เปอร์เซ็นต์ เป็น spray drying carrier และสารปกป้องเซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อสูงสุด เท่ากับ 17 เปอร์เซ็นต์ ($8.29 \pm 0.07 \log \text{cfu.ml}^{-1}$)

Graham (1998) ศึกษาการทำแห้งแบบใช้อากาศพบว่า การทำแห้งโดยใช้ลมร้อนเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Arthrobotrys dactyloides* สายพันธุ์ A4 บนอาหาร GCS ที่ประกอบด้วย กลูโคส และน้ำแซ่เยื่อข้าวโพด นำน้ำหมักไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นำเซลล์ที่เหวี่ยงแยกได้เติมกับสารบิกซสมในเครื่องเป็นเวลา 10 วินาทีเติม vermiculite และ kaolin เป็นสารพา จากนั้นนำผ่านเครื่อง electrically powered pasta maker จะได้เม็ดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตรนำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อนให้เหลือความชื้น 4-5 เปอร์เซ็นต์ถ้าความชื้นมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ จะมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อราอื่น ๆ จะได้ขนาดเม็ดยาว 0.5-2.5 มิลลิเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 18 เดือน นำเม็ดเชื้อที่ได้ผสมกับดิน พบว่า *A. dactyloides* สามารถเจริญแพร่พันธุ์สร้างไฮฟาลงสู่ดิน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไส้เดือนฝอย *Meloidogyne javanica* สามารถลดจำนวนไข่ การเกิด gall และลดจำนวนไส้เดือนฝอยได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ การทำแห้งโดยใช้ลมร้อน วิธีการนี้ ทำโดยใช้ลมร้อนผ่านผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทำแห้งเป็นวิธีที่สะดวกราคาถูก วิธีนี้เป็น

การทำแห้งอย่างช้า ๆ ทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการทำแห้งสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในระหว่างการทำแห้งได้

Lam (2001) พบว่า การเติม poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) ลงในสูตรสำเร็จ recombinant human nerve growth factor (rhNGF) จะช่วยป้องกัน rhNGF ถูกทำลายในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย วิธีนี้ได้เปรียบในเรื่องความสะดวกในการขนส่งและการเก็บรักษา แต่วิธีการนี้ มีผลทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพลดจำนวนลงค่อนข้างมากส่วนใหญ่เชื้อที่ผลิตในรูปแบบนี้ได้แก่ *Streptococcus* spp. ซึ่งโดยทั่วไปจะลดจำนวนลงถึง 50-80 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างการทำแห้ง นอกจากนั้น ระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจะลดปริมาณลงอีกตามระยะเวลาที่เก็บอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ นับว่ามีผลทำให้เชื้ออยู่รอดได้ดียิ่งขึ้น เช่น การเติม yeast extract และวิตามินซีลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ปริมาณ *L. bulgaricus* อยู่รอดมากขึ้น นอกจากนี้ในขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อแล้วยังสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเชื้อโดยเติมสารต่าง ๆ ขณะทำแห้ง เช่น เติมนิโคตินาเมท ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือแลคโตส 7 เปอร์เซ็นต์ ได้มีการเปรียบเทียบผลของ การเติมนมผงพร่องมันเนย ยีสต์บรอก โมโนโซเดียมกลูตาเมต เดกสเตรน และซูโครส ต่อการมีชีวิตรอดของ *Streptococcus* sp. พบว่า นมผงพร่องมันเนยให้ผลดีที่สุดรองลงมา ได้แก่ โมโนโซเดียม กลูตาเมต เดกสเตรน และซูโครส ตามลำดับ การควบคุมความชื้นให้เหมาะสมนับว่าเป็นอีก วิธีหนึ่งที่ทำให้ปริมาณการมีชีวิตรอดระหว่างการเก็บสูงขึ้น เช่น การทำแห้งแบบพ่นฝอยเชื้อ *L. plantarum* โดยใช้ความเย็นที่มีความชื้น 3.8-5.7 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณเชื้ออยู่รอด มากกว่าค่าที่มีความชื้น 0.7-2.3 เปอร์เซ็นต์

การทำแห้งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดความชื้นในผลิตภัณฑ์เพื่อให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปที่สามารถจัดการได้ง่าย เช่น การเก็บรักษาและการขนส่งผลิตภัณฑ์ชีวภาพ ส่วนมากมีความไวต่อความร้อนสูง ดังนั้นการเลือกวิธีการทำแห้ง ควรคำนึงถึงความเสถียรของผลิตภัณฑ์โดยการเลือกใช้กระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ หรือโดยการปรับปรุงสมบัติของผลิตภัณฑ์ให้ทนความร้อนได้ดีขึ้น การกำจัดน้ำในรูปของไอน้ำจำเป็นต้องให้พลังงานความร้อนซึ่ง ได้มาจากการทำสมดุลความร้อนระหว่างอัตราความร้อนที่ให้และความร้อนแฝงของการระเหย กลไกการถ่ายเทความร้อน ได้แก่ การนำพาการแผ่รังสีหรือรวมกัน (เพ็ญแข วัน ไชยธนวงศ์, 254) ทั้งนี้การทำแห้งเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในการควบคุมโรคพืชยังไม่มีหรือนำมาพัฒนาใช้เพื่อนำมาผลิตในเชิงการค้า ซึ่งส่วนใหญ่พบในอุตสาหกรรมอาหารเท่านั้น

2.10.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย

อัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิในระหว่างการทำแห้ง ชนิดของจุลินทรีย์ สภาพของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่วงที่ถูกความร้อนและสภาพแวดล้อมของเซลล์ในระหว่างการให้ความร้อน

2.10.1.1 อายุของเชื้อจุลินทรีย์

ช่วงของการเจริญเติบโต หรืออายุของเชื้อความต้านทานต่อความร้อนของเซลล์ หรือสปอร์ขึ้นกับช่วงของการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือช่วงของการสร้างสปอร์ทั้งนี้ขึ้นกับ อายุของเซลล์และสปอร์เซลล์แบคทีเรีย จะมีความต้านทานความร้อนสูงสุดเมื่อเจริญในช่วงปลาย ของระยะที่แบคทีเรียกำลังปรับตัวหรืออยู่ในช่วงระยะการเจริญคงที่และช่วงที่เซลล์มีความต้านทาน ความร้อนต่ำสุดอยู่ในระหว่างการเจริญเติบโตในระยะการเจริญสูงสุดกรณีของสปอร์ที่อายุน้อยยัง ไม่เป็นสปอร์ที่สมบูรณ์จะมีความต้านทานต่อความร้อนได้ต่ำกว่าสปอร์ที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่แล้ว Foster (1962) ได้ศึกษา พบว่าเซลล์ของเชื้อที่เจริญอยู่ในช่วงต้น stationary phase จะสามารถทน กิจกรรมไวก้ได้สูงหลังการทำแห้งซึ่งสอดคล้องกับ Heckly (1978) ที่รายงานว่า เชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่ จะรอดชีวิตจากการทำแห้งสูงกว่าเชื้อที่มีอายุ 3-7 ชั่วโมง Espina และ Packard (1979) ได้ศึกษาการผลิตจุลินทรีย์แลคติกแอซิด แบคทีเรียด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่า หัวเชื้อที่ใช้ในการทำแห้งต้องมีสภาพเป็นกลาง (neutralization) และอายุที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้ง จะอยู่ในระยะ stationary phase เชื้อผงที่ผลิตได้จะยังคงมีกิจกรรม ต่างๆเหมือนเดิมและพบว่าเชื้อที่มี อายุในระยะนี้ มีความทนทานต่อการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ดีกว่าระยะอื่น ๆ Teixeira และคณะ (1995) ได้ศึกษาการทำแห้งเชื้อ *L. bulgaricus* แบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมเข้า (inlet air temperature) 200 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิลมออก (outlet air temperature) 80 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์ระยะ stationary phase มีความทนทานต่อกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ดีกว่าเซลล์ระยะ exponential phase นอกจากนี้ยังพบว่าการทำ heat shock กับเชื้อที่อยู่ในช่วง exponential phase จะช่วยเพิ่มอัตรา การรอดชีวิตของเชื้อให้สูงขึ้นกว่าเชื้อที่ไม่ถูก heat shock แต่การทำ heat shock กับเชื้อที่อยู่ในระยะ stationary phase จะไม่มีผลต่อการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ในงานวิจัยของกุศล ถมมา (2555) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B006 ในอาหาร NB ที่เติม glucose 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *B. subtilis* B006 สามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุดในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเซลล์ 6.3×10^5 cfu.ml⁻¹ ส่วน *B. subtilis* B076 เพิ่มปริมาณได้มากที่สุด ในเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเซลล์ 1.4×10^6 cfu.ml⁻¹ ส่วน BRS038 เพิ่มปริมาณได้มากที่สุดในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 และ 36 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเซลล์ 5.4×10^6 cfu.ml⁻¹

2.10.1.2 จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนทำแห้ง

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนการทำแห้งนั้นมีผลต่อการรอดชีวิตหลังการทำแห้ง โดย Kilara และคณะ (1976) ทำการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *L. bulgaricus* ก่อนการทำแห้งมี จำนวนเชื้อ 6×10^5 cfu.ml⁻¹ กับ 7×10^4 cfu.ml⁻¹ เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งจะมีการรอดชีวิต 75 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน *L. acidophilus* มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.6×10^5 cfu.ml⁻¹

กับ 2.6×10^4 cfu.ml⁻¹ เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งพบว่า มีการรอดชีวิต 63 เปอร์เซ็นต์ และ 19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *S. thermophilus* ที่มีเชื้อเริ่มต้นเป็น 7.3×10^5 cfu.ml⁻¹ กับ 2.5×10^4 cfu.ml⁻¹

2.11 ชีวิตเชื้อจุลินทรีย์

ชีวิตเชื้อโดยทั่วไปมักมีองค์ประกอบที่สำคัญในการใส่หรือเติมลงในสูตรชีวิตเชื้อ อาทิ

2.11.1 สารพา (carrier)

สารพาสามารถแบ่งเป็นสารอนินทรีย์เช่น vermiculite, clay, calcium sulphate mineral soil และสารอินทรีย์เช่นน้ำมันพืช จีเลื้อย รำข้าวสาลี แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น โดยทั่วไปสารพามีลักษณะเป็นสารเนื้อเยื่อและทำหน้าที่เป็นตัวพาเชื้อจุลินทรีย์ให้กระจายตัวอย่างทั่วถึง เมื่อนำสูตรสำเร็จไปใช้งานสารพาที่เป็นสารอินทรีย์จะมีปริมาณลิกนินเป็นส่วนประกอบอยู่สูง ซึ่งช่วยยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิด และยังใช้เป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ จากการทดลองของ Fravel และคณะ (1995) พบว่า สารพาอินทรีย์ เช่น ชังข้าวโพด กากถั่วเหลือง รำข้าวสาลี จะมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันเท่ากับ 96.6, 25.4 และ 21.1 ตามลำดับซึ่งมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อหลังการทำแห้ง และพบว่าในการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อ *Talaromyces flavus* เมื่อใช้ชังข้าวโพดเป็นสารพาปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงกว่า เมื่อใช้กากถั่วเหลืองหรือรำข้าวสาลี Lomer และคณะ (1993) พบว่า kerosene, neem-oil และซิลิกาเจลในสูตรสำเร็จจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาสูตรสำเร็จปริมาณเชื้อ *Metarhizium flavoviride* 5×10^{10} cfu.ml⁻¹ และปริมาณสปอร์เท่ากับ 4×10^9 cfu.ml⁻¹ เพิ่มขึ้นจากเดิม 3-4 วัน ในปีค.ศ.1995 Douro-kpindou และคณะ พบว่า kerosene ต่อ peanut oil อัตราส่วน 1:1 เดิมในสูตรสำเร็จเชื้อ *M. flavoviride* ที่มีปริมาณเชื้อ 2×10^9 cfu.ml⁻¹ จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Zonocerus variegatus* Mark และคณะ (1996) พบว่า ผสมสารพา diatomaceous earth ในสูตรสำเร็จเชื้อ *C. truncatum* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2×10^6 cfu.ml⁻¹ นำไปผ่านการทำแห้งโดยวิธี airdried เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 เดือนเชื้อมีปริมาณการมีชีวิต 93 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ได้มีการเติมแป้งเจลาตินในช่องในสูตรสำเร็จพบว่าที่ระยะเวลา 18 เดือนเชื้อมีปริมาณการมีชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์

2.11.2 สารเชื่อมหรือสารยึดเกาะ (binder)

สารเชื่อมช่วยในการจับตัวของสารพาและจะถูกเติมลงไปในระหว่างกระบวนการผลิตสูตรสำเร็จในรูปเม็ด นอกจากนี้ ยังมีสมบัติเป็นสารป้องกันเซลล์ สารเชื่อมโดยทั่วไปมีสมบัติละลายน้ำ และมีความหนืดต่ำตัวอย่างสารเชื่อมที่นิยมใช้ ได้แก่ แป้งแซนแทนกัม กลูโคสเด็คซ์แทรน เจลลาติน กากน้ำตาล กัวร์กัมเมทิลเซลลูโลส โซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เซลลูโลสอซิเตท เป็นต้น จากรายงานการทดลองของ Davis และคณะ (1992) พบว่า เซลลูโลสเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายไคตินไม่ละลายน้ำจำเพาะกับจุลินทรีย์บางชนิดที่มีเอนไซม์เซลลูเลสจึงสามารถใช้เซลลูโลสเป็น

แหล่งคาร์บอนได้ในการผลิตสูตรสำเร็จในรูปน้ำได้มีการเติมเซลลูโลสผสมกับเชื้อ *Chaetomium globosum* เพื่อยับยั้งโรค flyspeck ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Zygophiala jamaicensis*

2.11.3 สารป้องกันเซลล์ (protectant)

ในกระบวนการทำแห้งมีการเติมสารป้องกันเซลล์เพื่อป้องกันปฏิกิริยาของโปรตีนและเซลล์ที่มีชีวิตเช่นการใช้ alpha, alpha-trehalose-borate เพื่อป้องกัน *L. acidophilus* ในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งโดย trehalose มีประสิทธิภาพเป็นสารป้องกันเซลล์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ borate ช่วยป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลายและเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ trehalose วิธีการนี้นิยมใช้กับเซลล์โปรคาริโอต (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2535) ดังแสดงตัวอย่างสารที่ใช้ผสมในชีวภัณฑ์ในตารางที่ 4

Takeuchi (2000) ศึกษาการเติมสารป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งสูตรสำเร็จ พบว่า สารป้องกันเซลล์ ได้แก่ สารอัลจินต-ไคโตซาน สารละลายแลคโตส โซเดียมอัลจินต และสารละลายกรดอะซิติกไคโตซานสารเหล่านี้ มีส่วนช่วยสูตรสำเร็จสามารถเก็บได้นานขึ้น นอกจากนี้ยังมีสารป้องกันเซลล์ เช่น แลคโตส กลูโคส ฟรุกโตส หรือซูโครส ปริมาตร 5, 10 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเติมในสูตรสำเร็จทำให้เซลล์ยีสต์เพิ่มการมีชีวิตรอดจากเดิม 0.2 เป็น 30-40 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานของ Abadias (2001) ศึกษาการเติมหางนม 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นสารป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีผลต่อการมีชีวิตรอด ของเชื้อยีสต์ *Candida sake* ช่วยให้เชื้อมีชีวิตรอด 28.9 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ ในงานวิจัยของ Champagne และคณะ (1991) ใช้สารปกป้องเซลล์ประเภทโพลีแซคคาไรด์ คือ โพลีเอทรีลิน ไกลคอล มาเติมในการปกป้องเซลล์ของ *Streptococci thermophilus* โดยใช้ร่วมกับนมผงที่ปราศจากไขมัน พบว่า สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *Streptococci* ได้ 10-20 เปอร์เซ็นต์ Gardiner และคณะ (2000) รายงานการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมเข้า 170 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิลมออกที่ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้นมผงปราศจากไขมันเป็นสารปกป้องเซลล์ พบว่า จุลินทรีย์ *L. paracasei* NFBC 338 และจุลินทรีย์ *L. salivarius* UCC 118 รอดชีวิต 97 และ 11 เปอร์เซ็นต์ การที่นมผงปราศจากไขมันสามารถป้องกัน Cytoplasmic membrane ให้มีสภาพคงเดิมได้หลังการทำแห้ง

ตารางที่ 4 ประเภทของสารชีวภัณฑ์และสารที่ใช้ผสมในชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณธ์ *Bacillus* sp.

ประเภทของชีวภัณฑ์	สารผสมในชีวภัณฑ์
Liquid carriers	Vegetable oils
Mineral carriers	Kaolinite clay, diatomaceous earth
Organic carriers	Grain flour
Stabilizers	Lactose, sodium benzoate
Nutrients	Molasses, peptone
Binders	Gum Arabic, carboxymethyl cellulose
Desiccants	Silica gel, anhydrous salts
Thickeners	Xanthan gum
Surfactants	Tween 80
Dispersants	Microcrystalline cellulose

ที่มา: Schisler และคณะ (2004); กุศล อดมมา (2555)

2.12 การพัฒนาสูตรสำเร็จกล้าเชื้อ *B. subtilis*

ปัจจุบันมีผู้สนใจใช้ชีววิธีในการป้องกันกำจัดโรคพืชมากขึ้น เนื่องจากปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค และผู้ผลิต แต่พบว่า อายุการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชนั้นมีอายุสั้น ไม่สามารถเก็บไว้ใช้ในระยะเวลาได้ การพัฒนาสูตรสำเร็จเพื่อยืดอายุการใช้งาน ที่มีความคงตัวสูงและสะดวกเมื่อนำไปประยุกต์ใช้

การพัฒนากล้าเชื้อ (starter culture) ซึ่งเป็จุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพสูตรชีวภัณฑ์ การผลิตกล้าเชื้อเป็นการใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกล้าเชื้อเดิม (inoculum) ที่เก็บอยู่ในรูปเชื้อแห้งมาทำเป็นหัวเชื้อใหม่ การผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์สำหรับอุตสาหกรรมบางชนิดนั้น มีความสำคัญถึงระดับที่ได้มีการพัฒนาขึ้นเป็นอุตสาหกรรมเฉพาะ การนำกล้าเชื้อบริสุทธิ์มาใช้นั้นมีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ คือ 1) ลดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น ๆ 2) พัฒนาให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพที่ดีอย่างสม่ำเสมอ

การผลิตกล้าเชื้อเหล่านี้ ส่วนใหญ่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ถึงแม้ว่าพื้นฐานจะพัฒนาเพื่อการผลิตอาหารหมัก แต่เมื่อเทคโนโลยีอาหารหมักได้เจริญมาสู่อุตสาหกรรมในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน เอนไซม์ และสียจากจุลินทรีย์ เป็นต้น จึงได้มีวิธีการผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าว ควบคู่กันมากับการพัฒนากระบวนการผลิต ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาการผลิตกล้าเชื้อและกระบวนการหมักมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตต่าง ๆ เช่น การผลิตลูกเบิ้ง คือ เป็นการนำกล้าเชื้อ ที่เก็บในรูปเชื้อ

แห้งเพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดในแถบเอเชีย ทานโคจิในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นการนำกล้าเชื้อมาผลิตโคจิ มีลักษณะเป็นผงสปอร์เชื้อราผสมกับข้าว ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงและการผลิตกล้าเห็ดเบ้ ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของชาวอินโดนีเซีย ที่ใช้เชื้อราสกุล *Rhizopus* เจริญบนเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้ผ่านการแช่น้ำ เชื้อราจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนในเมล็ดถั่ว

2.13 การป้องกันการปนเปื้อนในอาหาร

การป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการปนเปื้อนลงไปในเชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังทำการทดลองอยู่ นอกจากนั้น ยังป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังทำการทดลองอยู่ออกมายังสิ่งแวดล้อม โดยมีเทคนิคการทำลายเชื้อจุลินทรีย์คือวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อหรือทำลายเชื้อแบ่งได้เป็น 2 วิธี ได้แก่ 1) วิธีทางกายภาพ (physical method) 2) วิธีทางเคมี (chemical method)

2.13.1 วิธีทางกายภาพ (physical method) มี 3 วิธี ได้แก่

1. วิธีการใช้อุณหภูมิสูง (high temperature) ประกอบด้วย การใช้ความร้อนแห้ง (dry heat) การใช้ความร้อนชื้น (moist heat)
2. การใช้รังสี (radiation)
3. การกรอง (filtration)

2.13.1.1 การใช้ความร้อนแห้ง (dry heat)

2.13.1.1.1 การเผา (incineration) ใช้กับการเผาวัตถุขนาดเล็กและของที่ต้องการทิ้ง เช่น loop, needle, swab ถ้วยเสมหะ ผ้าพันแผล ชากสัตว์ทดลอง มีวิธีการโดยผ่านสิ่งของเข้าไปในเปลวไฟจนร้อนแดง ซึ่งมีข้อดี ประสิทธิภาพทำลายเชื้อสูง ง่ายและประหยัด และข้อเสีย อาจกระเด็นมีโอกาสปะปนเชื้อง่าย เช่น การเผา loop ป้ายเสมหะเพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรค ไม่เหมาะสม สิ่งของที่จะนำมาใช้ใหม่

2.13.1.1.2 การใช้ตู้อบความร้อน (hot air oven) ใช้กับของที่แห้ง หรือของที่เปียกน้ำไม่ได้ เช่น เครื่องแก้ว จี๊ฟฟ์ น้ำมัน หรือผงแป้ง ใช้อุณหภูมิ 160-170 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง จะมีประสิทธิภาพสูงทำให้ปราศจากจุลินทรีย์ โลหะไม่เป็นสนิม ซึ่งข้อเสีย ใช้อุณหภูมิสูง ใช้เวลานาน สีผ้าเปลี่ยน ขางอาจหลอมเหลว ทำให้พลาสติกไหม้ นิยมใช้ที่ 160 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชม. อากาศจะแทรกซึมผ่านได้น้อยกว่าไอน้ำ (steam) ดังนั้นจึงใช้เวลาในการอบฆ่าเชื้อนานกว่า ข้อได้เปรียบของ dry heat sterilization คือ ใช้กับน้ำมัน จี๊ฟฟ์ และแป้ง ประหยัดปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดสนิม ข้อเสียเปรียบของ dry heat sterilization คือ ใช้ระยะเวลาเวลานาน มีความร้อนสูง อาจทำความเสียหายกับเครื่องมือที่ทนความร้อนสูงไม่ได้

2.13.1.2 การใช้ความร้อนชื้น (moist heat)

2.13.1.2.1 การต้มเดือด (boiling) ใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที สามารถทำลายแบคทีเรียเซลล์ปกติได้ แต่ไม่ทำลายสปอร์ เช่น การต้มนมแล้วนำมาดื่ม เชื้อที่มีสปอร์ไม่ตาย อาจก่อโรคได้ หรือไวรัสบางพวก จับเวลาเมื่อน้ำเดือด ใช้เวลา 20 นาที วิธีการต้มเป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก แต่มีข้อเสียคือไม่ทำให้ปราศจากเชื้อทั้งหมด ไม่เหมาะกับวัตถุที่เปียกน้ำไม่ได้ และทำให้โลหะเป็นสนิม Boiling water หลักการทำลายเชื้อมาเชื้อโดยใช้ความร้อนจากน้ำร้อนที่กำลังเดือดเป็นไอ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่สามารถเพิ่มอุณหภูมิให้มากกว่า 100 องศาเซลเซียส องค์การอนามัยโลกกำหนดระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 20 นาที ณ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยตลอด

2.13.1.2.2 พาสเจอร์ไรเซชัน (pasteurization) วิธีนี้ค้นพบโดย หลุยส์ ปาสเตอร์ (Louis Pasteur) นักเคมีชาวฝรั่งเศส เป็นการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้เนื่องจากใช้ความร้อนที่ไม่สูงมากนักผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้ จึงยังมีจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคเหลืออยู่ จึงต้องเก็บรักษาโดยใช้หลักและวิธีการถนอมอาหารอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น การแช่เย็น การแช่แข็ง การอบแห้ง หรือการปรับสภาพกรด-เบส เพื่อให้เก็บรักษาได้นานขึ้น เช่น นมพาสเจอไรซ์ ต้องเก็บไว้ในตู้แช่ หรือตู้เย็นก่อนนำไปดื่ม ไวน์ต้องบรรจุขวดในทันทีหลัง การพาสเจอไรซ์ ส่วนผลไม้แห้งเมื่อบรรจุเสร็จแล้วจึงค่อย นำไปผ่านการพาสเจอไรซ์ เป็นต้น

2.13.1.2.3 การสเตอริไลส์ (Sterilization) จะใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า เพื่อ ทำลายจุลินทรีย์ในอาหารรวมทั้งสปอร์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น อาหารจึงปลอดภัยและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานขึ้น การสเตอริไลส์นิยมใช้กับอาหารกระป๋อง หรือ ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปแบบยูเอชที (Ultra high Temperature: UHT) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 135-150 องศาเซลเซียส นาน 1-4 วินาที และทำให้เย็นทันทีแล้วจึงบรรจุแบบปลอดเชื้อ ทำให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานประมาณ 6 เดือน เช่น นมยูเอชที น้ำผลไม้ยูเอชที

2.13.1.2.4 การใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ใช้หลักการ Steam under pressure ใช้กับของที่ทนอุณหภูมิสูงและความดันได้ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำเกลือ เครื่องแก้ว สิ่งปนเปื้อนเชื้อ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที จะประสิทธิภาพการทำลายเชื้อสูง ปลอดภัยทุกชนิด ใช้เวลาน้อย แต่มีข้อเสีย เครื่องมีราคาแพง ใช้กับน้ำมัน ยาผงไม่ได้ และทำให้ผ้าเปียก โลหะเป็นสนิมได้ จึงต้องใช้ระบบอบแห้ง หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ steam sterilization การนึ่งด้วยไอน้ำภายใต้ความดันแบ่งออกตามระบบการทำงาน ดังนี้ gravity or downward displacement, pre-vacuum และ flash or high speed

flash or high speed คือ การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำ ใช้อุณหภูมิ 132 องศาเซลเซียส ความดัน 27 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลาที่ใช้ (exposure time) 3-10 นาที เหมาะสำหรับเครื่องมือที่มีความซับซ้อนในการใช้เท่านั้น โดยทั่วไปวางเครื่องมือในภาชนะที่ไม่มีการห่อหุ้มด้วยวัสดุ ไม่ควรนำ implant ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้สอดใส่เข้าไปในร่างกายมาอบฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้ นิยมใช้ในห้องทันตกรรม

2.13.1.3 การใช้รังสี (radiation) พลังงานของรังสีมีผลต่ออิเล็กตรอนในโมเลกุลของเซลล์ รังสีมีพลังงานต่ำมีผลต่ออิเล็กตรอนวงนอกทำให้โมเลกุลอยู่ในสภาพที่มีความว่องไวมากขึ้น รังสีมีพลังงานสูง ทำให้อิเล็กตรอนถูกปล่อย โมเลกุลมีประจุบวก จะมีความว่องไวมากขึ้น เกิด ionize มีผลทำให้ DNA แยกและถูกทำลาย

ionizing radiation ได้แก่รังสีแกมมา เบต้าเอกซ์ มีความยาวช่วงคลื่นสั้น ประมาณ 200 nm มีพลังงานสูงและอำนาจทะลุทะลวงสูง ข้อดีมีผลทำลายเซลล์จุลินทรีย์ในเครื่องมือแพทย์ อุปกรณ์ในห้องแล็บ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เช่น syringe พลาสติก ใช้รังสีแกมมา ข้อเสียไม่สามารถทำลายสปอร์และท็อกซินของ ไวรัสหรือเชื้อราบางตัว

non ionizing radiation ได้แก่ อุลตราไวโอเลต ฆ่า TB ได้ภายใน 5 นาที มีความยาวช่วงคลื่นประมาณ 130-400 nm มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ ข้อดี ประหยัดค่าใช้จ่าย ไม่ทิ้งคราบติดค้าง นิยมใช้ลดจำนวนเชื้อในอากาศ มักใช้ช่วงคลื่น 260 nm ข้อเสีย การแทรกซึมไม่ดี ทำลายเฉพาะส่วนผิว เช่น ก้อนเลือดทำลายเชื้อได้เฉพาะบนผิว ไม่ปลอดจุลินทรีย์ทุกชนิด ถูกผิวหนังอาจไหม้และเป็นอันตรายต่อตา

2.13.1.4 การกรอง (filtration) เป็นการทำให้ปราศจากเชื้อโดยขจัดเชื้อออกจากสิ่งที่ต้องการ มักใช้ขจัดเชื้อออกจากของเหลวที่ไม่สามารถSterilizeได้ด้วยความร้อนหรือวิธีอื่นได้ เพราะเป็นสิ่งที่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน เช่น พลาสมา ซีรัม เอ็นไซม์ น้ำตาล ยาปฏิชีวนะ วิตามินหรือสารพิษ ตัวอย่าง ได้แก่ Osmosis ในตู้น้ำหยดหรือตู้เลี้ยงเซลล์เลือด กลไกการกรองใช้หลักการการเคลื่อนที่ของสารผ่านรูของแผ่นกรองที่มีขนาดเล็กซึ่งจุลินทรีย์ไม่สามารถผ่านรูได้ และเกี่ยวข้องกับไฟฟ้าสถิตของสารการดูดซับ ใช้อุปกรณ์ในการกรองคือ แผ่นกรองและตัวเครื่องกรอง ทำให้เกิดภาวะสุญญากาศจะช่วยให้กรองได้รวดเร็ว (อัมพร เทียงตรงดี, 2550)

2.13.2 วิธีทางเคมี (chemical method) ได้แก่

คือมักใช้กับวัตถุหรือสารที่ไม่สามารถใช้ความร้อน หรือวิธีทางกายภาพอื่น ๆ ได้ มักจะใช้ร่วมกับการถนอมอาหารที่ใช้ความร้อน ความเย็นและการทำแห้ง สารเคมีที่ใช้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.13.2.1 สารกันเสีย (Preservatives) ใช้ป้องกันการเน่าเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์ เช่น กรดอินทรีย์ ต่าง ๆ (กรดซอร์บิก, กรดเบนโซอิก, กรดอะซิติก ฯลฯ) น้ำตาล กลีโคแลกแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กลีโกลิน ไตรด์ กลีโกลิน ไตรด โพแตสเซียมเมตาไบ

ซัลไฟต์ ฯลฯ สารเหล่านี้จะชะลอหรือ ยับยั้งการสร้างเชื้อหุ้มเซลล์ การทำงานของเอนไซม์ การสร้างสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์ จึงช่วยชะลอหรือยับยั้งการเจริญ ของจุลินทรีย์อาหารจึงไม่เน่าเสียหรือไม่น่าเสีย

2.13.2.1.1 สารป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในอาหาร ได้แก่ สารกันหืน (Antioxidants) เช่น BHA BHT ฯลฯ สารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล (Antibrowning) ในอาหาร เช่น กลีโอสัลไฟต์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้สารที่เรียกว่า แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งสร้างขึ้นจากแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก เช่น *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp. และ *Lactococcus* sp. เพื่อถนอมอาหารในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ โดยผสมสารแบคเทอริโอซินหรือแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินลงในอาหารเพื่อให้ทำลายจุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อนมาแล้วทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีลักษณะทาง พันธุกรรมใกล้เคียงกัน ต้องการปัจจัยทางชีวภาพคล้าย ๆ กัน เช่น อาหาร แหล่งที่อยู่ ฯลฯ แต่ไม่ทำลายแบคทีเรีย ที่เป็นผู้สร้าง และยังสามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในอาหารนั้น ๆ ได้ด้วย

วิธีทางเคมี (chemical method) มักใช้กับวัตถุหรือสารที่ไม่สามารถใช้ความร้อนหรือวิธีทางกายภาพอื่น ๆ ได้ เช่น กล้องตรวจพิเศษต่าง ๆ ชนิดของสารเคมีแบ่งตามระดับการทำลายจุลินทรีย์ ถ้าทำลายเซลล์ปกติและสปอร์เรียก sterilants ถ้าทำลายเฉพาะเซลล์ปกติแต่ไม่ทำลายสปอร์ เรียก disinfectants ซึ่งใช้กับสิ่งไม่มีชีวิตสำหรับ antiseptic ใช้กับสิ่งมีชีวิต โดยมีวิธีการ chemical method ออกฤทธิ์โดยทำให้หน้าที่ของส่วนประกอบสำคัญของจุลินทรีย์เสียไป เช่น เชื้อหุ้มเซลล์ โปรตีนในเซลล์ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ คือ ความเข้มข้นของสารเคมี ระยะเวลา อุณหภูมิ และภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ ถ้าสิ่งแวดล้อมสกปรกมากจะออกฤทธิ์ได้น้อย เช่น ในหนอง เลือด ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อฤทธิ์ของสารเคมี ขึ้นกับจำนวน ชนิดและอายุของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของน้ำยาทำลายเชื้อ เช่น alcohol ออกฤทธิ์ที่ 60-90 เปอร์เซ็นต์ ที่นิยมใช้คือ 70 เปอร์เซ็นต์ หรือ การเติม sodium bisulfite ที่ใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารใช้เพื่อเป็นสารกันเสีย ที่มีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก ง่ายต่อการใช้งาน ช่วยยับยั้งการเจริญของ ยีสต์ (yeast) รา (mold) และแบคทีเรีย (bacteria) เช่น ใช้ฆ่าจุลินทรีย์ในการทำไวน์ (wine) เบียร์ ในปริมาณระหว่าง ร้อยละ 0.01-0.02 (ธีรวัลย์ ชาญ-ฤทธิเสน, 2554) ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อ เช่น hydrogen peroxide ที่ระยะเวลา 30 นาที เป็น disinfectant ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง เป็น sterilant อุณหภูมิที่ใช้ และในอุตสาหกรรมการทำไวน์ได้มีการเติมสารซัลไฟต์ หรือ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (sulfite หรือ potassium metabisulfite, PMS) โดยผลึกของซัลไฟท์จะทำให้เกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide, SO₂) ซึ่งสามารถใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำองุ่นได้ จากปฏิกิริยาทางเคมีซัลไฟท์จะให้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ครึ่งหนึ่งจากปริมาณซัลไฟท์ที่เติมลงไป ให้ใช้ซัลไฟท์ปริมาณ 0.1-0.15 กรัมต่อลิตร (อัมพร เทียงตรงดี, 2550) ในการผลิตไวน์แต่ละชนิดมักมีการเติม KMS ที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณ PMS ที่ใช้ในไวน์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของไวน์	มิลลิกรัม/ลิตร
ไวน์แดงคูล (dry red wine)	160
ไวน์ขาวคูล (dry white wine)	210
ไวน์แดงมีน้ำตาล 5 กรัม/ลิตร หรือมากกว่า	210
ไวน์ขาวมีน้ำตาล 5 กรัม/ลิตร หรือมากกว่า	260

ที่มา : ศรีอุบล ทองประดิษฐ์, 2546; อัมพร เทียงตรงดี, 2550



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การพัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

3.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 มาจาก stock เก็บเชื้อของห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวโมเลกุลพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำมาเลี้ยงเปรียบเทียบในอาหาร 4 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 molasses and diamonium phosphate (MD) สูตรที่ 2 molasses diamonium phosphate and yeast extract (MDY) และสูตรที่ 3 molasses (M) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป nutrient glucose broth (NGB) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อทุกกรรมวิธีมาทิ้งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที เมื่ออาหารเย็นจึงเจียเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ใส่ในอาหารขวดละ 1 loop จากนั้น นำไปบ่มโดยการเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของเชื้อด้วยวิธี dilution plate count โดยทำการเจือจางความเข้มข้น 8 ระดับคือ 10^{-1} - 10^{-8} นำไปเพาะ (spread plate) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร nutrient agar (NA) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารในแต่ละความเจือจาง (30-300 โคโลนี) และคำนวณโคโลนีเชื้อในอาหารแต่ละสูตร โดยใช้สูตรคำนวณตามวิธีการของ จารุณี เกษรพิกุล; 2558, Nancy et al., 2011 โดยแสดงสูตรดังนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (cfu.ml}^{-1}\text{)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ(ml)}}$$

3.1.2 การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry)

พัฒนาสูตรชีวภัณฑ์ 2 สูตรโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารพา สูตรที่ 1 แป้งทัลคัม และสาร carboxymethyl cellulose (CMC) สูตรที่ 2 แป้งมันสำปะหลัง และสาร carboxymethyl cellulose (CMC) ผสมในอัตราส่วน 10:1 (วราภรณ์ ภูักดีพันธ์ และคณะ, 2552; Teera-arunsiri, 2003) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 2 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ นำไปทิ้งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่

อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที 2 ครั้งโดยแต่ละครั้งห่างกัน 1 วัน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า *B. subtilis* ที่สามารถเพิ่มปริมาณในอาหารที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 3.1.1 ที่ผ่านการเลี้ยงขยายเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผสมลงในสารพาหะ 2 สูตร ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นนำไปทำแห้งโดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) โดยใช้อุณหภูมิในกระบวนการพ่นฝอยเปรียบเทียบ 3 อุณหภูมิ คือ 80, 75, 65 องศาเซลเซียส ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อในแต่ละสูตร โดยใช้น้ำหนักผลิตภัณฑ์ 0.1 กรัม โดยวิธี dilution plate count เช่นเดียวกับวิธีการในการทดลองที่ 3.1.1 จำนวนโคโลนีเชื้อที่มีชีวิตรอดโดยใช้สูตรคำนวณตามการทดลองที่ 3.1.1 จากนั้นเลือกสูตรที่คงความมีชีวิตรอดของเชื้อได้สูงที่สุดไปใช้ในการทดลองที่ 3.2.1 (กนกวรรณ ศรีบุญจำนั, 2555; Franks et al., 1991; Meng, 2015)

3.1.3 การประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ผลิตโดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย

ประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* จากสูตรที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1.2 หลังจากการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องประมาณ 26-30 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบการมีชีวิตรอด โดยตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งแรกหลังการผลิตเสร็จ และตรวจนับทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dilution plate count เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1.1 และคำนวณโคโลนีเชื้อที่มีชีวิตรอดโดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 และประเมินอัตราการปนเปื้อนของเชื้ออื่น โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่อจานเลี้ยงเชื้อ (Prescott, 2002; Wiyono et al., 2008) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ การปนเปื้อน} = \frac{\text{โคโลนีเชื้อจุลินทรีย์อื่น}}{\text{โคโลนีเชื้อแบคทีเรีย } B. subtilis} \times 100$$

3.2 การพัฒนาวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

3.2.1 ทดสอบสูตรอาหาร อัตราส่วน และวิธีการเขย่าที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อ

วางแผนการทดลอง CRD ทำการศึกษาสูตรอาหารในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อ (starter) 3 สูตร คือ สูตรที่ 1 อาหาร MDY สูตรที่ 2 คอนอร์ซูปไก่ 1 ก้อน (10 กรัม) ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร สูตรที่ 3 อาหาร MD (molasses 25 กรัม, diamonium phosphate 1 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) + คอนอร์ซูปไก่ 1 ก้อน ทำการเตรียมอาหาร 3 สูตรและนำไปบรรจุในภาชนะบรรจุให้ได้ประมาณ ¼ ของขนาดภาชนะ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที รองอาหารเย็นจึงเติมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ลงในสูตรอาหารแต่ละสูตร บันทึกผลโดยนำมาตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยวิธีการวัดค่าดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ 600 นาโนเมตร และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยวิธี dilution plate count และ

ทำการคัดเลือกสูตรที่ดีที่สุดนำมาทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสม จำนวน 5 อัตรา คือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร บันทึกผลโดยนำมาตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ และทำการคัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมนำมาศึกษาเปรียบเทียบการให้อากาศ 3 วิธี คือ **วิธีการที่ 1** ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเขย่าที่ 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ด้วย rotary shaker ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ก่อนเก็บเซลล์ทุกครั้ง **วิธีการที่ 2** เขย่าเพียง 2 ครั้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง **วิธีการที่ 3** ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องเขย่ากเว้นในช่วงเวลาเก็บเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง (สุพัตรา ดันติวานิช, 2529) จากนั้นเลือกกรรมวิธีที่ดีที่สุดในการเพิ่มปริมาณเชื้อไปใช้ในการทดลองที่ 3.2.2

3.2.2 การทดสอบวิธีการให้อาหารสูตรขยาย ปลอดเชื้อ และเปรียบเทียบปริมาณอัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (multiplication media)

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของกรรมวิธีการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยาย และอัตราส่วนหัวเชื้อกับอาหารสูตรขยายที่จะใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนนำไปใช้ในสภาพไร้อากาศ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 3 ซ้ำ นำสูตรอาหารและวิธีการที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สูงที่สุดจากการทดลองที่ 3.2.1 มาใช้ในการทดลองนี้ โดยศึกษากรรมวิธีการทำให้ปลอดเชื้อจำนวน 5 กรรมวิธี คือ 1) นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที 2) ต้มอาหารให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วใช้ทันที 3) ใช้สารโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (PMS) ความเข้มข้น 150 ppm, 200 ppm และ 250 ppm ทิ้งไว้ 6 และ 24 ชั่วโมง 4) ใช้สารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (SMS) ความเข้มข้น 150 ppm, 200 ppm และ 250 ppm ทิ้งไว้ 6 และ 24 ชั่วโมง 5.) ไม่ฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) จากนั้น ประเมินการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อ โดยวิธี dilution plate count เช่นเดียวกับวิธีการในการทดลองที่ 3.1.1 นำมานับจำนวน โคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ และประเมินอัตราการปนเปื้อนของเชื้ออื่น จากนั้นคัดเลือกกรรมวิธีที่ดีที่สุด ในการทำให้ปลอดเชื้อมาศึกษาอัตราส่วนของหัวเชื้อ (starter culture) ที่ใช้ นำอัตราส่วนหัวเชื้อที่ดีที่สุดในการเพิ่มปริมาณจากการทดลองที่ 3.2.1 มาใช้ในการทดลองนี้ โดยนำมาผสมลงในอาหารขยายของกรรมวิธีที่ทำให้ปลอดเชื้อที่ดีที่สุด เปรียบเทียบกับกรรมวิธีมาตรฐาน (หัวเชื้อ:อาหารขยาย) คือ 1:10, 1:100, 1:200 บ่มในสภาพอุณหภูมิห้องโดยคนส่วนผสม 2 ครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นประเมินการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อ โดยวิธี dilution plate count (กนกรัตน์ ป้องประทุม และคณะ, 2542; ภัทราภรณ์ ศรีสมรรถการ, 2542; Wiyono et al., 2008)

3.2.3 การทดสอบการเพิ่มปริมาณของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ ที่ผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยในระดับการทดลองขนาดกลาง

ทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ในระดับการทดลองขนาดกลาง ทำการนึ่งฆ่าเชื้อจากน้ำตาล 2 ครั้ง ภายใต้ความดัน

ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที ก่อนนำมาเตรียมอาหารสูตร molasses diamonium phosphate and yeast extract (MDY) และทำให้ปลอดเชื้อโดยเลือกกรรมวิธีปลอดเชื้อที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.2.2 มาใช้ในการทดลองนี้ เปรียบเทียบกรรมวิธีในการควบคุมที่ไม่ทำการฆ่าเชื้ออาหาร หลังการเตรียมอาหารสูตรขยายในถังขนาด 12 ลิตร ทำการเติมกล้าเชื้อของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ที่เลี้ยงขยายในอาหารสูตรที่ดีที่สุด ในอัตราส่วน 1:10 เลี้ยงขยายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเขย่า 2 ครั้ง เก็บผลการทดลองด้วยวิธีการ dilution plate count เช่นเดียวกับวิธีการในการทดลองที่ 3.1.1 นำมานับจำนวนโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ และประเมินอัตราการปนเปื้อนของเชื้ออื่น (ประวิติ บัวศรี, 2553)

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักสูตรเกษตรกรในการใช้เป็นอาหารสูตรขยาย

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสูตรน้ำหมักของเกษตรกร โดยใช้น้ำหมักของเกษตรกรนำมาเจือจางกับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที เมื่ออาหารเย็นจึงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ใส่ในอาหารขวดละ 1 loop จากนั้นนำไปป้อนโดยการเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐาน NGB เก็บผลการทดลองด้วยวิธีการ dilution plate count เช่นเดียวกับวิธีการในการทดลองที่ 3.1.1 บันทึกผลการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 โดยวิธีการสังเกตการเจริญของเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ (ภาวนา ลิกขนานนท์, 2542; สุริยา สาสนรักกิจ, 2542)

3.2.5 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัตราการใช้เชื้อขยาย และวิธีการนำไปใช้ที่เหมาะสมต่อ

การควบคุมโรคเน่าและในระยะกล้าของผักกาดเขียวปลี

ทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสม และวิธีการนำไปใช้ในการควบคุมโรคเน่าและในระยะกล้าของผักกาดเขียวปลี โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ซึ่งแต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น โดยศึกษาปัจจัยในการทดลองจำนวน 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 1 คือ ความเหมาะสมของอัตราส่วนเชื้อขยาย:น้ำ จำนวน 5 กรรมวิธี ดังนี้ 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 และน้ำเปล่า (กรรมวิธีควบคุม) และปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการนำไปใช้ จำนวน 4 กรรมวิธี คือ 1) คลุกเมล็ด 2) แช่ราก 3) คลุกเมล็ดร่วมกับแช่ราก 4) ไม่คลุกเมล็ดและไม่แช่ราก (กรรมวิธีควบคุม) ทำการย้ายกล้าเมื่อผักกาดเขียวปลีอายุ 15-20 วัน หลังย้ายกล้า 10 วัน ทำการประเมินการเกิดโรคโดยการขลิบปลายใบขนาด 0.5 เซนติเมตร 1 ใน 2 ใบ และฉีดพ่นด้วย suspension ของเชื้อ *E. carotovora* pv. *carotovorum* ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1×10^8 cfu.ml⁻¹) โดยฉีดต้นละ 5 มิลลิลิตร และประเมินความรุนแรงโรค (disease severity) หลังปลูกเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยระดับการประเมินความรุนแรงโรคให้ระดับคะแนน 0-4 คือ 0 = ใบพืชไม่แสดงอาการ, 1 = เกิดแผลน้อยกว่า 25% ของพื้นที่ใบ, 2 = เกิดแผล 25-50% ของพื้นที่ใบ, 3 = เกิดแผล 50-75% ของพื้นที่ใบ, 4 = เกิดแผล

มากกว่า 75% ของพื้นที่ใบ (วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และคณะ, 2549; ชานนทร์ แสงจันทร์, 2557; Vincelli and Hershman, 2011) แล้วทำการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรค (ชานนทร์ แสงจันทร์, 2557; Vincelli and Hershman, 2011) ดังสมการนี้

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = (จำนวนต้นผักกาดเขียวปลีที่เป็นโรค/จำนวนต้นผักกาดเขียวปลีทั้งหมด) x 100

ดัชนีการยับยั้งโรค (%) = $[(A-B)/A] \times 100$

โดย A = พื้นที่ที่แสดงอาการของโรคบนต้นผักกาดเขียวปลีในชุดควบคุม

B = พื้นที่ที่แสดงอาการของโรคบนต้นผักกาดเขียวปลีในชุดทดลอง

โดยการให้คะแนนระดับความรุนแรงของโรคให้ค่าดัชนีตั้งแต่ 0 – 5 คูณจากพื้นที่ใบที่ถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลาย

3.2.6 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการควบคุมโรค

ดำเนินการทดลองในโรงเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ซึ่งแต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น โดยทดสอบในผักกาดเขียวปลี ตามกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ฉีดพ่นด้วยอัตราเชื้อขยายที่เหมาะสมที่สุดจาก 3.2.4 1 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 วัน
กรรมวิธีที่ 2	ฉีดพ่นด้วยอัตราเชื้อขยายที่เหมาะสมที่สุดจาก 3.2.4 2 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 และ 20 วัน
กรรมวิธีที่ 3	ฉีดพ่นด้วยอัตราเชื้อขยายที่เหมาะสมที่สุดจาก 3.2.4 3 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10, 20 และ 30 วัน
กรรมวิธีที่ 4	คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยอัตราเชื้อขยายที่เหมาะสมที่สุดจาก 3.2.4 1 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 วัน
กรรมวิธีที่ 5	คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยอัตราเชื้อขยายที่เหมาะสมที่สุดจาก 3.2.4 2 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 และ 20 วัน
กรรมวิธีที่ 6	คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยอัตราเชื้อขยายที่เหมาะสมที่สุดจาก 3.2.4 3 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10, 20 และ 30 วัน
กรรมวิธีที่ 7	คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสูตรผงลาร์มิน่า อัตราส่วน 8 กรัม ต่อน้ำ 10 ลิตร
กรรมวิธีที่ 8	คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสารเคมี คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราส่วน 30 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 9	คลุกเมล็ด แช่รากร่วมกับการฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าหนึ่งมาเชื้อ

เมื่อผักกาดเขียวปลีมีอายุ 45 วันทำการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรคเน่าและ *E. carotovora* pv. *carotovorum* โดยทำการเตรียม suspension โดยใช้โคโลนีเดียวไปเลี้ยงในอาหาร NGB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu.ml⁻¹ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 โดยฉีดเข้าดินละ 20 มิลลิลิตร คลุมด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 3 วัน และประเมินความรุนแรงโรค (disease severity) และจำนวนต้นที่เป็นโรค (disease incidence) หลังปลูกเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยให้ระดับการประเมินความรุนแรงโรคเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.4 (วิลาวรรณ เชื้อบุญ และคณะ, 2549; ชานนทร์ แสงจันทร์, 2557; Vincelli and Hershman, 2011) แล้วทำการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์ดัชนีการยับยั้งโรค (วิลาวรรณ เชื้อบุญ และคณะ, 2549; ชานนทร์ แสงจันทร์, 2557; Vincelli and Hershman, 2011) ดังสมการนี้

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = (จำนวนต้นผักกาดเขียวปลีที่เป็นโรค/จำนวนต้นผักกาดเขียวปลีทั้งหมด) x 100

ดัชนีการยับยั้งโรค (%) = [(A-B)/A] x 100

โดย A = พื้นที่ที่แสดงอาการของโรคบนต้นผักกาดเขียวปลีในชุดควบคุม

B = พื้นที่ที่แสดงอาการของโรคบนผักกาดเขียวปลีในชุดทดลอง

โดยการให้คะแนนระดับความรุนแรงของโรคให้ค่าดัชนีตั้งแต่ 0 – 5 ดูจากพื้นที่ใบที่ถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลาย

3.2.7 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางองค์ประกอบของเซลล์ผักกาดเขียวปลีด้วยเทคนิค FTIR microspectroscopy

3.2.7.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างของผักกาดเขียวปลีจากกรรมวิธีที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดสอบในโรงเรือน นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยโกร่งนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางองค์ประกอบด้วยเทคนิค Infrared (IR) Spectrometer ต่อไป (ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ และคณะ, 2555; กาญจนา ธรรมนุ, 2010; ธัญมน พิวทอง, 2557; Buensanteai et al., 1012)

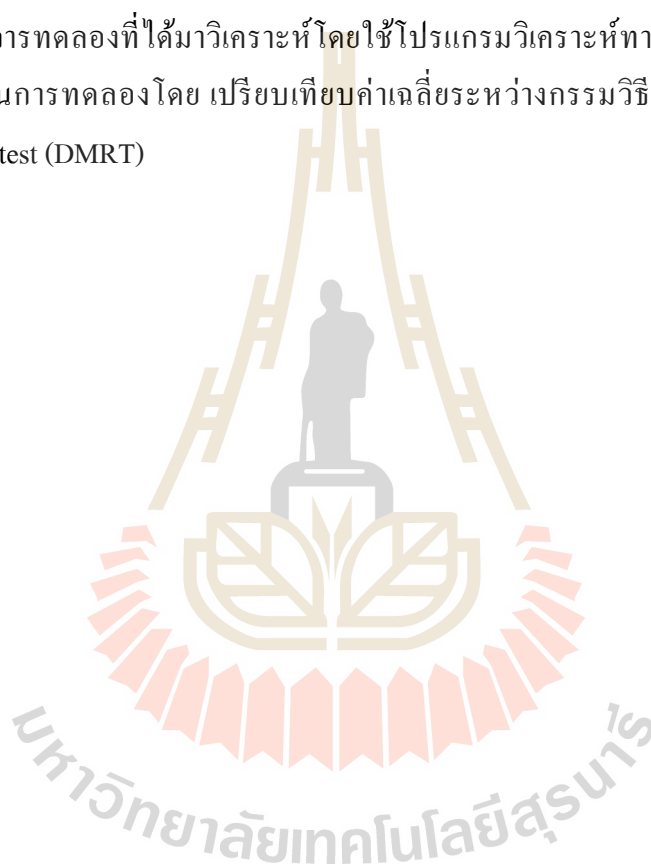
3.2.7.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เครื่อง FTIR microspectroscopy

นำตัวอย่างใบผักกาดเขียวปลีที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างในข้อที่ 3.2.6.1 มาทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ด้วยเครื่อง fourier transform infrared spectroscopy: FT-IR (Tensor 27, Bruker optic) ชนิด attenuated total reflectance (ATR) ที่มีระบบตรวจวัดแบบ mercury cadmium telluride (MCT) วัดค่าการดูดกลืน

แสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ช่วง $600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ วัดที่ค่า Resolution 6 cm^{-1} จำนวน scan 64 วิเคราะห์ผลและแบ่งกลุ่มสารชีวเคมีในเซลล์ใบผักกาดเขียวปลี ด้วยโปรแกรม unscrambler X 10.1 (CAMO, Norway) โดยการทำ multivariate data analysis แบบ principal component analysis (PCA) (ชนรัตน์ศรีรุ่งเรืองและคณะ, 2555; ญัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ และคณะ, 2555; ัญมน พิวทอง, 2557; รุ่งทิพย์ สังข์เผือก, 2557; Buensanteai et al., 2012; Thumanu et al., 2014)

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for windows v.14.0 ตามแผนการทดลองโดย เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกรรมวิธีโดยวิธีการของ duncan's multiple range test (DMRT)



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การพัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

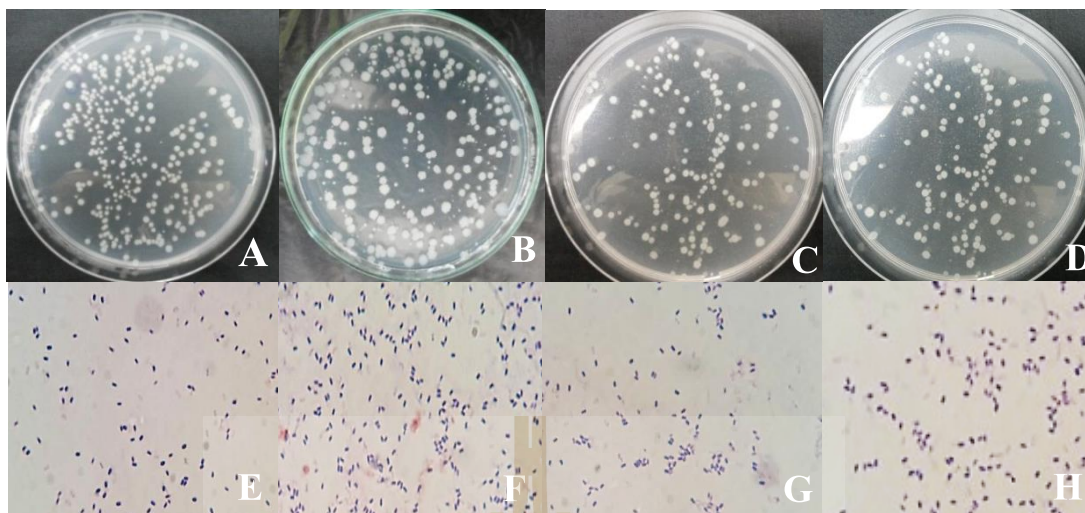
4.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 มาเลี้ยงในอาหารจำนวน 3 สูตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป nutrient glucose broth (NGB) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณเชื้อคือ สูตรอาหาร molasses diamonium phosphate and yeast extract (MDY) โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.30 \pm 0.16 \times 10^9$ cfu.ml⁻¹ และสูตรอาหารมาตรฐานสูตร NGB มีปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.27 \pm 0.15 \times 10^9$ cfu.ml⁻¹ โดยมีปริมาณของเชื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือ สูตรอาหาร molasses and diamonium phosphate (MD) โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.43 \pm 0.27 \times 10^7$ cfu.ml⁻¹ และอาหารสูตร molasses (M) โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $2.37 \pm 0.20 \times 10^6$ cfu.ml⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณของเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร MDY และ NGB ดังแสดงในตารางที่ 4.1 (ภาพที่ 4.1) ดังนั้น จึงเลือกนำอาหารสูตร MDY ซึ่งเป็นสูตรที่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อได้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ NGB มาใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.1 การเพิ่มประชากรของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สูตรอาหาร ^{1/}	ปริมาณประชากร (cfu.ml ⁻¹) ^{1/}
Molasses and diamonium phosphate	$1.43 \pm 0.27 \times 10^7$ b
Molasses diamonium phosphate and yeast extract	$1.30 \pm 0.16 \times 10^9$ a
Molasses	$2.37 \pm 0.20 \times 10^6$ b
Nutrient glucose broth	$1.27 \pm 0.15 \times 10^9$ a
F-test	**
CV (%)	5.84

^{1/}วิธีการประเมินประชากรเชื้อ จำนวนแบคทีเรีย (cfu.ml⁻¹) = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ml)}}$



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเอ็นโดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ A และ E) สูตรอาหาร molasses and diamonium phosphate (MD) B และ F) สูตรอาหาร molasses diamonium phosphate and yeast extract (MDY) C และ G) สูตรอาหาร molasses (M) D และ H) สูตรอาหาร nutrient glucose broth (NGB)

4.1.2 การพัฒนาสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry)

เตรียมเชื้อในอาหารสูตรที่เหมาะสมคือ สูตร MDY เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* จากการทดลองที่ 4.1.1 แล้วนำมาพัฒนาสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์จำนวน 2 สูตร โดยเปรียบเทียบสารพาที่ผสมลงในอาหารสูตร MDY แล้วนำไปผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยสูตรที่ 1 ประกอบด้วยแป้งทัลคัมและ CMC สูตรที่ 2 ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง และ CMC ที่ผสมสารพาทั้ง 2 ชนิดในอัตราส่วน 9:1 หลังจากผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย และเปรียบเทียบอุณหภูมิในกระบวนการพ่นฝอยทั้ง 3 อุณหภูมิ คือ 65, 75 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าลักษณะสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์หลังผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยของทั้ง 2 สูตร มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลละเอียด ดังแสดงในภาพที่ 4.2 แต่พบว่าปัญหาของสารพาสูตรที่ 1 มีการตกตะกอนของทัลคัมซึ่งมีผลในขั้นตอนของการดูดอาหารผ่านสายยางที่ทำให้เกิดการอุดตันของสารพา และเมื่อทำการประเมินความรอดชีวิตของประชากรเชื้อหลังจากผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย พบว่า สูตรสำเร็จชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 อบที่อุณหภูมิ 75 และ 65 องศาเซลเซียส มีจำนวนประชากรเชื้อรอดชีวิตเท่ากับ $1.40 \pm 0.14 \times 10^8$ และ $1.13 \pm 0.23 \times 10^8$ cfu.g⁻¹ ตามลำดับ รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 80 องศา

เซลเซียส โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.63 \pm 0.11 \times 10^6$ cfu.g⁻¹ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับประชากรของเชื้อก่อนผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าเชื้อมีปริมาณลดลงเล็กน้อย โดยที่เชื้อตั้งต้นเดิมมีเชื้อเท่ากับ 1.21×10^9 cfu.ml⁻¹ และการประเมินการรอดชีวิตของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 หลังผ่านการอบแห้งพบว่า ประชากรเชื้อที่รอดชีวิตสูงที่สุดคือ ที่อุณหภูมิ 75 และ 65 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.17 \pm 0.91 \times 10^9$ และ $1.15 \pm 0.21 \times 10^9$ cfu.g⁻¹ ไม่แตกต่างกับปริมาณของเชื้อตั้งต้นเดิมมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 2.01×10^9 cfu.ml⁻¹ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอุณหภูมิที่มีความรอดชีวิตของประชากรเชื้อต่ำที่สุดคืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $2.36 \pm 0.12 \times 10^6$ cfu.g⁻¹ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นสูตรของสารพาที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาชีวภัณฑ์โดยการใช้เทคนิคการทำแห้งด้วยกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยคือ สูตรสารพาสูตรที่ 2 ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังและ CMC โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำแห้งเชื้อ คืออุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ถึงแม้อุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่ชีวภัณฑ์ที่ได้หลังทำแห้งจะมีลักษณะจับกันเป็นก้อนไม่เป็นผงละเอียดจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ต่อไป



ภาพที่ 4.2 ลักษณะชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ของสูตรที่ 2 หลังผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ A) อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส B) อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และ C) อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.2 ปริมาณการรอดชีวิตของประชากรของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ของสูตรสารพา 2 สูตร ที่อุณหภูมิในกระบวนการพ่นฝอย 3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิ	ปริมาณประชากรเชื้อ <i>B. subtilis</i> (cfu.g ⁻¹) ^{1/}		ลักษณะของชีวภัณฑ์
	สารพาสูตรที่ 1 ^{2/}	สารพาสูตรที่ 2 ^{3/}	
80	1.63±0.11x10 ⁶ b	2.36±0.12x10 ⁶ b	ผงแห้ง, สีสน้ำตาลอ่อน
75	1.40±0.44x10 ⁸ a	1.17±0.91x10 ⁸ a	ผงแห้ง, สีสน้ำตาลอ่อน
65	1.13±0.23x10 ⁸ a	1.15±0.21x10 ⁸ a	จับตัวกัน, สีสน้ำตาลอ่อน
F-test	**	**	
CV (%)	5.20	6.35	

^{1/} วิธีการประเมินประชากรเชื้อ cfu/g = $\frac{N \times DF \times V_0 \times 1000}{V_a \times W_0}$ (N = จำนวนโคโลนีที่นับได้, DF = dilution factor, V₀ = สารแขวนลอยที่เป็น strok เริ่มต้น, V_a = ปริมาณของสารแขวนลอยที่ใช้ในการ spread plate (μl), W₀ = น้ำหนักของสูตรชีวภัณฑ์ที่ได้ประเมิน)

^{2/} สารพาสูตรที่ 1 ประกอบด้วย แป้งทาลัม และ CMC

^{3/} สารพาสูตรที่ 2 ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง และ CMC

4.1.3 การประเมินความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และการปนเปื้อนของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 ที่ผลิตโดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย

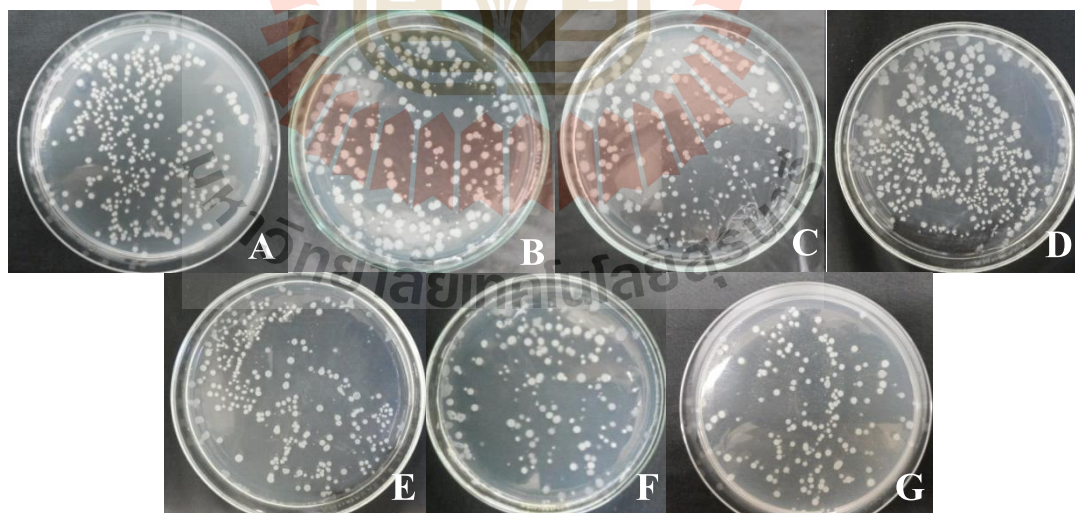
4.1.3.1 การประเมินความมีชีวิตรอด

เก็บในภาชนะที่มีฝาปิด วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 26-30 องศาเซลเซียส โดยหลังจากประเมินความรอดชีวิตของเชื้อหลังทำแห้งเสร็จของทั้ง 2 สูตร ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 ที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีจำนวนรอดชีวิตเชื้อสูงที่สุด จึงนำมาประเมินความมีชีวิตรอดของเชื้อในสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dilution plate count พบว่า มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดตั้งแต่เดือนที่ 0 ถึงเดือนที่ 2 มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดเท่ากับ 2.14×10⁸, 1.12×10⁸ และ 1.08×10⁸ cfu.g⁻¹ ตามลำดับ ต่อมาในเดือนที่ 3-6 พบว่ามีปริมาณเชื้อที่อยู่รอด ลดลง เท่ากับ 9.6×10⁷, 1.04x10⁷, 9.6x10⁷ และ 1.19x10⁶ cfu.g⁻¹ ตามลำดับ โดยปริมาณเชื้อที่อยู่รอดในแต่ละเดือนนั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 สูตร spray dry สูตรที่ 2 ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน ของชีวภัณฑ์สูตรที่ 2

เดือนที่	ปริมาณประชากรเชื้อ <i>B. subtilis</i> (cfu.g ⁻¹) ^{1/}
0	2.14±0.16×10 ⁸ a
1	1.12±0.30×10 ⁸ a
2	1.08±0.65×10 ⁸ ab
3	9.6±0.11×10 ⁷ b
4	1.04±0.41×10 ⁷ ab
5	9.6±0.37×10 ⁷ b
6	1.19±0.75×10 ⁶ c
F-test	**
CV (%)	10.86

^{1/} วิธีการประเมินประชากรเชื้อ cfu/g = $\frac{N \times DF \times V_0 \times 1000}{V_a \times W_0}$ (N = จำนวนโคโลนีที่นับได้, DF = dilution factor, V₀ = ปริมาณสารแขวนลอยที่เป็น strok เริ่มต้น, V_a = ปริมาณของสารแขวนลอยที่ใช้ในการ spread plate, W₀ = น้ำหนักของสูตรชีวภัณฑ์ที่ได้ประเมิน)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะ โคโลนีของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ในผลิตภัณฑ์ spray dry สูตรที่ 2 ประเมินทุกเดือนในสภาพอุณหภูมิห้อง A) ที่ 0 เดือน B) ที่ 1 เดือน C) ที่ 2 เดือน D) ที่ 3 เดือน E) ที่ 4 เดือน F) ที่ 5 เดือน และ G) ที่ 6 เดือน

4.1.3.2 การประเมินการปนเปื้อน

หลังจากประเมินความรอดชีวิตของเชื้อหลังทำแห้ง และเปรียบเทียบอุณหภูมิพบว่า สูตรชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 ที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส มีจำนวนรอดชีวิตเชื้อสูงที่สุด ดังนั้น เมื่อนำมาประเมินการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าการปนเปื้อนในสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ มีการปนเปื้อนของเชื้อราเท่ากับ 2.92, 5.65, 7.09, 9.31, 11.53, 9.99 และ 8.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เท่ากับ 1.45, 1.18, 2.46, 3.1, 2.24, 1.37 และ 1.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 สูตรที่ 2 ประเมินทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน

เดือนที่	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์(เปอร์เซ็นต์) ^{1/}	
	เชื้อรา	แบคทีเรีย
0	2.92	1.45
1	5.65	1.18
2	7.09	2.46
3	9.31	3.1
4	11.53	2.24
5	9.99	1.37
6	8.07	1.67

^{1/} การคำนวณเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน (คิดแปลงจาก อภิสิทธิ์ และคณะ, 2553) % การปนเปื้อน = $\frac{\text{โคโลนีเชื้อจุลินทรีย์อื่น}}{\text{โคโลนีเชื้อแบคทีเรีย } B. subtilis}} \times 100$

4.2 การพัฒนาวิธีการใช้สูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

4.2.1 การทดสอบสูตรอาหารขยาย อัตราส่วน และวิธีการเขย่าที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ

ผลของการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อในอาหาร 3 สูตร พบว่า เมื่อนำสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ชนิดผงฝอยแห้งของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน มาเลี้ยงในอาหารขยายที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ได้แก่ อาหารสูตรที่ 1 คนอร์ชูปไก่ อาหารสูตรที่ 2 MDY และอาหารสูตรที่ 3 คนอร์ชูปไก่ + MDY ผลการทดลอง พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตรมีผลในการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสูตรที่สามารถเพิ่ม

ปริมาณกล้าเชื้อได้มากที่สุดคือ สูตรที่ 2 MDY โดยมีการเพิ่มขึ้นของกล้าเชื้อเท่ากับ 1.0×10^8 cfu.ml⁻¹ (OD=0.207) รองลงมาคือ สูตรที่ 3 คนอร์ซูปไก่ + MDY และสูตรที่ 1 คนอร์ซูปไก่ โดยมีการเพิ่มขึ้นของกล้าเชื้อเท่ากับ 5.0×10^7 cfu.ml⁻¹ (OD=0.199) และ 2.60×10^7 cfu.ml⁻¹ (OD=0.190) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ผลการทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ โดยทำการเปรียบเทียบ 5 อัตราส่วนคือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ผลการทดลองพบว่า อัตราส่วนของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 อัตรา มีผลในการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอัตราส่วน 0.5 มีการเพิ่มปริมาณของเชื้อได้ดีที่สุดคือ 1.7×10^8 cfu.ml⁻¹ (OD=0.215) รองลงมาคือ อัตราส่วน 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 โดยมีอัตราเชื้อเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.5×10^8 , 6.5×10^7 , 9.0×10^6 , 1.5×10^7 cfu.ml⁻¹ (OD=0.214, 0.203, 0.177 และ 0.185) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ผลการทดสอบประสิทธิภาพวิธีการเขย่าที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 โดยเปรียบเทียบ 3 กรรมวิธี คือ 1. เขย่าทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2. เขย่าที่ 6 และ 12 ชั่วโมง 3. ตั้งทิ้งไว้โดยไม่เขย่า จากผลการทดลองพบว่า กรรมวิธีในการเพิ่มปริมาณจำนวน 3 วิธี มีผลในการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อได้ดีที่สุดคือกรรมวิธีที่ 1 โดยมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อเท่ากับ 8.2×10^7 cfu.ml⁻¹ (OD=0.208) รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 และกรรมวิธีที่ 3 โดยมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อเท่ากับ 4.1×10^7 , 2.60×10^7 cfu.ml⁻¹ (OD=0.198 และ 0.190) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ดังนั้น การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อที่ดีที่สุดคือสูตร MDY และอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคืออัตรา 0.5 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร และสำหรับกรรมวิธีในการให้อาการของเชื้อที่ดีที่สุดคือ การเขย่าทุก 6 ชั่วโมง ทั้งนี้พบว่า ผลร่วมระหว่างสูตรอาหารและอัตราส่วนมีผลในการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเพียงผลร่วมระหว่างกรรมวิธีในการเพิ่มปริมาณ และสูตรอาหาร ไม่มีผลในการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันทางสถิติ และผลร่วมระหว่างกรรมวิธีในการเพิ่มปริมาณ และอัตราส่วน ไม่มีผลในการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันทางสถิติ ในการเลือกใช้คนอร์ซูปไก่ มาเตรียมเป็นสูตรอาหารเนื่องจากในคนอร์มีแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอาจมีปริมาณที่ไม่มากพอในการใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อ ถึงแม้ว่าจะมีราคาถูกและหาซื้อได้ง่ายแต่ในความจริงแล้วคนอร์ซูปไก่ 1 ก้อน ส่วนผสมเกินครึ่งมีเกลือถึง 49 เปอร์เซ็นต์ มีผงชูรสอีก 19 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื้อสัตว์ที่ใส่นั้นมีเพียง 0.8 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพของสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อแบคทีเรียของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

สูตรอาหาร	ปริมาณกล้าเชื้อ	
	ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ แบคทีเรีย (A_{600})	จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (cfu.ml^{-1}) ^{2/}
สูตรที่ 1 คนอร์ซูปไก่	0.190c ^{1/}	2.6×10^7
สูตรที่ 2 MDY	0.207a	1.0×10^8
สูตรที่ 3 คนอร์ซูปไก่ + MDY	0.199b	5.0×10^7
F-test	**	
CV (%)	15.46	

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

^{2/} เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสง Absorbance 600 nm กับความเข้มข้นเซลล์ (Log of cell (cfu.ml^{-1})) ดังแสดงตารางเปรียบเทียบในภาพภาคผนวกที่ 1

ตารางที่ 4.6 ผลของอัตราส่วนสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อแบคทีเรียของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

อัตราส่วน	ปริมาณกล้าเชื้อ	
	ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ แบคทีเรีย (A_{600})	จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (cfu.ml^{-1}) ^{2/}
0	0.03d ^{1/}	0
0.1	0.185c	1.5×10^7
0.2	0.177c	9.0×10^6
0.3	0.203b	6.5×10^7
0.4	0.214a	1.5×10^8
0.5	0.215a	1.7×10^8
F-test	**	
CV (%)	20.64	

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

^{2/} เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสง Absorbance 600 nm กับความเข้มข้นเซลล์ (Log of cell (cfu.ml^{-1})) ดังแสดงตารางเปรียบเทียบในภาพภาคผนวกที่ 1

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพของวิธีการเขย่าที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อแบคทีเรียของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

กรรมวิธีการเขย่า	ปริมาณกล้าเชื้อ	
	ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แบคทีเรีย (A ₆₀₀)	จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (cfu.ml ⁻¹) ^{2/}
เขย่าทุก 6 ชั่วโมง	0.208a ^{1/}	8.2×10 ⁷
เขย่า 2 ครั้ง	0.198b	4.1×10 ⁷
ไม่เขย่า	0.190c	2.6×10 ⁷
F-test	**	
CV (%)	18.72	

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

^{2/} เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสง Absorbance 600 nm กับความเข้มข้นเซลล์ (Log of cell (cfu.ml⁻¹)) ดังแสดงตารางเปรียบเทียบในภาพภาคผนวกที่ 1

4.2.2 การทดสอบวิธีการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยาย เปรียบเทียบปริมาณอัตราส่วนระหว่างกล้าเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (multiplication media)

ผลของการทดสอบประสิทธิภาพการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยาย โดยวิธี dilution plate count พบว่า กรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำให้ปลอดเชื้อเมื่อเทียบกับกรรมวิธีมาตรฐานการนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที คือกรรมวิธีการเติมสารโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (PMS) ความเข้มข้น 250 ppm ที่ 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีการปนเปื้อน โดยมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ $1 \pm 0.14 \times 10^1$ cfu.ml⁻¹ รองลงมาคือความเข้มข้น 200 ppm และ 150 ppm ซึ่งมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ $9.3 \pm 0.72 \times 10^5$ และ $7.4 \pm 0.34 \times 10^7$ cfu.ml⁻¹ ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีในการทดลองอื่นมีประสิทธิภาพการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยายต่ำโดยมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นสูง ดังแสดงการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในตารางที่ 4.8 และแสดงลักษณะโคโลนีในภาพที่ 4.4

ผลของการเปรียบเทียบปริมาณอัตราส่วนระหว่างกล้าเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (multiplication media) โดยใช้กล้าเชื้ออัตราส่วน 0.3 กรัม ต่อสูตรอาหารขยายที่เหมาะสมคืออาหารสูตร MDY ปริมาณ 1 ลิตร เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างกล้าเชื้อกับอาหารสูตรขยาย 3 อัตราส่วน คือ 1:10, 1:100, 1:200 และวิธีการทำให้ปลอดเชื้อ ผลการทดลองพบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด

ในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อในอาหารสูตรขยาย คือกรรมวิธีการเติมสารโปดัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (PMS) ความเข้มข้น 250 ppm ที่อัตราส่วน 1:10 มีอัตราเชื้อเจริญเท่ากับ $1.47 \pm 0.86 \times 10^8$ cfu.ml⁻¹ รองลงมาคืออัตราส่วน 1:100, 1:200 มีอัตราเชื้อเจริญเท่ากับ $1.86 \pm 0.13 \times 10^6$ และ $1.64 \pm 0.19 \times 10^6$ cfu.ml⁻¹ ตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีมาตรฐานการนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่อัตราส่วน 1:10, 1:100, 1:200 มีอัตราเชื้อเจริญเท่ากับ $1.30 \pm 0.18 \times 10^8$, $1.25 \pm 0.81 \times 10^6$ และ $1.39 \pm 0.13 \times 10^5$ cfu.ml⁻¹ ตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.5

ตารางที่ 4.8 ประสิทธิภาพของวิธีการฆ่าเชื้ออาหารสูตรขยาย

กรรมวิธีการฆ่าเชื้อ ^{2/}	การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น (cfu.ml ⁻¹) ^{1/}
Autoclave	ไม่ปนเปื้อน
ต้ม	$1.22 \pm 0.58 \times 10^8$ c
PMS 150 ppm, 6 hr.	$7.4 \pm 0.34 \times 10^7$ bc
PMS 200 ppm, 6 hr.	$9.3 \pm 0.72 \times 10^5$ bc
PMS 250 ppm, 6 hr.	$1.0 \pm 0.14 \times 10^1$ a
PMS 150 ppm, 24 hr.	$4.6 \pm 0.63 \times 10^8$ cd
PMS 200 ppm, 24 hr.	$9.8 \pm 0.11 \times 10^7$ bc
PMS 250 ppm, 24 hr.	$1.1 \pm 0.06 \times 10^4$ ab
SMS 150 ppm, 6 hr.	$8.0 \pm 0.60 \times 10^8$ cd
SMS 200 ppm, 6 hr.	$1.56 \pm 0.19 \times 10^8$ c
SMS 250 ppm, 6 hr.	$1.24 \pm 0.27 \times 10^8$ c
SMS 150 ppm, 24 hr.	$1.43 \pm 0.12 \times 10^8$ bc
SMS 200 ppm, 24 hr.	$7.9 \pm 0.58 \times 10^7$ b
SMS 250 ppm, 24 hr.	$1.05 \pm 0.10 \times 10^7$ b
ไม่ฆ่าเชื้อ	$1.53 \pm 0.11 \times 10^8$ c
F-test	*
CV (%)	19.59

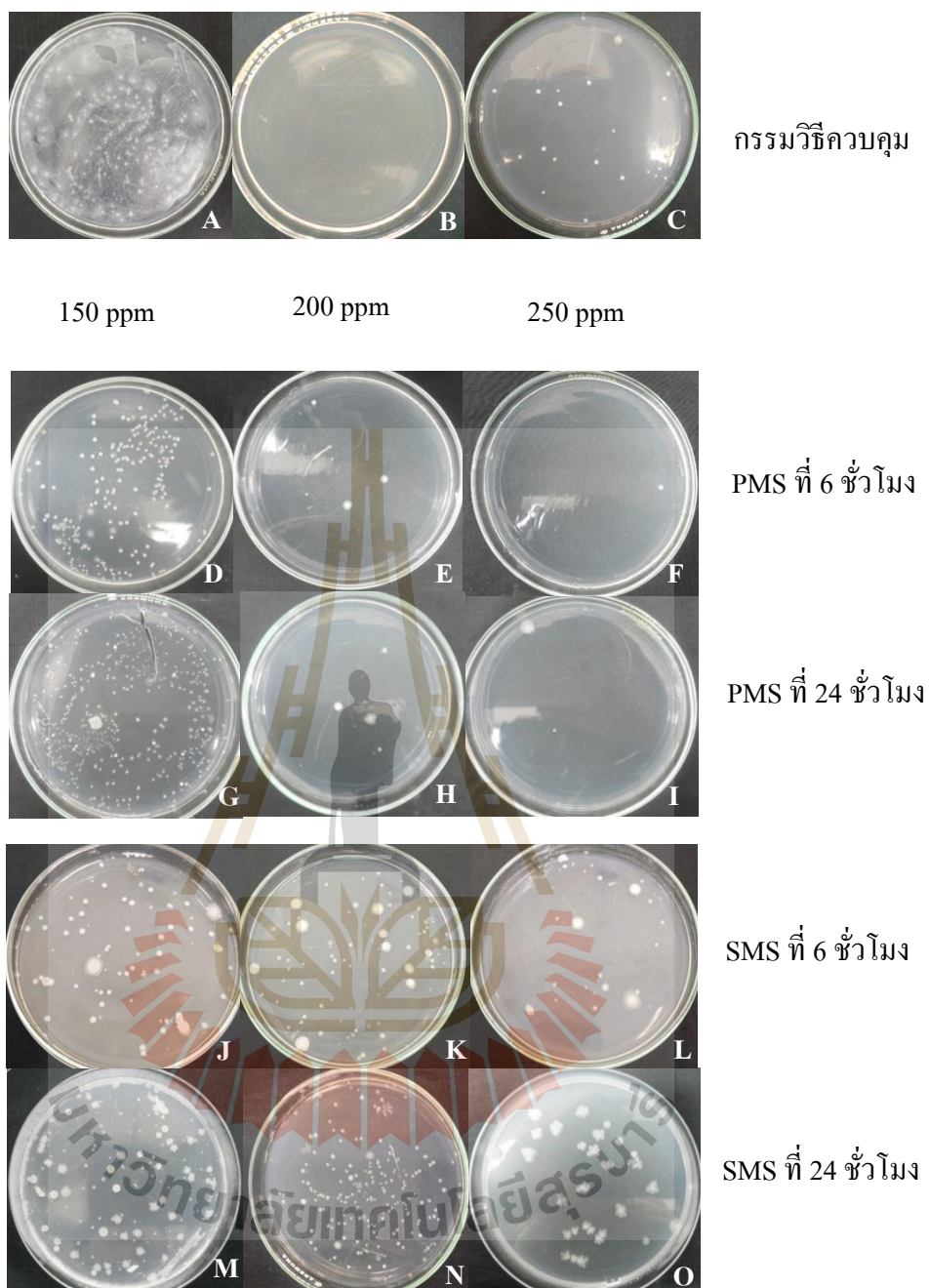
^{1/} การประเมินการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ จำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อน (cfu.ml⁻¹) = โคโลนีปนเปื้อนบนจานอาหาร × ระดับความเจือจาง
ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

^{2/} PMS คือ สาร โปดัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์

SMS คือ สาร โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์

Autoclave ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที

ต้มจนเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

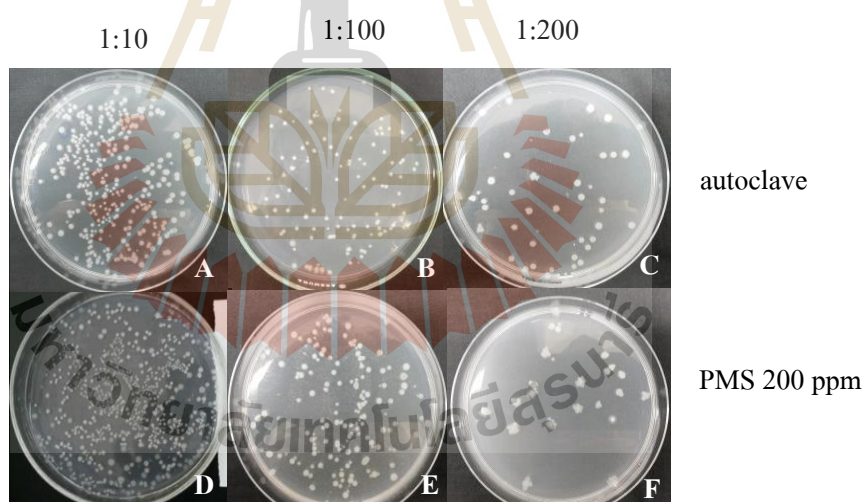


ภาพที่ 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยาย A) กรรมวิธีควบคุมโดยไม่ฆ่าเชื้อ (Control) B) นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส C) ต้มอาหารให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที D-F) PMS ความเข้มข้น 150 200 และ 250 ppm ตามลำดับ ฆ่าเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง G-I) PMS ความเข้มข้น 150 200 และ 250 ppm ตามลำดับ ฆ่าเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง J-L) SMS ความเข้มข้น 150 200 และ 250 ppm ตามลำดับ ฆ่าเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง M-O) SMS ความเข้มข้น 150 200 และ 250 ppm ตามลำดับ ฆ่าเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบปริมาณอัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (mortification media)

ปริมาณอัตราส่วนหัวเชื้อต่ออาหารสูตรขยาย	ปริมาณประชากรเชื้อ <i>B. subtilis</i> (cfu.ml ⁻¹) ^{1/}
Autoclave, 1:10	1.30±0.18×10 ⁸ b
Autoclave, 1:100	1.25±0.81×10 ⁶ c
Autoclave, 1:200	1.39±0.13×10 ⁵ c
PMS 250 ppm, 1:10	1.47±0.86×10 ⁸ a
PMS 250 ppm, 1:100	1.86±0.13×10 ⁶ c
PMS 250 ppm, 1:200	1.64±0.19×10 ⁶ c
F-test	**
CV (%)	5.5

^{1/} จำนวนแบคทีเรีย (cfu.ml⁻¹) = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ(ml)}}$



ภาพที่ 4.5 แสดงการทดสอบความเหมาะสมของอัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (multiplication media) A-C) กรรมวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้น 1:10, 1:100, 1:200 ตามลำดับ D-F) กรรมวิธีการเติม PMS ความเข้มข้น 200 ppm และเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้น 1:10, 1:100, 1:200 ตามลำดับ

4.2.3 การทดสอบการเพิ่มปริมาณของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ ที่ผ่านกระบวนการอบแห้งแบบ พ่นฝอยในระดับการทดลองขนาดกลาง

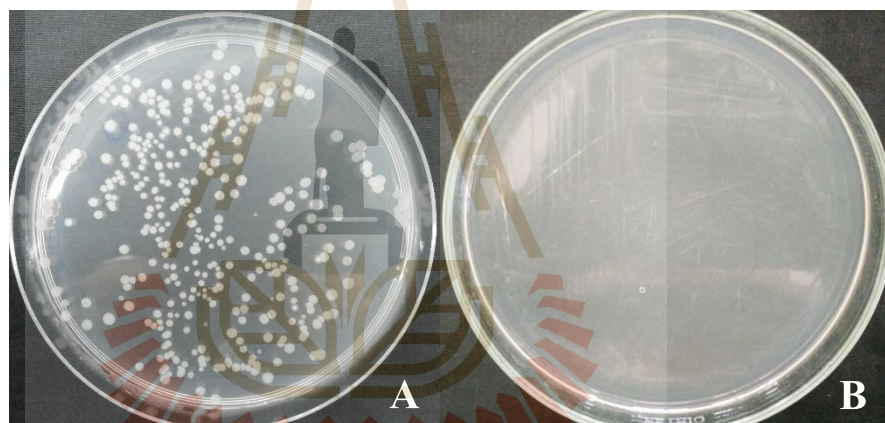
จากการนำสูตรอาหารและวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยายมา
เลี้ยงขยายในระดับการทดลองขนาดกลางขนาด 10 ลิตร เปรียบเทียบกับการมวิธีควบคุม เก็บผลการ
ทดลอง จากนั้นนับปริมาณของเชื้อด้วยวิธี dilution plate count โดยทำการเจือจางความเข้มข้น 8
ระดับ คือ 10^{-1} - 10^{-8} นำไปเพาะ (spread plate) ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร nutrient agar (NA) จำนวน
ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าทั้ง 2 กรรมวิธีมีการปนเปื้อนของ
เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ เป็นจำนวนมาก และจากปัญหาดังกล่าวจึงได้พัฒนาการทดลองโดยการนิ่งฆ่าเชื้อ
กากน้ำตาล 2 ครั้ง ก่อนนำมาเตรียมอาหารสูตรขยาย และเติมสาร โปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (PMS)
ความเข้มข้น 250 ppm หลังจากเตรียมสูตรขยาย ตั้งทิ้งไว้ 12-24 ชั่วโมง พบว่า การเพิ่มปริมาณเชื้อ
ของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ที่ผ่านกระบวนการอบแห้ง
แบบพ่นฝอย พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถฆ่าเชื้อในอาหารสูตรขยายได้ โดยสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อ
แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ที่ผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย มีเชื้อเจริญ
เท่ากับ 1.59×10^8 cfu.ml⁻¹ ดังแสดงลักษณะของวิธีการเลี้ยงเชื้อขยายในระดับการทดลองขนาดกลาง
ในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 การทดสอบสูตรอาหาร molasses diamonium phosphate and yeast extract (MDY) ใน
การเพิ่มปริมาณของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่อุณหภูมิห้องประมาณ
30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง A) อาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ B) อาหารที่ผ่าน
การฆ่าเชื้อด้วย PMS

4.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักสูตรเกษตรกรในการใช้เป็นอาหารสูตรขยาย

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำหมักสูตรเกษตรกรเพื่อใช้เป็นอาหารสูตรขยายโดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ในอาหารสูตรมาตรฐาน NGB โดยเลี้ยงขยายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีการเจริญของ *B. subtilis* หลังเก็บผลการทดลองที่ 5 วัน ดังแสดงในภาพที่ 4.7 (B) เนื่องจาก pH ในน้ำหมักของเกษตรกรมีความเป็นกรดสูง (pH 3.3) และเมื่อทำการปรับความเป็นกลาง (pH 6.0-7.0) ด้วยแคลเซียมออกไซด์ (ปูนขาว) อัตราส่วน 1.9 กรัมต่อน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร และบันทึกผลการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 เป็นเวลา 3 วันพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ไม่สามารถเจริญบนอาหารได้เช่นเดียวกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีมาตรฐานที่เลี้ยงในอาหาร NGB พบว่ามีเชื้อเจริญอยู่ที่ 2.24×10^6 cfu.ml⁻¹ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 (A)



ภาพที่ 4.7 ภาพแสดงประสิทธิภาพของน้ำหมักสูตรเกษตรกรในการใช้เป็นอาหารสูตรขยาย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 A) ในสูตรอาหาร NGB B) ในสูตรน้ำหมักของเกษตรกร

4.2.5 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัตราการใช้เชื้อขยายที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีในระยะกล้า

จากการทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อที่ได้จากการขยายจำนวนด้วยอาหารสูตรฆ่าเชื้อด้วย KMS ความเข้มข้น 250 ppm เพื่อควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีในระยะกล้าโดยศึกษาปัจจัยในการทดลองจำนวน 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 1 คือ ความเหมาะสมของอัตราส่วนเชื้อขยาย : น้ำ จำนวน 5 กรรมวิธี ดังนี้ 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 และน้ำเปล่า (กรรมวิธีควบคุม) และปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการนำไปใช้ จำนวน 4 กรรมวิธี คือ 1) คลุกเมล็ด 2) แช่ราก 3) คลุกเมล็ดร่วมกับแช่ราก 4) ไม่คลุกเมล็ดและไม่แช่ราก (กรรมวิธีควบคุม) โดยมีกรรมวิธีที่ทดสอบทั้งหมด 15 กรรมวิธี พบว่ากรรมวิธีที่ 11 คลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด โดยมีคะแนนการเกิดโรคและการลดโรคเท่ากับ 1.26 ± 0.23 และ 65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 12 ที่มีการควบคุมโรคด้วยการคลุกเมล็ดร่วมกับแช่รากอัตราส่วน 1:100 โดยมีคะแนนการเกิดโรคและการลดโรค เท่ากับ 1.30 ± 0.21 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกรรมวิธีที่ 13 ที่มีการควบคุมโรคด้วยการคลุกเมล็ดร่วมกับแช่รากอัตราส่วน 1:150 โดยมีคะแนนการเกิดโรคและการลดโรค เท่ากับ 1.33 ± 0.21 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4.10



ตารางที่ 4.10 คะแนนการเกิดโรคและดัชนีการยับยั้งโรคน้ำละในผักกาดเขียวปลีควบคุมโรคด้วยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ด้วยวิธีและอัตราต่างกัน

กรรมวิธีการทดลอง	คะแนนการเกิดโรค ^{1/}	ดัชนีการยับยั้งโรค(เปอร์เซ็นต์) ^{3/}
คลุกเมล็ด 1:50	1.76±0.25bc ^{2/}	49.0
คลุกเมล็ด 1:100	1.93±0.20cd	44.0
คลุกเมล็ด 1:150	1.90±0.24cd	45.0
คลุกเมล็ด 1:200	2.06±0.20d	40.0
คลุกเมล็ด น้ำเปล่า	3.43±0.16e	0.0
แช่ราก 1:50	1.80±0.20c	46.0
แช่ราก 1:100	1.81±0.24b	46.0
แช่ราก 1:150	1.83±0.36c	45.0
แช่ราก 1:200	1.88±0.24b	44.0
แช่ราก น้ำเปล่า	3.33±0.16e	0.0
คลุกเมล็ด+แช่ราก 1:50	1.26±0.23a	65.0
คลุกเมล็ด+แช่ราก 1:100	1.30±0.21ab	64.0
คลุกเมล็ด+แช่ราก 1:150	1.33±0.21ab	62.0
คลุกเมล็ด+แช่ราก 1:200	1.64±0.27bc	53.0
คลุกเมล็ด+แช่ราก น้ำเปล่า	3.52±0.14e	0.0
F-test	**	
CV (%)	33.53	

^{1/}ระดับการประเมินการเกิดโรคโดยให้ระดับคะแนน 0-4 คือ 0 = ใบพืชไม่แสดงอาการ, 1= เกิดแผลน้อยกว่า 25% ของพื้นที่ใบ, 2 = เกิดแผล 25 – 50% ของพื้นที่ใบ, 3= เกิดแผล 50 – 75%ของพื้นที่ใบ, 4= เกิดแผลมากกว่า 75% ของพื้นที่ใบ.

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

^{3/} ดัชนีการยับยั้งโรค $\text{disease reduction} = \frac{\text{negative control} - \text{treatment}}{\text{negative control}} \times 100$

4.2.6 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรค

จากการทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคจนถึงระยะเวลาเก็บเกี่ยว โดยเลือกกรรมวิธีที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 4.2.5 พบว่า กรรมวิธีที่ 6 คือการคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับฉีดพ่น 3 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10, 20 และ 30 วัน สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด โดยมีคะแนนการเกิดโรคและการลดโรค เท่ากับ 0.79 ± 0.33 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 5 คือการคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับฉีดพ่น 2 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 และ 20 วัน โดยสามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี โดยมีคะแนนการเกิดโรคและการลดโรค เท่ากับ 1.70 ± 0.61 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีการเกิดโรคและการลดโรค เท่ากับ 3.96 ± 0.29 และ 0.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่ากรรมวิธีการควบคุมโรคด้วยสารเคมีในกรรมวิธีที่ 8 มีการเกิดโรคและการลดโรค เท่ากับ 1.76 ± 0.53 และ 69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแตกต่างจากกรรมวิธีที่คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการฉีดพ่นสูตรผสมยาฆ่า ซึ่งมีความเหมาะสมการเกิดโรคและการลดโรค เท่ากับ 3.96 ± 0.29 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.11



ตารางที่ 4.11 คะแนนการเกิดโรคและดัชนีการยับยั้งโรคน่าละในผักกาดเขียวปลีควบคุมโรคด้วยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ด้วยวิธีและอัตราต่างกัน

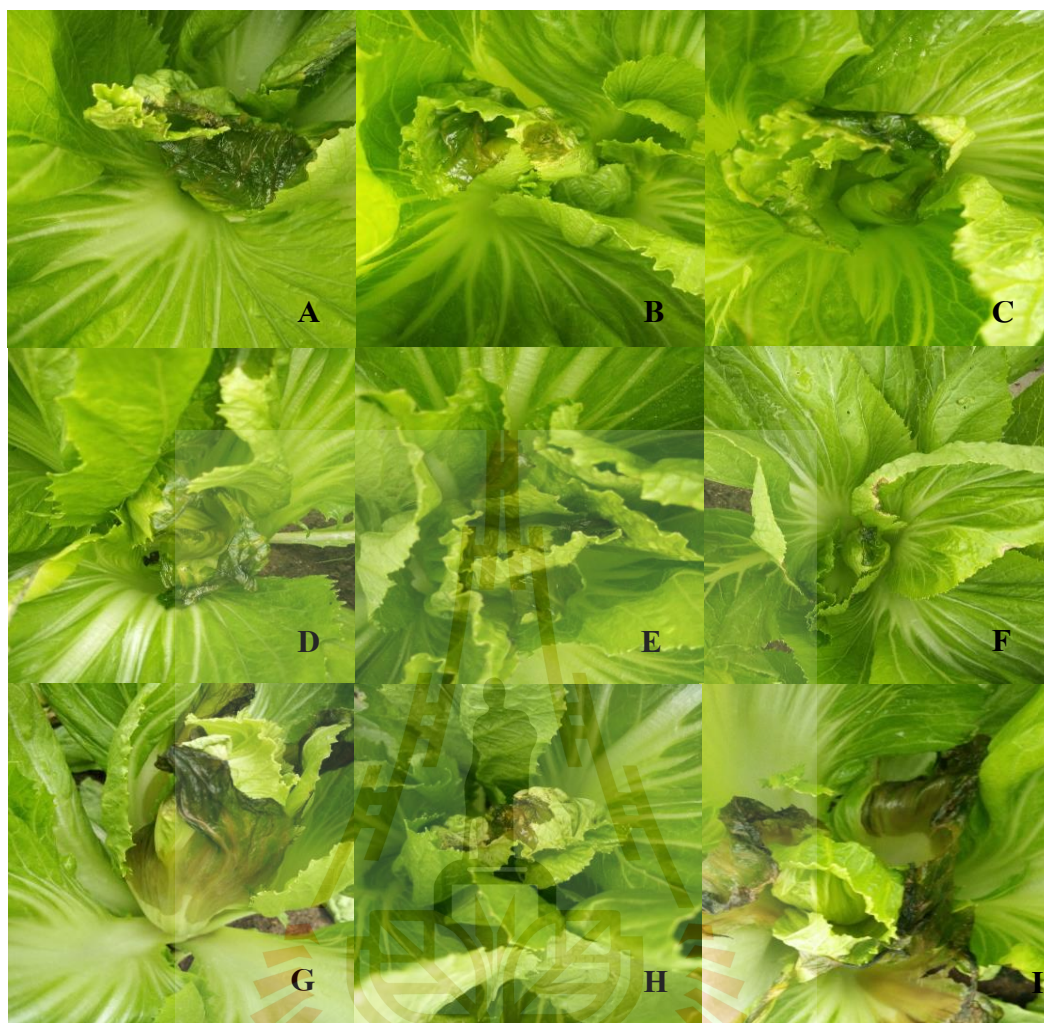
กรรมวิธีการทดลอง ^{3/}	การเกิดโรค ^{1/}	ดัชนีการยับยั้งโรค(เปอร์เซ็นต์) ^{4/}
กรรมวิธีที่ 1	3.10±0.41d ^{2/}	45.0
กรรมวิธีที่ 2	2.80±0.32cd	53.0
กรรมวิธีที่ 3	2.20±0.56c	61.0
กรรมวิธีที่ 4	2.40±0.47c	63.0
กรรมวิธีที่ 5	1.70±0.61b	70.0
กรรมวิธีที่ 6	0.79±0.33a	92.0
กรรมวิธีที่ 7	3.55±0.49e	27.0
กรรมวิธีที่ 8	1.76±0.53b	69.0
กรรมวิธีที่ 9	3.96±0.29f	0.0
F-test	**	
CV (%)	18.22	

^{1/}ระดับการประเมินการเกิดโรคโดยให้ระดับคะแนน 0-4 คือ 0 = ใบพืชไม่แสดงอาการ, 1= เกิดแผลน้อยกว่า 25% ของพื้นที่ใบ, 2 = เกิดแผล 25 - 50% ของพื้นที่ใบ, 3= เกิดแผล 50 - 75%ของพื้นที่ใบ, 4= เกิดแผลมากกว่า 75% ของพื้นที่ใบ.

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

^{3/}คือ กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นอัตราการใช้เชื้อขยายอัตราส่วน 1:50 1 ครั้ง กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นอัตราการใช้เชื้อขยายอัตราส่วน 1:50 2 ครั้ง กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นอัตราการใช้เชื้อขยายอัตราส่วน 1:50 3 ครั้ง กรรมวิธีที่ 4 การคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับฉีดพ่น 1 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 วัน กรรมวิธีที่ 5 การคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับฉีดพ่น 2 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 และ 20 วัน กรรมวิธีที่ 6 การคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับฉีดพ่น 3 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10, 20 และ 30 วัน กรรมวิธีที่ 7 คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสูตรผงลามีนาอัตราส่วน 8 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร กรรมวิธีที่ 8 คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการฉีดพ่นด้วย คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราส่วน 30 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร กรรมวิธีที่ 9 แช่เมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกด้วยน้ำเปล่าหนึ่งมาเชือ

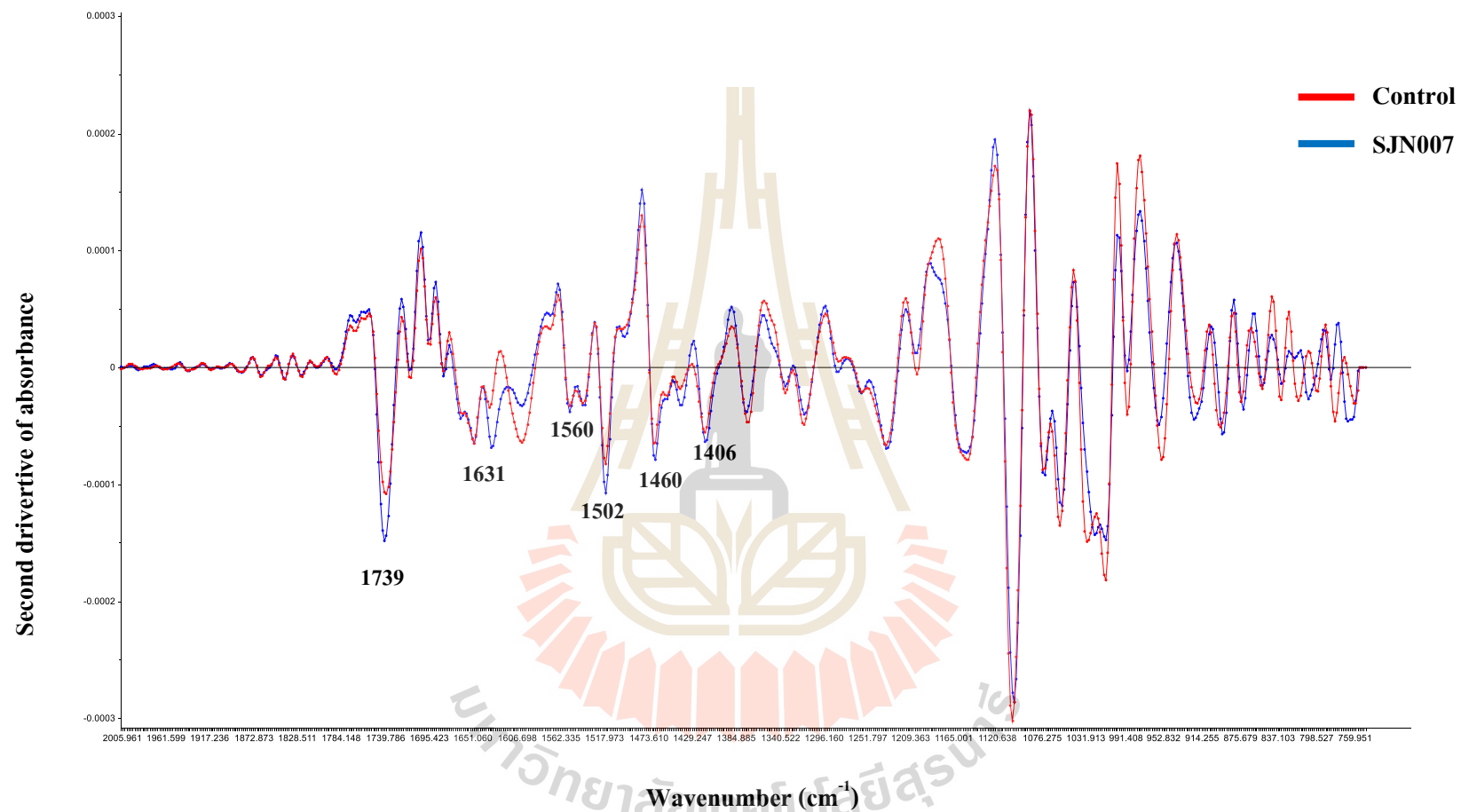
^{4/} ดัชนีการยับยั้งโรค disease reduction = $\frac{\text{negative control} - \text{treatment}}{\text{negative control}} \times 100$



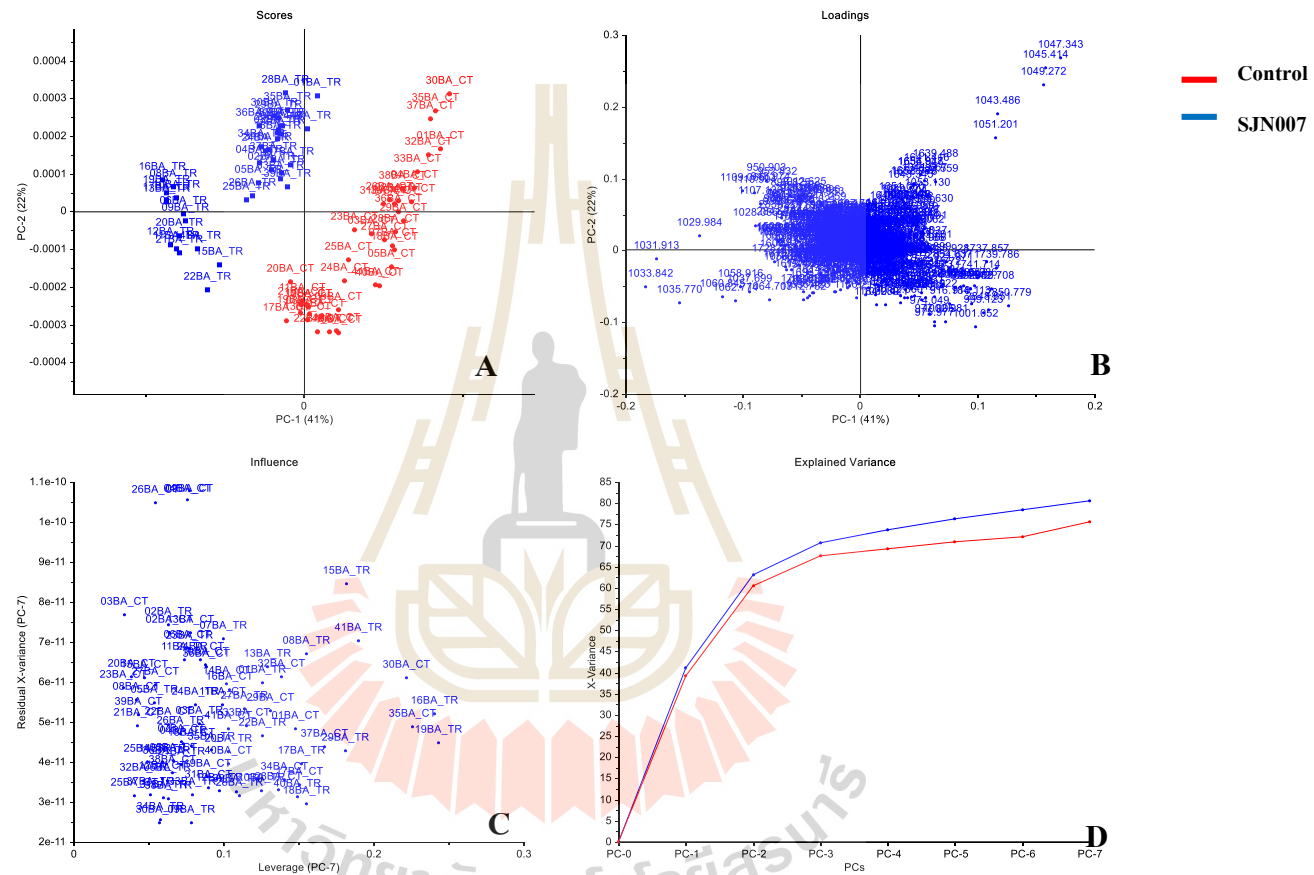
ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะอาการของโรคเน่าและหักกาดเขียวปลีหลังจากการทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคจนถึงระยะเก็บเกี่ยวและหลังปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC เป็นเวลา 7 วัน A) กรรมวิธีที่ 1 นิดพ่นเชื้อขยายอัตราส่วน 1:50 1 ครั้ง B) กรรมวิธีที่ 2 นิดพ่นเชื้อขยายอัตราส่วน 1:50 หลังย้ายปลูก 2 ครั้ง C) กรรมวิธีที่ 3 นิดพ่นเชื้อขยายอัตราส่วน 1:50 หลังย้ายปลูก 3 ครั้ง D) กรรมวิธีที่ 4 การคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับการนิดพ่น 1 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 วัน E) กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับการนิดพ่น 2 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10 และ 20 วัน F) กรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยาย อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับการนิดพ่น 3 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10, 20 และ 30 วัน G) กรรมวิธีที่ 7 คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการนิดพ่นด้วยสูตรผงลามีน่า อัตราส่วน 8 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร H) กรรมวิธีที่ 8 คลุกเมล็ด แช่ราก ร่วมกับการนิดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราส่วน 30 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร I) กรรมวิธีที่ 9 แช่เมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกด้วยน้ำเปล่านิ่งมาเชื้อ

4.2.7 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางองค์ประกอบของเซลล์ผักกาดเขียวปลีด้วยเทคนิค FTIR microspectroscopy

จากการวิเคราะห์ข้อมูลองค์ประกอบของเซลล์ผักกาดเขียวปลีในการศึกษาความแตกต่างของผักกาดเขียวปลีที่กระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Control) โดยใช้เครื่อง FTIR microspectroscopy (Vertec70, Bruker optic) ในการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.0 (Bruker optic, German) ร่วมกับการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Principal component analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler X (CAMO, Norway) ผลการทำ Second derivative พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกันในช่วงความยาวคลื่น 1739 cm^{-1} (lipid, triglycerides) ในช่วงความยาวคลื่น 1631 cm^{-1} (β -sheet protein) ในช่วงความยาวคลื่น 1642 cm^{-1} (amide I) ในช่วงความยาวคลื่น 1560 cm^{-1} (amide II) ในช่วงความยาวคลื่น 1502 cm^{-1} (amide II) ในช่วงความยาวคลื่น 1460 cm^{-1} (lipids) และในช่วงความยาวคลื่น 1406 cm^{-1} (amino acid, fatty acids) ซึ่งพบว่า กรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ *B. subtilis* มีปริมาณของไขมัน, amide I, amide II และ amino acid เพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อเทียบกับกรรมวิธีในการควบคุม ดังแสดงผลการทำ Second derivative ในภาพที่ 4.9 และภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.9 ผลการทำ Second derivative ของפקקาดเเขียวปลีที่ถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 (S.JN 007) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Control) ในช่วงความยาวคลื่น 2005-759 cm^{-1}



ภาพที่ 4.10 A,B,C และ D ผลการวิเคราะห์ *Principal component analysis* (PCA) เพื่อสร้างแบบจำลองฐานข้อมูลของผักกาดเขียวปลีที่ถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 (SJN 007) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Control)



บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาการพัฒนาสูตรและวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี โดยวิธีการผลิตในกระบวนการหมักเชิงอุตสาหกรรมโดยเริ่มจากการใช้กล้าเชื้อ (inoculum) ในรูปผงแห้งนำไปเพิ่มปริมาณในอาหารกล้าเชื้อ (starter medium) เพื่อกระตุ้นการเจริญและเพิ่มปริมาณ จากนั้นจึงใช้กล้าเชื้อที่ผลิตได้ไปเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นในอาหารสำหรับหมักหรืออาหารสูตรขยาย (fermenting or multiplication medium) ก่อนนำไปเจือจางเพื่อใช้ฉีดพ่นในสภาพเรือนทดลอง ซึ่งจะคล้ายกับขั้นตอนการผลิตปุ๋ยน้ำหมักที่เกษตรกรใช้อยู่ทั่วไป โดยจากการศึกษาสรุปผลได้ดังนี้

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์ชนิดผงแห้งของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* คือสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MDY โดยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.30 \pm 0.16 \times 10^9 \text{ cfu.ml}^{-1}$ สอดคล้องกับการศึกษาของเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตร แสง (2546) พบว่าการใช้กากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้หมักจะสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ TISTR 001 ได้ถึง 10^9 cfu.ml^{-1} เช่นเดียวกับงานวิจัยของ อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) พบว่า การเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ B31 ในอาหารที่ประกอบไปด้วยกากถั่วเหลืองและกากน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบหลักสามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ $1.2 \times 10^{10} \text{ cfu.ml}^{-1}$ ทั้งนี้การใช้เอนโดสปอร์ (endospore) ของเชื้อแบคทีเรียแทนการใช้เซลล์ (vegetative cell) จะสามารถทนต่อความร้อนได้สูง เนื่องจากเชื้อ *Bacillus* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (endospore forming) 1 เซลล์ต่อ 1 สปอร์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาต่อเชื้อจุลินทรีย์ทนทานต่อสารเคมี รังสี และความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ปกติ ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปของเอนโดสปอร์จะมีการทนความร้อนได้สูงกว่าในรูปเซลล์ (Klopper et al., 2004) เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารนี้มาผลิตสารชีวภัณฑ์จึงทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า ทั้งนี้การเลือกใช้สูตรอาหารในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควรคำนึงถึงความเหมาะสมของสารผสม ควรเลือกใช้สารที่ไม่ทำลายเซลล์แบคทีเรียสารที่มีประโยชน์ และสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานโดยที่ยังมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคและมีปริมาณเซลล์คงเหลือมากพอ

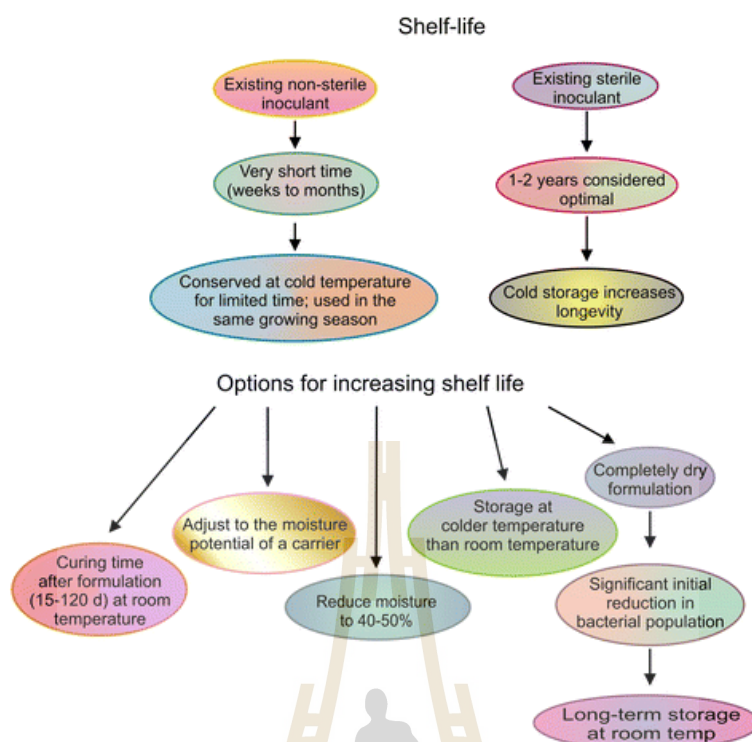
2. อุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการฟุ้งคือ อุณหภูมิขาเข้า (inlet) ที่ 140 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขาออก (outlet) ที่ 75 องศาเซลเซียส มีจำนวนประชากรเชื้อรอดชีวิตเท่ากับ $1.40 \pm 0.14 \times 10^8 \text{ cfu.g}^{-1}$ สอดคล้องกับรายงานของ Kim and Bhowmik (1990) พบว่าอัตราการรอดชีวิต

ของ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* จะลดลงเมื่ออุณหภูมิลมออก (outlet air temperature) เพิ่มขึ้น โดยจะส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมากกว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าอุณหภูมิลมเข้า (inlet air temperature) และค่า atomizing air pressure นอกจากนี้ Gardiner et al. (2000) ได้ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยกับจุลินทรีย์ *L. paracasei* สายพันธุ์ NFBC 338 ที่อุณหภูมิลมเข้า 170 องศาเซลเซียส และแปรรูณหภูมิลมออกตั้งแต่ 70-120 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิลมออก 80-85 องศาเซลเซียส ทำให้ *L. paracasei* สายพันธุ์ NFBC 338 รอดชีวิตมากที่สุด ทั้งนี้ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีความสำคัญอย่างมากต่อการต้านทานความร้อนของเซลล์หรือสปอร์ ตามปกติแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเซลล์หรือสปอร์ให้เจริญจะทำให้เซลล์ หรือสปอร์นั้น มีความต้านทานต่อความร้อนได้ดี ส่วนประกอบของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมถึงปริมาณของสารอาหารดังกล่าวเป็นสำคัญ ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปัจจัยที่เป็นต่อการเจริญของเชื้อเพียงพอก็ทำให้เกิดเซลล์หรือสปอร์ที่ต้านทานความร้อนได้ดี ในกรณีที่มีน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีในปริมาณที่ต่ำอาจช่วยเพิ่มความต้านทานต่อความร้อน แต่ในทางตรงข้ามถ้ามีในปริมาณที่สูง น้ำตาลกลูโคสอาจเปลี่ยนไป เป็นกรดซึ่งจะกลับไปลดความต้านทานต่อความร้อนลงมา นอกจากนี้แล้วเกลือก็ยังมีผลต่อความต้านทานความร้อน และการผลิตสูตรชีวภัณฑ์โดยใช้สารพาคือ ทลคัม และแป้งมันสำปะหลังที่เชื้อแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งที่อยู่และช่วยให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดและช่วยเพิ่มความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความร้อนได้ดี (วราภรณ์ ภูักกิตพันธ์, 2553) อีกทั้งมีรายงานว่าเชื้อในกลุ่ม *B. subtilis* สามารถใช้อาหารจากสารสกัดมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลดีต่อการเจริญเติบโตได้ดี (Sandra and Greg et al., 2000) ประกอบกับมีสาร CMC ที่เป็นสารเสริมประสิทธิภาพในการช่วยปกป้องเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติให้มีมีความแข็งแรงทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี ซึ่งแตกต่างจากการใช้เชื้อเซลล์สดที่เมื่อนำมาปรับใช้ในสภาพเรือนทดลองที่มีสภาพแวดล้อมที่ผิดแปลกแตกต่างจากห้องปฏิบัติการทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิบัติจะต้องมีการปรับตัวซึ่งจะทำให้เชื้ออ่อนแอส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียนั้นด้อยประสิทธิภาพไป สูตรสำเร็จจะมีส่วนผสมของสารอาหารสารพาคือเชื้อ แบคทีเรียสามารถรักษาความมีชีวิตและประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อ หรือสารซึ่งสูตรสำเร็จจะต้องสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและมีสภาพการผลิตที่เหมาะสมในสภาพอุณหภูมิห้องและมีราคาต้นทุนต่ำ พร้อมทั้งมีการเติมสารพา และสารเสริมประสิทธิภาพที่ได้จากธรรมชาติ เช่น ทลคัม แป้งมันสำปะหลัง ผงดินเหนียว ผงโดโลไมต์ แคลเซียมคาร์บอเนต และไอรอนซัลเฟต ซึ่งมีรายงานในสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ *P. fluorescens* สายพันธุ์ SP007s ให้แสดงศักยภาพที่มีประโยชน์ต่อพืชออกมาเต็มที่ และควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังช่วยให้ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีประสิทธิภาพสม่ำเสมอคงที่ของปริมาณกล้าเชื้อคุณภาพ (Preecha, 2009) โดยการทดลองของ Van Dyke และคณะ (2000) พบว่าสารพา insch sandy loam soil ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 2.13 เปอร์เซ็นต์ และ

แหล่งในโตรเจน 0.19 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบเมื่อผสมกับเชื้อ *P. fluorescens* สายพันธุ์ MON787 ปริมาณเชื้อหลังการทำแห้ง 1×10^9 cfu.ml⁻¹ เมื่อนำไปเก็บในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เชื้อมีปริมาณลดลง 2 log phase และลดลง 4 log phase เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1-2 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Vidhyasekaran (1995) พบว่าในการผลิตสูตรสำเร็จจากเชื้อ *P. fluorescens* โดยใช้ทาลคัมเป็นสารพาสมกับการบอซิเมทิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 เมื่อเก็บสูตรสำเร็จที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 240 วัน ปริมาณเชื้อลดลงจากเริ่มต้น 3.75×10^8 เป็น 1.3×10^8 cfu.ml⁻¹ โดยที่วิธีวิธีการผลิตกล้าเชื้อผงสามารถใช้เทคนิคในการผลิตได้ 2 แบบ ได้แก่ การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) และการทำแห้งโดยการระเหิดแห้ง (freeze dryer) ทั้งสองวิธีการนี้สามารถผลิตกล้าเชื้อผงได้เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกัน ซึ่งพบว่าการทำแห้งโดยการระเหิดแห้ง มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อสูงกว่าการอบแห้งแบบพ่นฝอย (ปิยะวรรณ กาสลัก, 2558)

เมื่อนำมาประเมินอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์หลังผ่านการอบแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าเมื่อผ่านไป 6 เดือน เชื้อยังคงความรอดชีวิต เท่ากับ $1.19 \pm 0.75 \times 10^6$ cfu.g⁻¹ ทั้งนี้การเก็บรักษาจุลินทรีย์หากอยู่ในสถานะและอุณหภูมิที่เหมาะสมจะสามารถคงความรอดชีวิตของจุลินทรีย์ได้สูง ซึ่งผลการทดลองของ ช่อทิพย์ ถนอมถื่น (2538) ที่ศึกษาการผลิตส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ในรูปผง พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ NK-TO3 และสายพันธุ์ CH6 สามารถปรับตัวได้ดีในส่วนผสมผงเชื้อที่โคอะตอมไมท์เป็นสารพาสมเชื้อ *P. fluorescent s* สายพันธุ์ F2 ปรับตัวได้ดีที่สุดในส่วนผสมผงเชื้อที่ใช้ทาลคัมเป็นสารพาและพบว่าเมื่อผสมรำข้าวเข้าไปจะช่วยส่งเสริมให้มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์เพิ่มขึ้นสูงสุดโดยอัตราส่วนในการผสมคือ เชื้อ:รำข้าว:สารพา เท่ากับ 1:2:2 (โดยน้ำหนัก) และสอดคล้องกับประจวบ บุตรศาสตร์ และคณะ (2548) ศึกษาประสิทธิภาพของสารตัวพาในส่วนผสมของผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ตัวพาในแบคทีเรียปฏิชีวนะ 4 สายพันธุ์คือ *P. fluorescens* สายพันธุ์ NA 1 และ SU1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 และ CH6 และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็น ซึ่งพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องจำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากการเก็บผงเชื้อเป็นเวลา 1 ปี สารตัวพาที่มีลำดับการมีชีวิตรอดทั้งในสภาพการเก็บในอุณหภูมิห้องและในตู้เย็นสูงสุดคือ สารตัวพาทาลคัม รองลงมาได้แก่ สารตัวพาโคอะตอม นอกจากนี้งานวิจัยของวราภรณ์ ภูักัดดีพันธ์ (2553) รายงานว่าจาก 1 ใน 9 สูตร คือ สายพันธุ์ XA6 ที่ผสมในส่วนประกอบ ทาลคัม, แคลเซียม, สาร CMC และน้ำสกัดมันฝรั่ง อัตรา 60, 30, 8, และ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการคงปริมาณเซลล์เชื้อที่มีชีวิตได้ดีที่สุด 1.63×10^{10} cfu.ml⁻¹ หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นาน 6 เดือน ในขณะที่อีก 8 สูตรที่เหลือมีปริมาณเซลล์เชื้อลดลง 69-78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองการศึกษาความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ในสูตรสำเร็จชนิดต่าง ๆ

ซึ่งปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏย์เริ่มต้นคือ 2.8×10^7 cfu.ml⁻¹ หลังจากเก็บรักษามาเป็นเวลา 6 เดือน มีปริมาณเชื้ออยู่ที่ 1.58×10^7 cfu.ml⁻¹ ต่อมาในปี 1999 ได้มีรายงานเพิ่มเติมว่าการเก็บรักษาสูตรสำเร็จชนิดนี้ในถุงพลาสติกปิดสนิทเชื้อสามารถรอดชีวิตได้ดีมากกว่า 30 วัน มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ จากเชื้อเริ่มต้น 9×10^8 cfu.ml⁻¹ Alan (1988) กล่าวว่า การเก็บรักษาผงเชื้อ นอกจากอุณหภูมิเป็นสิ่งสำคัญแล้วภาชนะบรรจุที่เหมาะสมก็เป็นสิ่งสำคัญเช่นกัน การเก็บรักษาสูตรสำเร็จที่อยู่ในรูปผงแห้งการผลิตสูตรสำเร็จในรูปสูตรแห้งนิยมใช้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ และจะต้องการมีเติมสารป้องกันเซลล์เพื่อปกป้องเซลล์จากความร้อนในระหว่างกระบวนการทำแห้ง เช่น หางนม และเจลาติน เป็นต้น ซึ่งสารที่เติมลงไปบางชนิดช่วยเพิ่มความสามารถของเซลล์ และช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา Cavalho et al., (2004) มีรายงานว่า การอยู่รอดของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์และสารป้องกันเซลล์ โดยพบว่าการใช้น้ำตาล mannose เคลือบเซลล์ *L. buigarigus* ในการทำแห้งทำให้เชื้อชนิดนี้รอดมากกว่า fructose, lactose หรือ glucose เช่นเดียวกับการรายงานของ Streeter et al., (2002) ที่พบว่าการใช้ trehalose ทำให้ *Bradyrhizobium japonicum* อยู่รอดได้มากขึ้นเมื่อทำให้เป็นเชื้อแห้ง แต่สำหรับ Abadias et al., (2001) พบว่าการใช้ส่วนผสมของ skimmed milk กับ carbohydrate sugars ทำให้เชื้อ *Candida sake* รอดชีวิต 45-85 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Desmond et al., (2002) ที่พบว่า *L. paracasei* มีชีวิตรอดเพิ่มขึ้น 1000 เท่า เมื่อใช้ Gum acacia 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมลงใน skimmed milk เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ Hamsupo (2005) รายงานว่า เมื่อใช้ skim milk 18 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ monosodium glutamate 2 เปอร์เซ็นต์ เป็น spray drying carrier ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่า เชื้อ *L. reuteri* KUB-AC5 มีอัตราการรอดชีวิต 87.24 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Champagne และคณะ (1991) ใช้สารปกป้องเซลล์ประเภทโพลีแซคคาไรด์ คือ โพลีเอทธีลิน ไกลคอล มาเติมในการปกป้องเซลล์ของ *Streptococci thermophilus* โดยใช้ร่วมกับนมผงที่ปราศจากไขมัน พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *Streptococci* ได้ 10-20 เปอร์เซ็นต์ Gardiner และคณะ (2000) รายงานการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมเข้า 170 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิลมออกที่ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้นมผงปราศจากไขมันเป็นสารปกป้องเซลล์ พบว่า จุลินทรีย์ *L. paracasei* NFBC 338 และจุลินทรีย์ *L. salivarius* UCC 118 รอดชีวิต 97 และ 11 เปอร์เซ็นต์ การที่นมผงปราศจากไขมันสามารถป้องกัน Cytoplasmic membrane ให้มีสภาพคงเดิมได้หลังผ่านการทำแห้ง ทั้งนี้การพัฒนาสูตรเพื่อให้เชื้อมีความรอดชีวิตสูตรต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 5.1



ภาพที่ 5.1 วิธีพัฒนาการชีวภัณฑ์และเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ที่มา : Bashan et al., 2014

การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์ที่มีการเพิ่มสารพาที่เป็นสารสำคัญ ลงในสูตรเพื่อช่วยป้องกันเซลล์จากการทำแห้งให้รอดชีวิตมากขึ้นและช่วยรักษาเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการเติมส่วนประกอบที่ช่วยให้ชีวภัณฑ์นั้น ๆ มีคุณสมบัติที่ดี ได้แก่ ตัวพา (carrier) หรือสารปรับปรุง (amendment) ซึ่งจะส่งเสริมชีวภัณฑ์ในด้าน เคมี ฟิสิกส์ หรือมีคุณสมบัติในการเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งจะช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษา การเกาะติดกับเป้าหมายและการคงประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ (ตารางที่ 5.1) (Chisler et al., 2004)ซึ่งได้มีงานทดลองของ Bashan et al., (2015) ที่มีการใช้ NaOH, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaCl, NH_4Cl , yeast extract, FeCl_3 , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , H_3BO_3 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในการเตรียมเป็นสูตรอาหารของการพัฒนาสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อ *Azospirillum* spp. เช่นเดียวกับในการทดลองของ Ya'nez et al., (2011) ที่มีการใช้ skimmed milk, skimmed milk plus, MgSO_4 , MgSO_4 and 20 MgSO_4 ในอัตราส่วน 10, 10, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในการใช้เป็นสารพาในการทำแห้งของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CPA-8 ซึ่งพบว่าเชื้อ มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ $1.6 \pm 3.3 \times 10^9 \text{ cfu.g}^{-1}$

ตารางที่ 5.1 ประเภทของสารชีวภัณฑ์และสารที่ใช้ผสมในชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัทธ์ *Bacillus* spp.

ประเภทของชีวภัณฑ์	สารผสมในชีวภัณฑ์
Liquid carriers	Vegetable oils
Mineral carriers	Kaolinite clay, diatomaceous earth
Organic carriers	Grain flour
Stabilizers	Lactose, sodium benzoate
Nutrients	Molasses, peptone
Binders	Gum Arabic, carboxymethyl cellulose
Desiccants	Silica gel, anhydrous salts
Thickeners	Xanthan gum
Surfactants	Tween 80
Dispersants	Microcrystalline cellulose

ที่มา: Schisler และคณะ (2004); กุศล ถมมา (2555)

3. จากการทดสอบประสิทธิภาพสูตรอาหาร อัตราส่วน และวิธีการเขย่าที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อผลการทดลองพบว่า สูตรที่ 2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ MDY ที่มีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจน 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการเพิ่มขึ้นของกล้าเชื้อเท่ากับ 1.0×10^8 cfu.ml⁻¹ (O.D=0.207) และอัตราส่วนของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมคือ 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร โดยมีการเพิ่มขึ้นของกล้าเชื้อเท่ากับ 1.7×10^8 cfu.ml⁻¹ (O.D=0.215) และผลของกรรมวิธีการเขย่าที่เหมาะสมในการเพิ่มออกซิเจนพบว่ากรรมวิธีตั้งทิ้งไว้และเขย่าทุก 6 ชั่วโมง ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของกล้าเชื้อเท่ากับ 8.2×10^7 cfu.ml⁻¹ (O.D=0.208) ทั้งนี้การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมและมีราคาถูกเพื่อทดแทนการใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถแนะนำให้เกษตรกรนำไปใช้ได้ การนำ diammonium phosphate (DAP) มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจาก DAP ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีผลในการเจริญเพิ่มปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ และกากน้ำตาลถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่หาซื้อได้ง่าย ราคาถูก และสามารถนำมาทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในห้องปฏิบัติการได้ แต่ในการผลิตระดับขนาดใหญ่อาจจะเกิดปัญหาเรื่องฟองมาก ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากน้ำตาลเป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึกในการผลิตน้ำตาลทราย (กัญญรัตน์ นิมะวงษ์, 2553) ปัจจุบันมีการใช้กากน้ำตาล ในการเป็นสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหาร และสัตว์เป็นจำนวนมาก โดยงานทดลองของไวโรจน์ เดชมหิตกุล และคณะ (2550) พบว่าการศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *B. subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์ในสูตรอาหารสองแบบในขวดเขย่า คือ แบบที่มีกากน้ำตาลเป็นหลักและ

แบบที่มีกากั่วเหลือง เป็นหลัก ผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นหลักสูตรที่เหมาะสมคือ กากน้ำตาล 19.85 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ อภิเชษฐ์ หมั่นอร่าม (2554) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR 1338 โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เป็นกากน้ำตาลและกากเซลล์ยีสต์ ทดแทนการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า สูตรอาหารดังกล่าวที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และกากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนไปประยุกต์ใช้เพื่อ เป็นแนวทางในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในระดับอุตสาหกรรม โดยสอดคล้องกับงานทดลองของ พันทิพา พงษ์เพียจันทร์ (2539) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ B31 สามารถใช้อาหาร SM ที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้กากั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ B31 สามารถใช้ซูโครสที่มีอยู่ปริมาณมากในกากน้ำตาลได้ดี และในตัวกากน้ำตาลก็มีกรดอะมิโนและวิตามินแร่ธาตุที่ทนความร้อนได้ดี เช่น riboflavin, pantothenic acid และ biotin อีกทั้งมีรายงานว่าการพัฒนาสูตรอาหารให้มีราคาถูกโดยใช้ กากน้ำตาล และ fish hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร MRS ตามลำดับ โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองจากการทดลองแบบ central composite design (CCD) เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าสามารถลดต้นทุนการหมักได้ประมาณร้อยละ 72 จากสูตรอาหาร MRS เดิม (กฤษณะ ลัมไพบุลย์, 2554) และในปี 2551 ประมุข กระจุกสุขสถิตย์ และคณะ ได้ทำการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* สายพันธุ์ PD110 ซึ่งแยกได้จากกระบวนการหมักขนมจีนโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาลและแหล่งไนโตรเจนที่เป็น น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน ทดแทนการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นสูตรอาหารดังกล่าวที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำลวกข้าวโพดอ่อนเป็นแหล่งไนโตรเจนไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในขนมจีนแปรรูปหมักในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้ นอกจากนี้ สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง (2544) รายงานว่า การเพาะเลี้ยง *Pediococcus acidilactici* M6 ด้วยอาหารเหลวซึ่งมีกากน้ำตาล 7 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำแช่ข้าวโพด 9 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนควบคุมอุณหภูมิ และอัตราการกวน เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และ 50 รอบต่อนาทีตามลำดับ ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.70×10^9 cfu.ml⁻¹ กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับ อุตสาหกรรมเพราะมีแหล่งพลังงานในรูปของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิซซ์ ประมาณ 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ ของของแข็งที่ละลายทั้งหมด มีปริมาณ ไนโตรเจนประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ของของแข็งที่ละลายทั้งหมด และวิตามินอยู่เล็กน้อย (Stoppok และ Buchholz, 1993) ในรายงานของดวงรัตน์ สาริภาวษ์ (2544) ได้ศึกษาการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อผลิตชีวมวลเซลล์ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* BT520 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ น้ำมะพร้าวและ

กากน้ำตาล (molasses) พบว่ากากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพ จึงได้พัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีการพัฒนา ซึ่งประกอบด้วย ami-ami solution, brewers yeast autolysate และ molasses 20 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์ (1.7×10^{10} cfu.ml⁻¹) จึงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีศักยภาพสูงต่อการส่งเสริมการ เจริญเติบโตของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* BT520 ทั้งนี้เกษตรกรในประเทศไทยได้มีการใช้กากน้ำตาลในการผลิตปุ๋ยน้ำหมักชีวภาพ (EM) แต่กากน้ำตาลที่ใช้นั้นไม่มีการฆ่าเชื้อและมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นเป็นจำนวนมาก ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตมีความหลากหลาย และไม่แสดงศักยภาพเต็มที่ ทำให้ไม่สามารถไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชได้ ซึ่งในต่างประเทศยังไม่ค่อยมีการรายงานในการใช้กากน้ำตาลมากนักส่วนใหญ่นิยมใช้ DAP หรือน้ำตาลชนิดอื่น ซึ่งหาได้ง่าย และเนื่องจากกากน้ำตาลอาจยังไม่ค่อยสะอาดหรือไม่ทราบสัดส่วนที่แน่นอน ทั้งนี้การใช้กากน้ำตาลและ DAP ในการเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอาจยังไม่เพียงพอ ซึ่งอาจมีการเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพชนิดอื่น ซึ่งในปี 1998 Yokochi et al., พบว่าจุลินทรีย์ *Schizochytrium* sp. สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด และพบว่า monosaccharides โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพสำหรับ *S. limacinum* SR21 และจากรายงานของโชคชัย วณภู (2556) พบว่าเมื่อพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการผลิตกล้าเชื้อ PGPR ชนิดเหลวเพื่อให้มีราคาถูกโดยใช้ molasses 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมบัพเฟอร์เพื่อควบคุมค่ากรด-ด่างที่เหมาะสม พบว่าเชื้อ *Azotobacter* sp. สามารถเจริญและมีชีวิตรอดได้มากกว่า 10^8 cfu.ml⁻¹ เป็นระยะเวลา 5 เดือน ในอาหารที่ใช้ molasses , PEG, แป้งมัน และ phosphate buffer อัตราส่วน 2, 0.5 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *Azospirillum* sp. สามารถเจริญและมีชีวิตรอดได้มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลาถึง 8 เดือน ในอาหารที่ใช้ molasses, แป้งมัน และ phosphate buffer อัตราส่วน 2 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การทดลองของ Stephanie et al., (2014) ได้มีการใช้ กลูโคส, CaCO₃, MgSO₄ 7H₂O, MnSO₄ H₂O, FeSO₄ 7H₂O และ CaCl₂ 4H₂O อัตราส่วน 10, 0.1, 0.00011, 0.04, 0.028 และ 0.03 กรัม ตามลำดับ เพื่อเป็นสูตรอาหารในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักของเกษตรกรเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 พบว่าจากการทดสอบดังกล่าวไม่พบการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และเมื่อนำน้ำหมักที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาตรวจสอบจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำหมัก พบว่า น้ำหมักดังกล่าวไม่มีเชื้อจุลินทรีย์อื่นเจริญอยู่ ทั้งนี้อาจชี้ให้เห็นได้ว่าจากคุณสมบัติของน้ำหมักที่มีการรายงานในการเติมในดิน เพื่อช่วยปรับสภาพโครงสร้างของดิน ทำให้ดินร่วนซุย อุ้มน้ำได้ดี และช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ในดิน และน้ำ ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน และในน้ำ ใช้รดต้นพืชหรือแช่เมล็ดพันธุ์ ท่อนพันธุ์เพื่อเร่งการเกิดราก และการเจริญเติบโตของพืชเป็นสารที่ทำหน้าที่เหมือนฮอร์โมนพืช กระตุ้นการเกิดราก และการเจริญเติบโต ทำให้ผลผลิต และคุณภาพสูงขึ้น

ความเป็นกรดของน้ำหมักอาจไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำหมัก ซึ่งเมื่อนำไปใช้กับพืชก็จะมีผลในการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีงานวิจัยของ จุริยรัตน์ ลิสมิทธิ (2559) ได้ให้เหตุผลทางวิทยาศาสตร์ว่า น้ำหมักชีวภาพสามารถเร่งโต เพิ่มผลผลิตในพืชน้ำจะเกิดจากการผสมของวัตถุดิบทำให้เกิดจุลินทรีย์กลุ่มสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโต เช่น indol-3-acetic acid (IAA), จิบเบอเรลลิน, ออกซิน, และไซโตไคนิน ทั้งนี้จิบเบอเรลลินที่ซึมเข้าเมล็ด จะสามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีทำให้งอกเร็ว รากยาว ต้นใหญ่สมบูรณ์ ส่วนไซโตไคนิน จะช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ขยายขนาดเซลล์เมล็ด ทำให้งอกเร็วขึ้นอีก ส่วนการเพิ่มขึ้นของผลผลิตนั้นอาจมาจากการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายโมเลกุลสารอินทรีย์ให้เล็กลง จนมาอยู่ในรูปธาตุอาหารที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ เป็นการเพิ่มสารอาหารให้พืช การนำเอาพืช ผัก ผลไม้ต่าง ๆ มาหมักกับน้ำตาลทำให้เกิดจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จำนวนมาก ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ จะไปช่วยสลายธาตุอาหารต่าง ๆ ที่อยู่ในพืชมีคุณค่าในแง่ของธาตุอาหารพืชเมื่อถูกย่อยสลายโดยกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์สารต่าง ๆ จะถูกปลดปล่อยออกมา เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง จุลธาตุ ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต เอนไซม์ วิตามิน ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (พินชอ กรมรัตนพร, 2553) ทั้งนี้ระยะเวลาของการหมักน้ำหมักชีวภาพอาจมีผลในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หากระยะเวลาในการหมักนานมีผลในความเป็นกรดค่อนข้างสูงซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดสูงได้ คุณสมบัติดังกล่าวของน้ำหมักชีวภาพอาจมาจากผลของธาตุอาหาร หรือกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยสลายพืชผัก

4. การทดสอบวิธีการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยาย และเปรียบเทียบปริมาณอัตราส่วนระหว่างกล้าเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยาย (multiplication media) จากการศึกษาการทดสอบวิธีการทำให้ปลอดเชื้อของอาหารสูตรขยาย พบว่า วิธีการปลอดเชื้อที่เหมาะสมที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการมาตรฐาน โดยการนิ่งมาเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส คือ การเติมสารโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (PMS) ความเข้มข้น 250 ppm โดยมีเชื้อจุลินทรีย์อ่อนปนเปื้อนเท่ากับ $1.00 \pm 0.14 \times 10^1$ cfu.ml⁻¹ เมื่อเทียบกับวิธีฆ่าเชื้อมาตรฐาน และอัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อต่ออาหารสูตรขยาย โดยใช้กล้าเชื้ออัตราส่วน 0.5 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ MDY ปริมาณ 1 ลิตร โดยกรรมวิธีการเติมสารโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (PMS) ความเข้มข้น 250 ppm ที่อัตราส่วน 1:10 มีอัตราเชื้อเจริญเท่ากับ $1.47 \pm 0.86 \times 10^8$ cfu.ml⁻¹ ทั้งนี้การใช้สารเคมี PMS สำหรับฆ่าเชื้อและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารเพื่อลดค่าใช้จ่ายและกระบวนการในการฆ่าเชื้อ เพื่อสะดวกและง่ายต่อเกษตรกรที่สามารถนำไปปฏิบัติได้จริง ทดแทนการนิ่งมาเชื้อที่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ซึ่งอุตสาหกรรมการผลิตกล้าเชื้อยังไม่มีใครนำมาใช้เนื่องจากสารชนิดนี้ยังไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ดี ในขั้น sterilization หรือฆ่าเชื้อทุกตัวที่มีอยู่โดยหลังจากมีการเติมสารลงไปในการอาหารแล้วอาจยังมี

เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ปนเปื้อน ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วการใช้สารเคมี PMS นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการผลิตไวน์และการเติมในน้ำผลไม้ มากกว่าการใช้สาร SMS โดยคำแนะนำในการใช้ก็คือ ใช้สาร PMS 200 มิลลิกรัมร่วมกับกรดซิตริก 3 กรัม ละลายในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในการทำความสะอาด ทั้งนี้กรดจะเป็นตัวดึง pH ให้ต่ำลง (ประดิษฐ์ ครัววัฒนา และคณะ, 2525; ศรีอุบล ทองประดิษฐ์, 2546) ซึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์นิยมใช้สาร PMS เพื่อให้ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ โดยเฉพาะเชื้อน้ำส้มสายชูและเชื้อยีสต์ป่า (wild yeast) ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการหมักไวน์ โดย PMS เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในการผลิตไวน์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการก่อนการหมักไวน์ในปริมาณระหว่าง ร้อยละ 0.01–0.02 (ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน, 2554) นอกจากนี้ในการทดลองของ นพดล โพชกำเหนิด และคณะ (2556) ได้ทำการหยุดการหมักไวน์ด้วยการเติมโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (potassium metabisulphite, PMS) 0.08 กรัม/ลิตร ลงไปในถังหมักแต่ละถังเพื่อทำลายเชื้อยีสต์ในไวน์เพื่อไม่ให้เกิดการหมักต่อไปจากนั้นตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ซึ่งสอดคล้องกับภัทราภรณ์ ศรีสมรรถการ (2542) พบว่า การหมักไวน์หมักโดยใช้ผลหมักต่อน้ำในอัตราส่วน 1:3 ปรับน้ำหมักให้มือน้ำตาลปริมาณ 180 กรัมต่อกิโลกรัม กรดทั้งหมดร้อยละ 0.4-0.6 และเติมโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 50-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้บางรายงานได้มีการใช้ diethylpyrocarbonate (DPC) อัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ซึ่งสามารถใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในอาหารได้ (Macek et al., 1994) ระยะเวลาการเติม PMS มีผลในการฆ่าเชื้อซึ่งฤทธิ์หรือประสิทธิภาพจะมีผลดีเมื่อเติมลงไประหว่าง 6-12 ชั่วโมง (นพดล โพชกำเหนิด, 2556) PMS จะค่อยๆ ไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหาร ในขณะที่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังเติมสาร PMS พบว่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นมีการปนเปื้อนมากกว่าที่ 6 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์บางตัวเริ่มมีการเจริญภายหลัง 24 ชั่วโมง ที่มีการเติมสาร PMS ดังนั้นจึงต้องเติมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ภายในเวลา 6-12 ชั่วโมง เพื่อใช้ *B. subtilis* สามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่เลือกอัตราการใช้เชื้อขยายที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีในสภาพเรือนทดลอง พบว่า กรรมวิธีที่มีการคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยายแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับฉีดพ่น 3 ครั้ง อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อต้น หลังย้ายปลูก 10, 20 และ 30 วัน สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด โดยมีคะแนนการเกิดโรคและการลดโรค เท่ากับ 0.79 ± 0.33 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อซึ่งไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นด้วยสารเคมี (copper hydroxide) โดยกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีดังกล่าวสามารถลดความรุนแรงโรคเน่าและเท่ากับ 69

เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้สูตรพลาไมน่า ซึ่งมีคะแนนการเกิดโรคและการลดโรคเท่ากับ 3.96 ± 0.29 และ 27 เปอร์เซ็นต์ การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *B. subtilis* เป็นการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ดและเชื้อในดินบริเวณรอบเมล็ดได้ เนื่องจากเชื้อในกลุ่มดังกล่าวมีรายงานว่ามิกลไกในการสร้าง secondary metabolites ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ เช่น เชื้อ *B. firmus* สายพันธุ์ KPS44 และ KPS46 สามารถผลิตสาร secondary metabolites ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง (รัชฎาวรรณ เดชมณี และคณะ, 2548) การฉีดพ่นใบผักกาดเขียวปลีด้วยเชื้อ *B. subtilis* มีผลในการกระตุ้น และสามารถป้องกันโรคที่เกิดกับใบได้ และรายงานของวิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และคณะ ในปี 2549 ได้รายงานว่าเชื้อ *P. fluorescens* สายพันธุ์ SP007s และเชื้อ *B. licheniformis* สายพันธุ์ SP009s ว่าสามารถปลดปล่อยสาร secondary metabolite ในการยับยั้งได้ทั้งเชื้อราแบคทีเรีย คือ *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Pythium* sp., และ *Alternaria* sp. เป็นความถี่ที่เหมาะสมเนื่องมาจากเชื้อโรคแต่ละชนิดมีช่วงเวลาในการเข้าทำลายพืชได้แตกต่างกัน เช่น เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคขอบใบทองเข้าทำลายกะหล่ำดอกได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืชโดยผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติ หรือบาดแผล (Sally et al., 2002) และเชื้อ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดซึ่งจะเกิดกับใบแก่ที่อยู่ตอนล่างของลำต้นแสดงอาการทุกระยะการเจริญเติบโตเช่นกัน (ศศิธร วุฒิวิเศษ, 2545) และถ้าหากโรคอยู่ในระดับรุนแรงมากก็ต้องใช้ความถี่หรือความเข้มข้นให้มากขึ้น แต่ถ้าความรุนแรงของโรคน้อยก็สามารถลดความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏลงได้ตามความเหมาะสม จำนวนครั้งที่ทำการพ่นเชือนั้น หากมีการเพิ่มความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏให้มากขึ้น ในการพ่นควบคุมโรคอาจจะไม่ต้องพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏถึง 4 ครั้ง จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป และการใช้เชื้อปฏิบัฏร่วมกันนั้นเป็นการเพิ่มเติม/เสริมประสิทธิภาพในการควบคุมโรค ซึ่งการทำงานร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ 2 สายพันธุ์ ที่มีกลไกแตกต่างสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้มากกว่าการใช้สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเพียงลำพัง และยังสามารถควบคุมโรคพืชได้ครอบคลุมมากขึ้น เนื่องจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีกลไกการทำงาน การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งชนิดเชื้อสาเหตุโรคได้ต่างกัน (Crump, 1998) และนอกจากนี้ การใช้เชื้อแบคทีเรียร่วมกันอาจจะเพิ่มประสิทธิภาพ หรือมีกลไกการทำงานร่วมกันแบบใหม่ที่แตกต่างจากเดิม เสมอใจ ชื่นจิตต์ และคณะ (2548) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียผสม 3 ไอโซเลท พบว่า เชื้อผสม B1228 B1317 และ B1348 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* และเมื่อนำกลุ่มแบคทีเรียทดสอบการควบคุมโรคกับหน่อวุ้นในเรือนทดลอง พบว่า การใช้เชื้อผสมสามารถลดการเกิดโรคได้ 81-89 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. pabuli* SW01/4 ลดความรุนแรงของโรคเน่าและ โรคขอบใบทอง และโรคใบจุด *Alternaria* sp. ของพืชตระกูลกะหล่ำ 43.0, 52.0 และ 45.0 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มน้ำหนักสด ความสูงต้น และความยาวใบเฉลี่ย

91.0, 45.5 และ 39.8 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตรวมเพิ่มขึ้น 30.8 เปอร์เซ็นต์ (Prathuangwong et al., 2004, Prathuangwong et al., 2006a; Prathuangwong et al., 2006b) นอกจากนี้ การทดลองของ วิลาวรรณ เชื้อบุญ (2551) พบว่า การใช้เชื้อแบบผสมระหว่างการคลุกเมล็ด SP009s ที่ความเข้มข้น 1.22×10^6 cfu.ml⁻¹ (O.D.=0.15) และพ่นใบ 4 ครั้ง ด้วยสายพันธุ์ SP007s เข้มข้น 2.3×10^6 cfu.ml⁻¹ (O.D.=0.1) เมื่อพืชอายุ 14, 28, 42 และ 56 วัน หลังปลูกซึ่งส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตได้ผลผลิตที่มีคุณภาพเพิ่มขึ้น 68.4 เปอร์เซ็นต์ และลดความรุนแรงโรคได้ 80.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากแปลงปลูกที่ไม่ใช้เชื้อปฏิปักษ์ เช่นเดียวกับการทดลองของ ชานนทร์ แสงจันทร์ (2557)) พบว่า การคลุกเมล็ดเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับฉีดพ่นกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีความกว้างทรงพุ่ม ความสูงทรงพุ่ม และปริมาณของหัวผักกาดเขียวปลีสูงที่สุด นอกจากนี้ กฤติเดช อนันต์และคณะ (2559) ได้มีการใช้ *B. subtilis* TU-Orga1 ในรูปแบบสูตรผงและสูตรน้ำ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทอง และใบจุดอัลเทอร์นาเรีย พบว่า TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *X. campestris* pv. *campestris* และ *Alternaria* sp. โดยแสดงบริเวณยับยั้ง 5.0-5.1 มิลลิเมตร และ 80.0-83.3 เปอร์เซ็นต์ Berger et al. (1996) รายงานว่า การใช้เชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพืชสกุลกุหลาบ และกะหล่ำ

6. จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของผักกาดเขียวปลีด้วยเทคนิค FT-IR microspectroscopy พบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกันในช่วงความยาวคลื่น 1642 cm⁻¹ (amide I) ในช่วงความยาวคลื่น 1739 cm⁻¹ (lipid, triglycerides) ในช่วงความยาวคลื่น 1560 cm⁻¹ (amide II) ในช่วงความยาวคลื่น 1502 cm⁻¹ (amide II) ในช่วงความยาวคลื่น 1460 cm⁻¹ (lipids) และในช่วงความยาวคลื่น 1406 cm⁻¹ (amino acid, fatty acids) เมื่อถูกพ่นด้วยสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ CaSUT007 ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าในเซลล์พืชมีไขมันเชิง ประกอบ (compound lipid) คือ ฟอสโฟไลปิด (phospholipid), ไกลโคไลปิด (glycolipid) และไลโปโปรตีน (lipoprotein) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่นเดียวกันกับโปรตีน (proteins) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของพืช เนื่องจากมีหน้าที่ในการควบคุมเมแทบอลิซึมเป็นโมเลกุลโครงสร้าง และกิจกรรมภายในเซลล์ รวมทั้งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หรือหน่วยย่อยของเอนไซม์ในเซลล์พืช ส่วนคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญ ต่อทั้งการทำงานและโครงสร้างของพืชโดยจะพบคาร์โบไฮเดรตในองค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปของเซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose), ไคติน (chitin), ลิกนิน (lignin) และเพกติน (pectin) (ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2545) โดยสารชีวโมเลกุลดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* สายพันธุ์ CaSUT007 ซึ่งให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช อาจมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและอาจไปกระตุ้น ให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ นอกจากนี้ พืชอาจมีการผลิตสารขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อโรคเนื่องจากเชื้อ

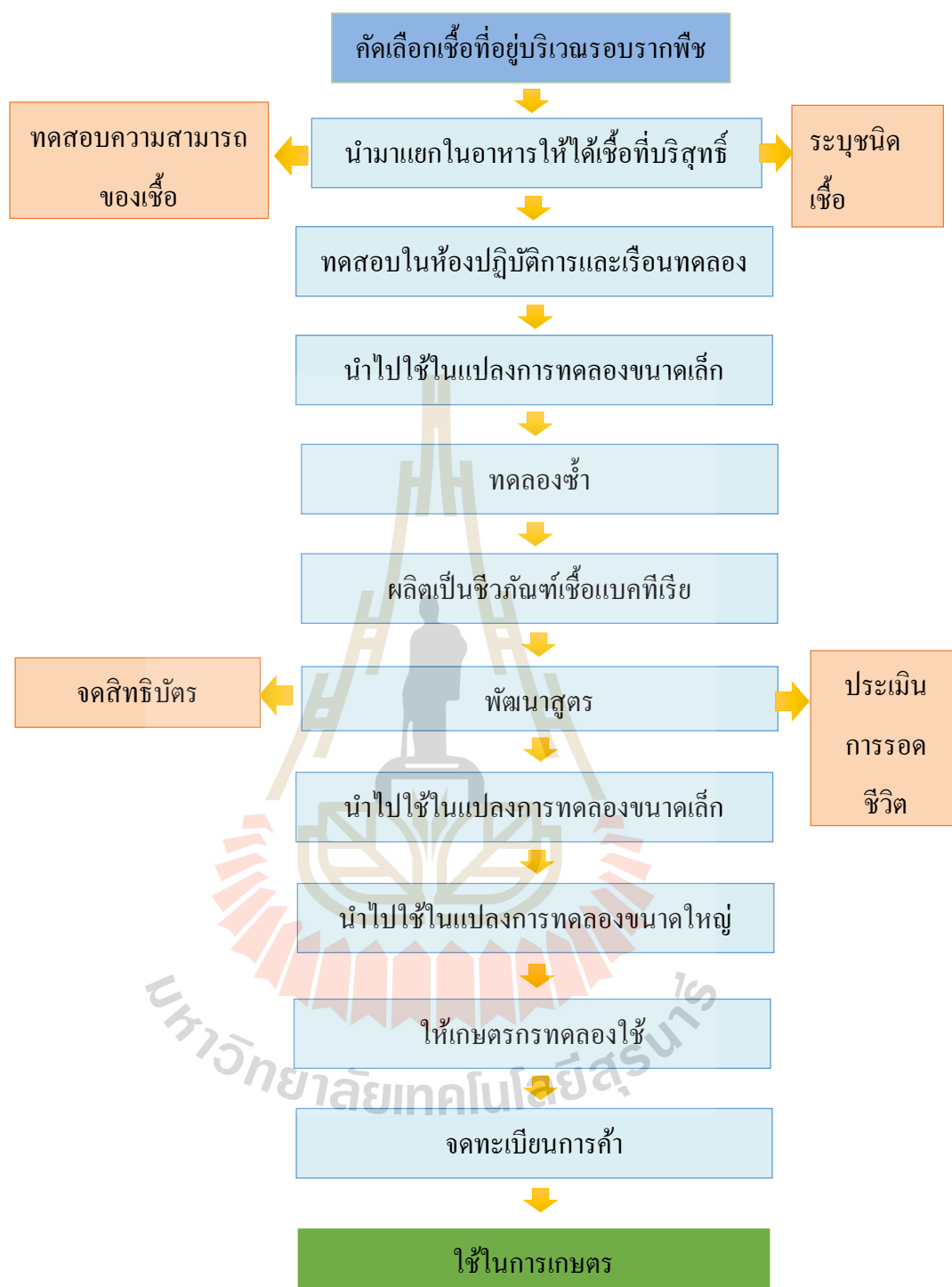
โรคหลายชนิดจะมีการปล่อยสารเคมีที่ไม่จำเพาะ (nonspecific elicitors) เช่นการผลิตสารพิษต่าง ๆ สารพวกไกลโคโปรตีน (glycoprotein) รวมทั้งเอนไซม์ของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ protease, cutinase, cellulase และ hemicellulase เป็นต้นเพื่อย่อยสลายประกอบของผนังเซลล์พืช พืชจะจดจำสารเหล่านั้น และมีการส่งสัญญาณเพื่อให้เกิดระบบการป้องกันตนเองขึ้นเช่นการสร้างผนังเซลล์ให้มี cellulase และ hemicellulase เพิ่มขึ้น ทำให้พืชมีความทนทานต่อการแพร่กระจายของเชื้อไปยังส่วนอื่น ๆ ซึ่งปริมาณ hemicellulose (secondary cell wall) ที่เพิ่มขึ้นสามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Hernández-Blanco et al., 2007; Eggert et al., 2014; Nafisi et al., 2014) และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ cellulase และ hemicellulase มีความสัมพันธ์กับการเกิด ROS และ phytohormones ในพืชด้วย (Vickers et al., 2009; Loreto et al., 2001) ขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารในกลุ่ม C-H bending เพิ่มขึ้น หลังจากถูกปลูกเชื้อสาเหตุโรคซึ่งสารในกลุ่มนี้ ประกอบไปด้วย ethylene ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช และกระบวนการส่งสัญญาณของ isoprene ในกระบวนการ ISR และเป็นส่วนประกอบของยางไม้กรดไขมัน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ cell membranes ทำให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคมมากขึ้น (Sweeting, 1996; Monson et al., 2013; Eggert et al., 2014) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของชานนท์ แสงจันทร์ (2557) มีการใช้เทคนิค Fourier transformed infrared spectroscopy ศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก พบกลุ่มไขมันชนิด C-H stretching กลุ่มไขมันชนิด C=O ester และกลุ่ม amide I มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide มีปริมาณลดต่ำลง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้น ให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและในผักกาดเขียวปลีได้นอกจากนี้ธัญมน ผิวกอง (2557) ได้นำตัวอย่างอ่อนมาประเมินการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารชีวเคมี ภายในเซลล์พืชเพื่อศึกษากลไกปกป้องตนเองด้วยเทคนิค FT-IR พบว่า กรรมวิธีที่ใช้สาร SecCaSUT007 และกรรมวิธีที่ใช้โคโคซาน การเปลี่ยนแปลงไปของสารในกลุ่ม lipid, C=O ester, amide protein, CH bending, cellulase, hemicellulase และ carbohydrate มีความแตกต่างกันในแต่ละกรรมวิธีการทดลองและเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อรา *S. ampelimum* สาเหตุโรคสแคบในขณะที่สารในกลุ่ม C=O ester ไม่มีความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลา ส่วนการแสดงออกของสารในกลุ่ม amide protein ในแต่ละช่วงเวลามีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของปริมาณ phenolic compound PR protein และเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการชักนำให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารในกลุ่ม C-H bending เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคซึ่งสารในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วย ethylene

ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชและการเปลี่ยนแปลงไปของปริมาณสารในกลุ่ม carbohydrate ลดลงเนื่องจากสารในกลุ่ม carbohydrate เป็นแหล่งพลังงานสำคัญในกระบวนการ SAR นอกจากนี้ คาร์โบไฮเดรต ยังใช้เป็นแหล่งพลังงานในการสร้าง ROS และ PR protein ซึ่งนำไปสู่การเกิด HR การทดลองนี้ ยังชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy ในการตรวจสอบสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช เนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างง่าย ใช้สารเคมีในการตรวจสอบน้อย วิธีการเหล่านี้ จึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการศึกษากลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และกลไกกระตุ้นความต้านทานเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามในการทดลอง ควรมีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดลองแบบ interval times เพื่อจะได้ทราบถึงกลไกที่เกิดขึ้น ได้ละเอียดมากขึ้น

7. การนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาปรับใช้กับระบบผลิตพืชของเกษตรกรอาจเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวให้กับเกษตรกรได้ เพราะมีการนำเอาจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ และนำมาทำเป็นกล้าเชื้อสำหรับนำไปขยายและประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ช่วยปรับปรุงบำรุงดินให้ดีขึ้น สามารถปลูกพืชของกรมให้ผลผลิตสูง ทำให้ธรรมชาติเกิดความสมดุล โรคพืชลดลง รวมทั้งเกษตรกรก็ไม่จำเป็นต้องใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมีในการผลิต ทำให้ช่วยลดต้นทุนการผลิต เกษตรกรสามารถพึ่งพาตัวเองได้มากขึ้น คุณภาพชีวิตของเกษตรกรก็ดีขึ้นตามไปด้วย ด้วยเหตุนี้ จึงได้มีการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำเร็จ โดยการพัฒนาสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์กล้าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ให้อยู่ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่มีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้นาน คงประสิทธิภาพ และง่ายต่อการนำไปใช้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ด้านโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกัน ความเข้ากันได้ระหว่างสารพาและผนังเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ออกมาให้พืชแสดงประสิทธิภาพอย่างเต็มที่เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีเทียบเท่ากับเชื้อสดที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการ และจะต้องมีการศึกษารายละเอียดของการผลิตเป็นสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์โดยที่มีการใช้วัสดุท้องถิ่นที่มีราคาถูก และให้มีประสิทธิภาพดีใช้ได้กับทุก ๆ สภาพแวดล้อม จุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ สารเคมีสังเคราะห์หรือรวมกับวิธีการปฏิบัติแบบดั้งเดิมที่มีการใช้มานานแล้วได้ดี (Jiamwijit, 2002) การใช้ชีววิธีโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ให้ประสบความสำเร็จ ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องอีกหลายประการ เช่น การพัฒนาสูตรเชื้อแบคทีเรียที่สามารถคงความมีชีวิต และประสิทธิภาพของเชื้อตลอดจนความสามารถในการครอบครอง และการมีชีวิตรอดบนพืชอาศัย ที่ผ่านมาการใช้สูตรชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียมีข้อจำกัดของในการนำไปใช้คือ จำนวนเชื้อที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชอาจมีจำนวนหรือปริมาณเชื้อไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการผลิตสูตรชีวภัณฑ์ และแนวทางการใช้งานที่เหมาะสมเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้ในแปลงเกษตรและประหยัด งานวิจัยนี้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงการพัฒนาวิธีการใช้และการนำไปปรับใช้ในพืช โดยนำไปใช้ในการปลูก

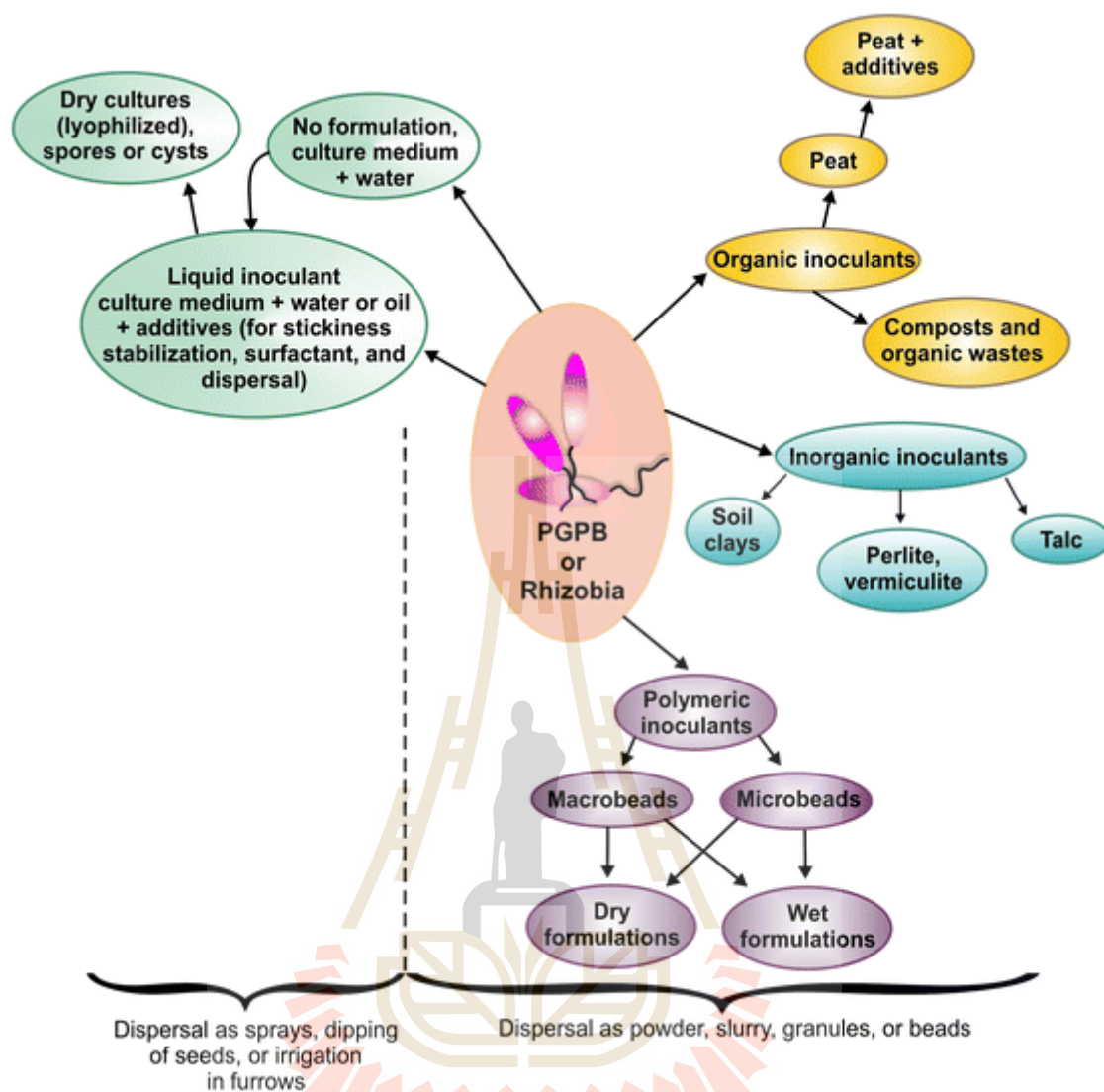
เมล็ด แช่ราก่วมกับการฉีดพ่นทางใบ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมกระบวนการเจริญเติบโต และควบคุมโรคพืช การพัฒนาวิธีการเลี้ยงขยายเชื้อแบคทีเรียจะใช้หลักการเดียวกับการผลิตปุ๋ยน้ำหมัก โดยทำการเตรียมสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของกากน้ำตาลที่หาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาดและมีราคาถูกนำมาผลิตเป็นสูตรอาหารเลี้ยงขยายเชื้อแบคทีเรีย โดยจากการเปรียบเทียบต้นทุนในการผลิตของสูตรอาหารนั้นสามารถลดค่าใช้จ่ายได้ถึง 2 เท่า เมื่อเทียบกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ เกษตรกรสามารถนำแบคทีเรียที่มีการเพิ่มปริมาณไปปรับใช้ในพืชปลูกชนิดอื่นได้ วิธีการนี้สามารถลดปัญหาและทดแทนการใช้สารเคมี ทั้งนี้การพัฒนาสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ให้ได้ผลดีมีประสิทธิภาพ ต้องเริ่มตั้งแต่ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชจนกระทั่งได้เป็นชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปให้เกษตรกรปรับใช้ได้จริง ซึ่งขั้นตอนในการพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์คือ คัดเลือกเชื้อที่อยู่บริเวณรอบรากพืช นำมาแยกในอาหารให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ทดสอบในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง นำไปใช้ในแปลงการทดลองขนาดเล็ก ผลิตเป็นชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย พัฒนาสูตรกล้าเชื้อ นำไปใช้ในแปลงการทดลองขนาดเล็ก นำไปใช้ในแปลงการทดลองขนาดใหญ่ เกษตรกรทดลองใช้ จดทะเบียนการค้า และนำไปใช้ในการควบคุมโรคทางด้านการเกษตร ดังแสดงในภาพที่ 5.2





ภาพที่ 5.2 ขั้นตอนการพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์
ที่มา : ดัดแปลงจาก Bashan et al., 2014

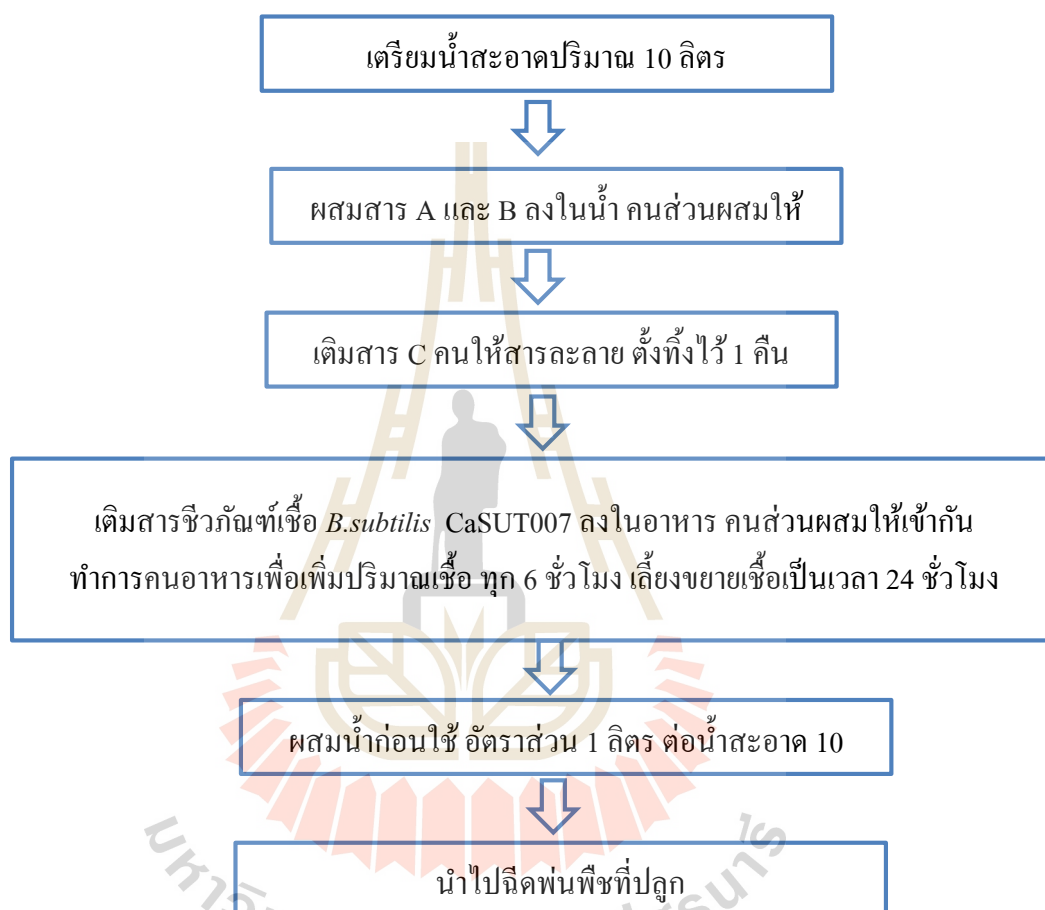
ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิด มาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของชีวภัณฑ์ เนื่องจากการผลิตในรูปแบบของชีวภัณฑ์จะทำให้เกิดความสะดวกต่อการนำไปใช้ ตัวอย่างชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น *B. subtilis* ได้แก่ ลาร์มินา® *P. fluorescens* ได้แก่ Top A506® และ *Streptomyces griseoviridis* ได้แก่ Mycostop® (ปวีณา สังข์แก้ว, 2556) งานวิจัยของ Minuto และคณะ (2006) รายงานว่า Mycostop® เป็นสารชีวภัณฑ์ทางการค้า ที่ผลิตจาก *S. griseoviridis* K61 ซึ่งคัดเลือกได้จาก Sphagnum peat สามารถใช้ในการควบคุม โรครากเน่าและโรคเหี่ยวของพืชได้ โดย *S. griseoviridis* K61 จะไปอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวราก ของพืช และจากการศึกษาการใช้ Mycostop® ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคของมะเขือเทศ (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopercici*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*) พบว่า Mycostop® เป็น สารชีวภัณฑ์ที่สามารถควบคุม โรครากเน่าและโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ สูตรของชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ตัวเดียวกัน อาจมีประสิทธิภาพสูงหรือต่ำแตกต่างกัน ซึ่งสูตรชีวภัณฑ์ดังกล่าว เป็นสูตรผงที่สามารถนำไปละลายน้ำและฉีดพ่นให้กับพืชโดยตรง สูตรชีวภัณฑ์จึงมีข้อจำกัดของการนำไปใช้ คือ จำนวนเชื้อที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชอาจมีจำนวนหรือปริมาณเชื้อไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการผลิตสูตรชีวภัณฑ์ และแนวทางการใช้งานที่เหมาะสมเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้ในแปลงเกษตร ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่มีประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อทำการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป ปัจจุบันในต่างประเทศทั่วโลกมีการพัฒนาและผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ในเชิงการค้ารูปแบบต่าง ๆ เพื่อใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชเป้าหมายชนิดต่าง ๆ หลากหลายรูปแบบ เพื่อให้สะดวกต่อการเก็บรักษาและการนำไปใช้ โดยชีวภัณฑ์ที่จำหน่ายทางการค้ามีหลายลักษณะที่นำไปใช้ เช่น รูปแบบผงละลายน้ำ เช่น Bio-Fungus®, Binab T®, Rootshield® และในรูปแบบเม็ดที่จำหน่ายทางการค้า Bio-Fungus®, Binab T®, Rootshield®, T-22 Planter Box® หรือในรูปแบบ pelleted เช่น Binab T® และในรูปแบบน้ำ เช่น Promote® (Haggag et al., 2011) ในงานวิจัยของ Srinivasan และคณะ (2009) นำจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความเข้ากันได้และมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting microbial consortia: PGPMCs) มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์แบบผง เพื่อใช้ในการควบคุมโรค sunflower necrosis virus ซึ่งทดสอบโดยการคลุกเมล็ด ผสมกับดินปลูก และพบว่าผลิตภัณฑ์สูตร PGPMC-1 ที่ประกอบด้วย talcum และสารแขวนลอย ของเชื้อ *B. licheniformis* strain MML2501+ *Bacillus* sp. strain MML2551+*P. aeruginosa* strain MML2212+*S. fradiae* strain MML1042 สามารถลดการเกิดโรคได้ 40.9 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการด้านการเกษตรสามารถผลิตรูปแบบผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายรูปแบบ อาทิ เจลบีท ผงแห้ง และชนิดเม็ด เป็นต้น โดยสามารถผสมกับสารพาหะชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 5.3



ภาพที่ 5.3 การพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเกษตรและสิ่งแวดล้อม

ที่มา : Bashan et al., 2014

ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้ออกแบบผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่พร้อมใช้งาน ดังแสดงในภาพที่ 5.5 ซึ่งเกษตรกรสามารถใช้ได้ง่ายและสะดวกในการนำไปใช้ ในการส่งเสริมและกระตุ้นการเจริญเติบโตในพืชปลูกทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพไร่ ดังนั้นจึงสามารถแนะนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้เกษตรกรได้นำไปเพิ่มปริมาณโดยมีขั้นตอนดังนี้



ภาพที่ 5.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณและการนำไปใช้ของสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์กล้าเชื้อเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007



ภาพที่ 5.5 ตัวอย่างชีวภัณฑ์สูตรสำเร็จกล้าเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

ทั้งนี้การที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคให้ดียิ่งขึ้นนั้นสามารถนำมาเพิ่มปริมาณของกล้าเชื้อก่อนไปใช้ ซึ่งคุณภาพของกล้าเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพเมื่อเกษตรกรนำไปใช้กับพืช กล้าเชื้อจุลินทรีย์เริ่มเป็นที่รู้จักของเกษตรกร แต่ยังไม่มีการใช้แบบจริงจังในประเทศไทย การแนะนำและนำไปใช้ของเกษตรกรสามารถนำไปปรับใช้ได้ด้วยตนเอง และสามารถที่จะปรับใช้ได้กับในทุกขั้นตอน หรือทุกระยะของการปลูกพืช ซึ่งการนำแบคทีเรียที่มีประโยชน์ไปใช้กับพืชนั้นมีหลากหลายวิธี และหลายแนวทาง เช่น การคลุกเมล็ด การราดดิน การผสมใช้กับดินปลูกหรือปุ๋ย เป็นต้น ในที่นี้วิธีการขยายประชากรเชื้อ *B. subtilis* นั้นมีวิธีคล้ายกับกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การหมักซีอิ๊ว น้ำปลา สาโท ไวน์ รวมไปถึงการผลิตปุ๋ยน้ำหมักที่เป็นที่นิยมในประเทศไทยที่เกษตรกรมีประสบการณ์ในการใช้อยู่แล้ว ซึ่งสามารถนำมาปรับใช้และเป็นวิธีที่ง่ายที่เกษตรกรจะนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของกล้าเชื้อเพื่อส่งเสริมความต้านทานพืชและควบคุมโรคในพืชได้ในสภาพแปลงปลูก จะมีความปลอดภัย ผลผลิตมีคุณภาพ ปราศจากสารเคมีกำจัดโรคพืชตกค้าง และช่วยเพิ่มผลผลิตในผักกาดเขียวปลีพันธุ์อ่อนแออีกด้วย ในอนาคตอาจมีการพัฒนาชีวภัณฑ์กล้าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ที่สะดวกต่อการนำไปใช้ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ สามารถแนะนำแนวทางการใช้ประโยชน์ในอนาคตให้กับเกษตรกรผู้ปลูกผักกาดเขียวปลีในการปลูกผักกาดเขียวปลีในประเทศไทยได้

รายการอ้างอิง

- เกษม พิติก. (2524). **ผักกาดและผักกะหล่ำ**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กุศล ถมมา. (2556). การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุของโรคพืชตระกูลแตง. **ปริญาปริญญาดุษฎีบัณฑิต** มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 99 หน้า
- ไก่อแก้ว สุธรรมมา. (2552). การพัฒนาชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ. **ปริญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช. 90 หน้า.
- กนกวรรณ ศรีบุญวาทย์. (2555). การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอยแบคทีเรียโปรไบโอติก. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กนกรัตน์ ป้องประทุม, คุณนิ ชนะบริพัฒน์ และ วรรัตน์ เรืองรัตนเมธี. (2542). การควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* 102566 โดยสารกันเสียบางชนิด. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37**. สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาวิศวกรรมศาสตร์ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542.
- กฤติเดช อนันต์ และคณิศ อธิวุฒินัน. (2559). การพัฒนาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus subtilis* TU-Orga1 เพื่อควบคุมโรคที่สำคัญของผักกาดน้ำ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 24 (5): 793-812.
- กฤษณะ ลี้มไพบูลย์. (2554). การหมักกรดแลคติกชนิด L(+) จากวัตถุดิบราคาถูกโดย *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49**. สาขาวิทยาศาสตร์ กรุงเทพฯ. 281-288. 594 หน้า.
- กาญจนา ธรรมนุ . (2010). การใช้แสงซินโครตรอนกับเทคนิค FT-IR spectroscopy และ microscope ในงานวิเคราะห์และวิจัยด้านต่าง ๆ [ออนไลน์] .ได้จาก:
<http://www.technology media.co.th/article/detail.asp?arid=6072&pid=467>.
- กาญจนา ธรรมนุ . (2555). เทคนิค FTIR Spectroscopy และ Microscope ในงานวิเคราะห์และวิจัย. **Technology**. 37(212): 95-96.
- กัญญารัตน์ นิเมวงษ์. (2553). **กากน้ำตาล**. [ออนไลน์]. ได้จาก:
http://kanyarat2542.blogspot.com/2010/11/blog-post_681.html.
- ข่าวเตือนการระบาดของศัตรูพืชประจำสัปดาห์. (2553). **แบคทีเรียสาเหตุโรคนาละ**. [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://www.agriqua.doae.go.th/forecast/week/week53/160853softrot/Bacterialsoftrot.html>

จรรย์รัตน์ ลิสมิทธิ. (2559). **น้ำหมักชีวภาพสูตรพลิกโลก งอกเร็ว ด้านโรค เพิ่มผลผลิต**. [ออนไลน์].

ได้จาก: <http://www.thairath.co.th/content/635192>

จารุณี เกษรพิกุล. (2558). การประเมินด้านความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของ
โพรไบโอติกที่พัฒนาขึ้นในรูปแบบแห้ง. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ชานนท์ แสงจันทร์. (2557). การควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora pv. carotovora* ในผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น. **ปริญญาวิทยาศาสตร์
มหบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี**. 95 หน้า.

ชัยสิทธิ ปรีชา, สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และ สุพจน์ กาเซ็ม. (2550). ศักยภาพในการผลิตแบคทีเรียโอ-
เอสอาร์ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 ในรูปสูตรผง. ใน **การประชุมวิชาการอารักขา
พืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเกษตร ภาควิชาโรคพืช.

ชนวน รัตนวราหะ. (2537). **การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย**. กองควบคุมพืช
และวัสดุการเกษตรกรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 912 หน้า.

ช่อทิพย์ ถนอมถื่น. (2538). การใช้แบคทีเรีย Antagonist ควบคุมเชื้อ *Erwinias* สาเหตุโรคเน่าและใน
มันฝรั่ง. **ปริญญาวิทยาศาสตร์มหบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. 111 หน้า

โชคชัย วณู และ หนึ่ง เดียอำรุง (2556). การพัฒนาหัวเชื้อ PGPR เพื่อการเก็บรักษาระยะยาว.
รายงานการวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. ปีงบประมาณ
พ.ศ. 2549-2550

ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ. (2551). กลไกของ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 ในการกระตุ้นการ
เจริญเติบโตและชักนำความต้านทานต่อโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง. **ปริญญาวิทยาศาสตร์
ดุสิตบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. 148 หน้า.

ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ และคณะ (2555). การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ใน
การควบคุมการเกิดโรคใบไหม้มันฝรั่งด้วยเทคนิค IR. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
[ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.slri.or.th/th/index.php?option=com>.

ไทยเกษตรศาสตร์. (2555). **ผักกาดเขียวปลี**. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thaikasetsart.com/>

ไทยเกษตรศาสตร์. (2556). **โรคเน่าและของพืชผักที่เกิดจากแบคทีเรีย**. [ออนไลน์]. ได้จาก:

<http://www.thaikasetsart.com/>

ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน. (2554). **การทำไวน์ผลไม้**. [ออนไลน์]. ได้จาก:

<https://surathai.wordpress.com/2011/05/15/fruitwine/>.

ธรรมศาสตร์ จันทรรัตน์, จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู. (2552). ประสิทธิภาพของสูตร
สำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผงในการควบคุมโรคแอนแทรกคโนสของผลพริก. ในรายงาน

การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 9. อารักขาพืชไทย เทดไท้องค์ภูมิ ตามวิธีเศรษฐกิจพอเพียง 24-26 พฤศจิกายน 2552.

ชนรัตน์ ศรีรุ่งเรือง และ วีระศักดิ์ เลิศสิริโยธิน. (2555). การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันของข้าวหอมมะลิและข้าวปทุมธานี 1 โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปี. ใน รายงานการประชุมวิชาการสมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 13.

ชัยมน ผิวทอง. (2557). การใช้สารทุติยภูมิจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 และไคโตซาน ชักนำความต้านทานต่อโรคเชื้อราในองุ่น. ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 120 หน้า.

เต็ม สมิตินันท์. (2544). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้สำนักวิชาการป่าไม้. กรมป่าไม้.

นพดล โพธิ์กาเหน็ด และ สมบูรณ์ ประสงค์จันทร์. (2556). การผลิตไวน์จากลูกจากโดยใช้การหมักด้วยยีสต์ทางการค้า. วารสารการพัฒนารวมชนและคุณภาพชีวิต. 1(2): 81-88.

นลินา เหมสนิท และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2552). *Pseudomonas fluorescens* SP007s กระตุ้นให้คะน้ำสร้าง salicylic acid เพื่อด้านทานการเกิดโรคขอบใบทอง. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 611-620.

นลินี จาริกภากร, พาณิ หนูเนียม, บุญมี วารินสะอาด และ มนูญ อเนกชัย. (2535). การควบคุมโรคข้าวด้วยวิธีคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis*. วารสารวิชาการเกษตร. 10: 85-89.

นิพนธ์ ดังคนานุรักษ์ และ คณิดา ดังคนานุรักษ์. (2547). สเปกโตรสโกปีด้านการวิเคราะห์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 305-344.

นิพนธ์ ทวีชัย. (2550). การควบคุมโรคพืชโดยวิธีธรรมชาติ. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยะวรรณ กาสลัก. (2558). เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก. รายงานการวิจัย ชุดโครงการวิจัย บาซิลลัส สับทิลิส ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ของถั่วหมักเพื่อเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ประดิษฐ์ ครัววัฒนา, ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และ ปทุมพร จิมเอนก. (2525). การเก็บรวบรวมยีสต์สายพันธุ์ดีในประเทศไทย และคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อการผลิตแอลกอฮอล์. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 20. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. 88-100.

ประจวบ บุตรศาสตร์, นิพนธ์ ทวีชัย, ขวลิต องประยูร และ วิชัย ไหมสีรัตน์. (2548). กลไกและการใช้เชื้อแบคทีเรียแอนตาโกนิสต์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ

- แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตร-
ศาสตร์ ครั้งที่ 43. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 240-247.
- ประวิติ บัวศรี. (2553). ประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากหอยเชอรี่ต่อการเจริญเติบโต
ของถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ (ส.ม. อนามัยสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 122 หน้า.
- ปฎิวิทย์ ลอยพิมาย, ทิพวรรณ ผาสกุล และ ราตรี มงคลไทย. (2554). เปรียบเทียบฤทธิ์การต้าน
อนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกรวมของเปลือกผลไม้. วิทยาศาสตร์เกษตร. 42(2)
(พิเศษ): 385-388.
- ประมุข กระจุกสุขสถิตย์, ณธิดา อารีย์ และ สิริรัตน์ ช้างมิ่ง . (2551) . การผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิ
เดสจากเชื้อยีสต์คอมบิแนนท์ *Pichia pastoris* YW-11430 และ *Pichia pastoris* YM-11430
ด้วยวิธีการหมักแบบครั้งคราว. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ครั้งที่ 46. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 278-285.
- ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์.(2545). สรีรวิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพของพืชเบื้องต้น. ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์คลังน่านวิทยา.
- ปวีณา สังข์แก้ว. (2556). สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus*
สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา. ปรญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช
วิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 112 หน้า.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. (2551). ประสิทธิภาพของสารชีวภาพไคตินในการเพิ่มพูนคุณภาพดินและจุลินทรีย์
ดินเพื่อยับยั้งการเกิด โรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551.
สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. (2539). การผลิตอาหารสัตว์. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- พรรณี อัสวศิริรัตนกุล และ เกษม อัสวศิริรัตนกุล. (2555). ผลของไคโตซานต่อการชักนำความ
ต้านทานเชื้อราในต้นอ่อนมะละกอ. ใน ฉบับพิเศษจากงานประชุมวิชาการระดับชาติ
มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 22 . หน้า 1-6.
- พรศิริ เพชรศรีช่วง และ มณฑารพ ยมาภัย. (2556). การใช้ไคติน ไคโตซาน และ ไคโตโอลิโกแซคคา-
ไรด์ เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร. [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://personal.sut.ac.th/
montarop/2013%20WBSITE/School of Biotech/Blog/Entries/html](http://personal.sut.ac.th/montarop/2013%20WBSITE/School%20of%20Biotech/Blog/Entries/html).
- พิษณุ ขอมรัตน์นาพร. (2553). การทำน้ำหมักชีวภาพและสมุนไพร. คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง. (2546). การปรับปรุงผลผลิตของกระบวนการหมักสปอร์ของ *Bacillus subtilis*
TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก. [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://dcms.thailis.or.th/
dcms/basic.php?institute_code=54&option=show&bib=193&query=Bacteria%20&doc_type=0](http://dcms.thailis.or.th/dcms/basic.php?institute_code=54&option=show&bib=193&query=Bacteria%20&doc_type=0).

- เพ็ญแข วันไชยชนวงศ์. (2543). การผลิตเอนไซม์เคราติเนสโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 และ *Bacillus pumilus* KUB-K0082. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. สาขาวิศวกรรมศาสตร์และสาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 522-528.
- ภัทรชัย กิริติสิน. (2551). วิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: หจก. วี. เจ. พรินติ้ง.
- ภัทรารักษ์ ศรีสมรรถการ. (2542). ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์และคุณภาพของไวน์หม่อน *Morus alba* L. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 218 หน้า.
- ภาวนา ลิกขนานนท์. (2542). การผลิตปุ๋ยหมัก. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการเร่งรัดการใช้ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์. กรมวิชาการเกษตร กองปฐพีวิทยา. 255 หน้า.
- ภูริษา สัจจาเพื่องกิจการ และ ชนัญญา วสุศรี. (2555) การวิเคราะห์ความเสี่ยงโซ่อุปทานธุรกิจการผลิตผักกาดคองบรรจุกระป๋อง. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 35(3): 311-32.
- รวินิภา ศรีมูล และ ศรีจันทร์ ตาใจ. (ม.ม.ป.). ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้แปรรูปในจังหวัดจันทบุรี. คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี.
- รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. (2535). วิศวกรรมแปรรูปอาหาร : การถนอมอาหาร. กรุงเทพฯ : โอเดียน-สโตร์. 284 หน้า.
- รุ่งทิพย์ สังข์เผือก. (2557). การศึกษาชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในลำปะหลัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 127 หน้า.
- รัชฎาวรรณ เดชมณี และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2548). แถบ Thin-layer Chromatography ของสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Bacillus firmus* และการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. ใน รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 313-320.
- รังสิมา วิเศษศรี และวัฒนา พัฒนากุล. (2555). อิทธิพลของกรดซาลิไซลิกต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ของข้าวโพดข้าวเหนียวในสภาวะขาดน้ำ. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 13. มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- วงศ์บุญ สืบสกุล และคณะ. (2550). การควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของมะเขือเทศโดยชีววิธี. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2550. สำนักสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- วรารักษ์ ภูักกิตพันธ์ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2552). การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าว. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 207-214.

- วรารณ ภู่อักดีพันธ์ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2553). เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่กระตุ้นให้ข้าวพันธุ์ต้านทานผลิตเอนไซม์ปกป้องการติดเชื้อจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ได้เพิ่มขึ้นมากกว่าข้าวพันธุ์อ่อนแอ. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 601-610.
- วรรณทิศา ลากศิริ. (2552). การทำแห้งแบบฟนฝอยและความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา *Lactobacillus plantarum* KMITNB 53.4. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 184-191.
- วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ศศิธร วุฒินิชย์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สพจน์ กาเข้ม, ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2549). การส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำภูมิต้านทานโรคของกะหล่ำดอกและผักคะน้าด้วย เชื้อจุลินทรีย์และสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. 795-810.
- วิลาวรรณ เชื้อบุญ, สพจน์ กาเข้ม, และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2550). ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ร่วมกับสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นความต้านทานโรคของการผลิตกะหล่ำดอกในสภาพไร่. วารสารเคหการเกษตร ปีที่ 31 ฉบับที่ 5. 264-265.
- วิลาวรรณ เชื้อบุญ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2551). การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคเน่าและของกะหล่ำดอกและการประเมินความเสี่ยง. วารสารวิชาการโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิลาวรรณ เชื้อบุญ. (2551). ลักษณะและการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุมเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและของกะหล่ำดอก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 120 หน้า.
- วิไลพร ป้องเพียร. (2551). การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผักแม้ว. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
- ไวโรจน์ เดชมหิตกุล, จันทรจิรา อยู่คง, กนกวรรณ พุ่มพุดรา, แสงชัย เอกประทุมชัย และ เพ็ญจันทร์ เมฆ วิจิตรแสง. (2550). การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. ปีที่ 30 ฉบับที่ 2. 251-259.
- ศศิธร วุฒินิชย์. (2545). โรคของผักและการควบคุมโรค. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 173 หน้า.
- ศรีอุบล ทองประดิษฐ์. (2546). ขบวนการผลิตไวน์. คณะเกษตรศาสตร์ นครศรีธรรมราช สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

- ศุภลักษณ์ มณีแสง, เสมอใจ ชื่นจิตต์, วสันต์ เพชรรัตน์ และ วิจิตร ลีละสุกกุล. (2551). การคัดเลือก *Bacillus* spp. สำหรับใช้ควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาวโดยชีววิธี. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 39(3): 189-192.
- ยุรฉัตร ขอดโยธี. (2554). การชักนำการต้านทานโรคและการแสดงออกของยีน PR-1 ในยางพารา โดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 120 หน้า
- สมคิด ดิสภาพร. (2538). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการ "เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช" สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 298 หน้า
- สมคิด ดิสภาพร. (2540). การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 92 หน้า
- สุจินต์ แก้วนิล. (2545). การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และคณะ. (2549). การควบคุมโรคของถั่วเหลืองฝักสดด้วยแบคทีเรีย ไอเอสอาร์และผลิตภัณฑ์ชีวภาพต่างชนิด. ใน การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1. กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 46-47.
- สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2550). เอกสารประกอบการสอน วิชาความปลอดภัยทางชีวภาพด้านโรคพืช เรื่องบทบาทการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพอย่างปลอดภัย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2552). โรคพืชเศรษฐกิจและการควบคุม. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 77 หน้า
- สุรัชย์ ไชยนิติก. (2558). "นกพิราบ" บินไกล มองตลาดใหญ่ ฝักกาดอง "สุขภาพ". ประชาชาติธุรกิจ ออนไลน์. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.prachachat.net/news_detail.php?newsid=1405069556
- สุพจน์ กาเข็ม และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2546). ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคใบจุดและเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลือง. ใน การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41. สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร. 524-531: 605 หน้า
- สุพรรณการ์ สมใจเฟื่อง. (2544). การผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในการหมักไข่แดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

- สุพัตรา ตันตวานิช. (2529). การใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับห้องปฏิบัติการ. บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุริยา สาสนรักกิจ. (2542). **ปุ๋ยน้ำชีวภาพ**. ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 25 หน้า
- สมเดช กนกเมธากุล. (2547). **สเปกโทรสโกปีในการพิสูจน์โครงสร้างสารอินทรีย์**. ภาควิชาเคมีมหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 17-22.
- เสมอใจ ชื่นจิตต์, ศิวพร หอกุล และ จำริญ ยืนยงสวัสดิ์. (2548). การตรวจหาแบคทีเรีย *Xanthomonas saxonopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคน้ำวุ้นและพืชวงศ์ Araceae ในภาคใต้ของประเทศไทย. วารสารวิชาการโรคพืช. 19: 47-56.
- หนึ่ง เดียอรุ่ง, สมปอง หมั่นแจ้ง และ สมพร ชุมเหลือชานนท์. (2555). รายงานการวิจัยการรวมและคัดเลือกสายพันธุ์ **Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)**. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- อรพิน ภูมิภมร และ สุชาดา คูชัยสิทธิ์. (2536). การผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในสัตว์เศรษฐกิจ. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 285-299: 683 หน้า.
- อุไรจนา กสิกรรมไพบูลย์. (2534). ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากและดินปลูกมะเขือเทศในการควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 84 หน้า.
- เอกดนัย กอกิมพงษ์. (2551). การทำแห้งเยือกแข็งสำหรับการทำเย็นบำบัดและวัดซินติเอ็นเอ. LAB.TODAY 5. 38: 36-40.
- อินชญา ประคองคำ. (2554). การควบคุมโรคสแคบในองุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary โดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 55 หน้า
- อัจฉรา เฟื่องหนู. (2550). การพัฒนาเทคโนโลยีสูตรสำเร็จ *Bacillus megaterium* แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อัมพร เทียงตรงดี. (2550). หลักการทำลายและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์. จุลชีวและปรสิตวิทยา. วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนีสวรรคบุรี.
- อภิวัฒน์ วงศ์จินดาคุณ, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธิณัฐวัฒน์. (2558). ประสิทธิภาพสารกรองของ *Pseudomonas fluorescens* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้วยพารา. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 4 (2): 155-164.

- อภิเชษฐ์ หมั่นอร่าม. (2554) .ผลของกากน้ำตาลและกากเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติก. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 148-155: 686 หน้า
- Abadias, M., A. Benabarre, and N. Teixid. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Inter J. food micro.** 65: 173-182.
- Agrios, G. N. (1997). **Plant Pathology 4th ed.** (635pp). Academic Press. New York.
- Alan G. L. (1988). **A symbolic formulation for equations of motion of multibody systems.** Retrospective theses and dissertations. Iowa State University.
- Anfoka, H. G. (2000). Benzo-(1,2,3)-thiadizide-7-carbothioic acid s-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill cv. *Vollendung*) to cucumber mosaic virus. **Crop protection.** 19: 401-405.
- Araujo, M.B. and Pearson, R.G. (2005). Equilibrium of species' distributions with climate. **cography.** 28: 693-695.
- Asaka, O. and Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB 14. **Applied and Environmental Microbiology.** 62(11): 4081-4085.
- Augustin, M.A. and Sanguansri, L.(2008). **Encapsulation of Bioactives.** In: **Aguilera JM, Lillford PJ, editors. Food Materials Science** [online]. Available: <http://www.springerlink.com/content/n6p621/via> the INTERNET. Accessed 2008 Nov 15.
- Bantoc, G. B. (1970). Chinese cabbage and the mustard. In J.E. Knott and J.R. Deanon (eds.). **Vegetable Production in Southeast Asia.** University of the Philippines Press, Los Banos, Laguna, Phillippines.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E. and Jacobsen B.J. (2002). **Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phylosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agents** *Physiol Mol Plant Pathol.* 61: 289-298.
- Bashan, Y. and. De-Bashan, L. E. (2015). Inoculant Preparation and Formulations for *Azospirillum* spp. **Handbook for *Azospirillum*.** Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem in Rehovot, Israe.

- Bashan, Y., De-Bashan, L. E., Prabhu, S. R. and Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* (2014) 378: 1-33.
- Bautista, C. V., Rahlwes, K. and Straight, P. (2014). Bacterial competition reveals differential regulation of the pks genes by *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** 196(4): 717-728.
- Berger, F., Hong, Li., White, D., Frazer, R. and Liefert, C. (1996). Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* cot1 in High-humidity fogging glasshouses. **Phytopathology.** 86: 428-433.
- Brian, B. M. G. and Deborah, R. F. (2002). **Biological control of plant pathogens: research, Commercialization and application in the USA.** [Online]. Available: <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/BiologicalControl.aspx>.
- Brooks, G.F., Butel, J.S. and Morse, S.A. (2015) **Medical Microbiology.** 27st ed. United States of America: Prentice Hall International Inc.
- Boubakri, H., Wahab, MA., Chong, J., Bertsch, C., Mliki, A. and Soustre-Gacougnolle, I. (2012). Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defense responses, including HR like-cell death. **Plant Physiology and Biochemistry.** 57: 120-33.
- Buensanteai, N., Yuen, G. Y. and Prathuangwong, S. (2008). Changes in soybean proteome associated with growth promotion by seed treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. **Phytopathology.** 98(6): S28.
- Buensanteai, N., Yuen, G. Y. and Prathuangwong, S. (2009). Priming, signaling, and protein production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. **World Journal Microbiol Biotechnology.** 25: 1275-1286.
- Buensanteai, N., Thumanu, K., Sompong, M., Athinuwat, D., and Prathuangwong, S. (2012). The FTIR spectroscopy investigation of the cellular components of cassava after sensitization with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* CaSUT007. **African Journal of Microbiology Research.** 6(3): 603-610.
- Burkhanova, G.F., Yarullina, L.G., and Maksimov, I.V. (2007). The control of wheat defense responses during infection with *Bipolaris sorokiniana* by chitooligosaccharides. **Russian Journal of Plant Physiology.** 54(1): 104-110.

- Burr, T. J., Norelli, J. L., Katz, B., Wilcox, W. F. and Hoysing, S. A. (1988). Streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple orchard and its association with conjugative plasmid. **Phytopathology**. 78: 410-413.
- Buschmann, H., Fan, Z. W. and Sauerborn, J. (2005). Effect of resistance-inducing against on sunflower (*Helianthus annuus* L.) and its infection with the parasitic weed *Orobancha cumana* Wallr. **Journal of Plant Disease and Protection**. 112: 386-397.
- Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **Int Dairy J.**; 14: 835-847.
- Chen, C., Bélanger, R. R., Benhamou, N. and Paulitz, T. C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**. 56: 13-23.
- Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H. and Shin, K. S. (2003). Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. **FEMS Microbiology Letters**. 223: 47-51.
- Chunquan, C., Belanger, R.R., Benhamou, N. and Pailitz, T.C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**. 56: 13-23.
- Choudhary, D.K. and Johri, B.N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants-With special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**. 164: 493-513.
- Copeland, L.O. and McDonald, M.B. (1995) **Principles of seed science and technology**. 3 ed. New York: Chapman & Hall, 1995. 409p.
- Cohen, R. Y. (2002). β -Aminobutyric Acid-Induced Resistance Against Plant Pathogens. **The American Phytopathological Society**. 86(5): 448-457.
- Crump, D.H. (1998). Biological control of potato and beet cyst nematodes. **Aspects of Applied Biology**. 52: 383-386
- Davis, R.F, Backman, P.A., Rodriguez-Kabana, R. and Kokalis-Burelle, N. (1992). Biological control of apple fruit diseases by *Chaetomium globosum* formulations containing cellulose. **Biological Control**. 2: 118-123.
- Desmond, C., Ross, R.P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G. and Stanton, C. (2002) Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **J Appl Microbiol** 93: 1003-1011.

- Doane, J. F. and Chapman, R. K. (1964). The relation of the cabbage maggot, *Hylemyia brassicae* (Bouché), to decay in some cruciferous crops. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 7: 1-8.
- Domenech, J., Reddy, M.s., Kloepper, J.W., Romos, B., and Gutierrez Manero, J. (2006). Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil borne diseases in pepper and tomato. **Biocontrol**. 51: 245-258.
- Douro-kpindou, O.K., Godonou, I. and Houssou, A. (1995). Control of *Zonocerus variegatus* by ultra-low volume application of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Biosci tech**. 5: 131-139.
- Dziezak, J. D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Journal of Food Technology**. 42: 136-151.
- Eikemo, H., Stensvand, A. and Tronsmo, A. M. (2003). Induced resistance as a possible mean to control diseases of strawberry caused *Phytophthora* spp. **Plant Dis**. 87: 345-350.
- EI-Hassan, S.A. and Gowen, S.R. (2006). Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. **Journal Phytopathol**. 154: 148-155.
- Eggert, D., Naumann, M., Reimer, R. and Voigt, C. A. (2014). Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. **Scientific Reports**. 4: 4159.
- Espina, F., and Packard, V. S. (1979). Survival of *Lactobacillus acidophilus* in spray drying process. **Journal of Food Protection**. 42: 149-152.
- Foster, E. M. (1962). Culture preservation, Symposium on lactic starter culture. **Journal of Dairy Science**. 45: 1290-1294.
- Frandberg, E. and J. Schnurer. (1994). Chitinolytic properties of *Bacillus pabuli* K.I. **Journal of Applied Bacteriology** 76: 361-367.
- Franks, F., Hatley, R. H. M. and Mathias, S. F. (1991). Materials science and the production of shelf stable biologicals. **Bio Pharm**. 4, 38.
- Fravel, D.R., J.A. Lewis and J.L. Chittams. (1995). Alginate prill formulations of *Talaromyces flavus* with organic carriers for biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**. 85: 165-168.

- Gardiner, G. E. et al. (2000). Comparative survival rates of Human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**. 66: 2605-2612.
- Gilbert, G.S., Handelsman, J., and Parke, J.L.(1990). Role of ammonia and calcium in lysis of zoospores of *Phytophthora cactorum* by *Bacillus cereus* strain UW85.Exp. **Mycol**.14: 1-8.
- Graham, S. and Victor, G. (1998). Nematophagous activity of *Arthrobotrys dactyloides* when encapsulated in alginate granules and introduced into soil. **Ph.D Thesis**. School of Land. Crop and Food Sciences. The University of Queensland. 211p.
- Haggag, W. M. and Abdall, A. M. 2011. Foliar application of *Streptomyces aureofaciens* improve protection in mango against post-harvest anthracnose and enhances fruit yield. **European Journal of Scientific Research** 63: 139-149.
- Hamel, L.P. and Beaudoin N. (2010). Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions. *Planta*. 232: 787-806.
- Hamsupo, K., Sukyai, P., Nitisinprasert, S., and Wanchaitanawong, P. (2005). Different Growth Media and Growth Phases Affecting on Spray Drying and Freeze Drying of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. *Kasetsart J*. 39: 718-724.
- Hauben L., Moore ERB., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. (1999). Phylogenetic position of phytopathogens within Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**. 21: 384-397.
- Heckly, R. J. (1978). Preservation of Microorganisms. **Applied of Microbiology** 24: 1-53.
- Hernández-Blanco, C., et al. (2007). Impairment of cellulose synthases required for arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. **The Plant Cell**. 19(3): 890-903.
- Iriti, M., et al. (2010) Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean plants. **Biological Control** 54: 241-247.
- Jayaraj , D.J., Radhakrishnan, N.V. and Velazhahan, R. (2006). Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. 39(1): 1-8.
- Jiamwijit, J. (2002). Formulation of *Bacillus* sp. MK007 for control *Curvularia lunata*, the causal of seed discolorization of rice. M.Sc.Thesis. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

- Kim, S. S., and Bhowmik, S. R. (1990). Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yogurt. **Journal of Food Science**. 55(4): 1008-1010.
- Kilara, A., Shahani, K. M., and Das, N. K. (1976). Effect of cryoprotective agents on freeze drying and storage on lactic cultures. **Journal of Cultured Dairy Products**. 11(3): 8-17.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. (1980) . *Pseudomonas* siderophore: a mechanism explaining disease suppressive soils. **Nature**. 286: 885-8.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S. (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**. 94: 1259-1266.
- Kohler, A., Scheindling, S. and Conrath, U. (2002). Benzothiadizole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. 128: 1046-1056.
- Kondoh, M., Mitsuyo, H. and Makoto, S. (2000). Co-utilization of *Bacillus subtilis* and flutolanil in controlling damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani*. **Biotechnology Letters**. 22: 1693-1697.
- Kumar, A., Prakash, A. and Johri, B.N.(2011). **Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem**. Department of Biotechnology and Bioinformatics Centre. Barkatullah University. India.
- Kumar, S. (2013). **Defence Mechanism in Plants- Phase I**. [Online]. Available: <http://sanjeetbiotech.blogspot.com/2013/03/defence-mechanism-in-plants-phase-i.html>
- Lam, S.Y. (2001). The Effects of Store Environment on Shopping Behaviors: a Critical Review. **Association for Consumer Research**. 28: 190-197.
- Lewis, J.A. and R.D. Lumsden. (1995). Application of biocontrol fungi in granular formulations of pregelatinized starch-flour to control damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani*. **Biocontrol**. 5: 397-404.
- Liang, J. G., Tao, R. X., Hao, Z. N., Wang, L. P. and Zhang, X. (2011). Induction of resistance in cucumber against seedling damping-off by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus megaterium* strain L8. **African Journal Biotechnology**. 10(36): 6920 - 6927.
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y. and Luo, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanism. **Postharvest Biology and Technology**. 35: 265-269.

- Liu, Y., et al. (2006). Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hem agglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. **Peptide**. 28(3): 553-559.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P. and Godonou, I. (1993). Field infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil-based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Bioscience tech.** 3: 337-346.
- Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F. and Pasqualini, S. (2001). Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. **Plant Physiology**. 126(3): 993-1000.
- Macek, T., Král, J., VanĚk, T., Blažek, J., Macková, M. (1994). Chemical sterilization of nutrient media for plant cell cultures using diethylpyrocarbonate. **Biotechnology Techniques**. 8: 885-888.
- Manjula, K. and Podile, A. R. (2005). Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF1. **World Journal of microbiology & Biotechnology**. 21:1057-1062.
- Maleck, K., et al. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nat Genet**. 26: 403-410.
- Mark, A.J., Shasha, B.S. and Schisler, D.A. (1996). Formulation of *Collectotrichum truncatum* microsclerotia for improved biocontrol of the weed hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). **Biocontrol**. 7: 107-113.
- Marten, p., Bruckner, S. and Luth, P. (1999). Plant growth promotion of eifferent cultivate plant and biological control of soil brone phytopatogenic fungi by *Bacillus subtilis* strain B2G. **J. Plant Dis**. Protect.106: 74-81.
- Metasebia, T., Tadele, T. and Sakhuja, P. K. (2009). Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**. 100: 94-99.
- Meng, X., Junjie, Y., Mina, Y., Xiaole, Y. and Yongfeng L. (2015). Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. **Biological control**. 85: 46-51.
- Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M. L. 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection** 25: 468-475.

- Monson, R. K., Jones, R. T., Rosenstiel, T. N. and Schnitzler, J. P. (2013). Why only some plants emit isoprene. **Plant, Cell and Environment**. 36: 503-516.
- Nafisi, M., Fimognari, L. and Sakuragi, Y. (2014). Interplays between the cell wall and phyto hormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. **Phytochemistry**. 112: 63-71.
- Effect of sulfur-containing compounds on *Bacillus cellulosome*-associated 'CMCase' and 'Avicelase' activities Paa, S.A. (1988). Formulations useful in applying beneficial microorganisms to seeds. **Tibtech**. 6: 276-279.
- Prathuangwong, S., S. Kasem, J. Thowthampitak and D. Athinuwat. (2004). Multiple plant response to bacterial mediated protection against various disease. **J. of ISSAAS**. 11(3): 79-87.
- Prathuangwong, S., R. Detmanee and S. Kasem. (2005). Potential roles of *Bacillus firmus* KPS46 filtrates and its secondary metabolites in controlling soybean bacterial pustule. **Proc of the 2nd Asian Conf on Plant Pathol**. National University of Singapore Singapore. 2D-1.
- Prathuangwong, S., Kasem, S., Chuaboon, W., Hiromitsu, N. and Suyama, K. (2006a) Characterization and identification of new potential bacteria for biological control of plant diseases. **In Proceeding of the ISSAAS**. International Congress Kuala Lumpur. 65-66.
- Prathuangwong, S., S. Kasem, C. Precha, W. Chuaboon and S. Tsuyumu. (2006b). Field management of vegetable diseases with thermotolerant bacterial antagonist and synergistic bioproduct. **In Proc. of the 5th JSPS-NRCT**. Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications. 64.
- Prescott, L.M. (2002). **Microbiology**. 5th Edition. McGraw-hill. Boston. 1147p.
- Preecha, C. (2009). Formulation development and partial characterization of mechanism conferred by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 against soybean disease. **Ph.D. Thesis**. Kasetsart University. 236p.
- Qi, Z. H. and Xu, A. (1999). Starch based ingredients for flow encapsulation. **Cereal Food World**. 44: 460-465.
- Rajet Ray. (2003). Blocking of Enhanced Sensitivity to Behavioural Effects of Naloxone Induced by Narcotic Agonists in Rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. 47: 407-414.

- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O. and Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiol Rev.** 34: 1037-1062.
- Risch, S.J. and Reineccius, G.A. (1995). Spray-dried orange oil-Effect of emulsion size on flavor retention and shelf life. **ACS Symposium Series.** 370: 67-77.
- Ryals, J. A., et al. (1996). Systemic acquired resistance. **Plant Cell.** 8: 1809-1819.
- Sandra L. Fox, and Greg A. Bala. (2000). **Production of Surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 Using potato substrates.** Elsevier Science Ltd.
- Sally, A.M., Sahin, F. and Rowe, R.C. (2002). **Black rot of crucifers.** Department of Plant Pathology The Ohio State University. 3125-96.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behlc, R.W. and Jackson, M.A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant disease. **Phytopathology.** 94: 1272-1275.
- Sharga, B.M. and Lyon, D.G. (1998). *Bacillus subtilis* BS107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. **Can. J. Micro.** 44: 777-783.
- Shetty, P.N., et al. (2009). Effect of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. **Journal of Experimental Botany.** 60(15): 4287-4300.
- Siddiqui, I.A. and Shaukat. (2003). Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHAO in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. **Soil Biol Biochem.** 35: 615-1623.
- Srinivasan, K. and Mathivanan, N. 2009. Biological control of sunflower necrosis virus disease with powder and liquid formulations of plant growth promoting microbial consortia under field conditions. **Biological Control** 51: 395-402.
- Stephanie C. T. and Christopher J. G. (2014). **The effects of elevated carbon dioxide concentrations on the metamorphosis, size, and survival of larval hard clams (*Mercenaria mercenaria*), bay scallops (*Argopecten irradians*), and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*).** Stony Brook University, School of Marine and Atmospheric Sciences, Stony Brook, New York. 54 (6): 2072-2080.
- Stoppok, E. and K. Buchholz. (1993). Sugar-Based Raw Materials for Fermentation Application. In G. Stephanopoulos. eds. **Biotechnology Volume 3 Bioprocessing.** VCH Publishers Inc., New York: 5-29.

- Streeter, J.G. (2003). Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**. 95(3): 484-491.
- Swain, M. R., Kar, S., Padmaja, G. and Ray, R. C. (2006). Partial characterization and optimization of production of extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung microflora. **Polish Journal of Microbiology**. 55(4): 289-296.
- Sweeting, L. M. (1996). **Isoprene, terpenes and natural alkenes and alkynes**. [online].
<http://pages.towson.edu/ladon/enrich/terpene.pdf>.
- Takeuchi, H., T. Yasuji, H. Yamamoto, and Y. Kawashima. (2000). Spray-dried lactose composite particles containing an ion complex of alginate-chitosan for designing a dry-coated tablet having a time-controlled releasing function. **Pharmace Research**. 17: 4-99.
- Thumanu, K., et al. (2014). Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cell-derived hepatocytes using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**. 16(5): 057005.
- Tsvetkov, T. and Brankova, R. (1983) Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**. 20: 318-323.
- Teixeira, P., Castro, H., and Kirby, R. (1995a). Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal Applied Bacteriol**. 78: 456-462.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**. 11: 1187-1194.
- Tindall, H. D. (1968). **Commercial Vegetable Growing**. Oxford University Press, Ely House, London.
- Ting Yu, Shang Yuke, Li Yanfang, Mu Wei and Liu Feng. (2009). The isolation and characteristics of antifungal substances produced by *Bacillus pumilus* strain BSH-4[J]. **Acta Phytolacica Sinica**, 2009. 36(1): 65-69.
- Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related protein. **Eur. J. Plant Pathol**. 103: 753-765.
- Van Dyke, M.I. and Prosser, J.I. (2000). Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier. Department of Molecular and Cell Biology, University of Aberdeen. Institute of Medical Sciences. Foresterhill, Aberdeen AB25 2ZD. UK. **Soil Biology & Biochemistry**. 32(2000): 1377-1382.

- Vickers, C. E., et al. (2009). Isoprene synthesis protects transgenic tobacco plants from oxidative stress. **Plant, Cell & Environment**. 32(5): 520-531.
- Vidhyasekaran P. and Muthamilan M. (1995): Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. **Plant Disease**. 79: 782-786.
- Vincelli, P. and Hershman, D. E. (2011). Assessing foliar diseases of corn, soybeans and wheat: Principles and practices. Ppfs-misc-06. University of Kentucky. College of agriculture. 5 p.
- Vleesschauwer, D. D., Djavaheiri, M., Bakker, A. H. M. P. and Höfle, M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on Pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. **Plant Physiology**. 148: 1996-2012.
- Walker, H.L. and Vonnick, W.J. (1983). Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. **Weed Sci**. 31: 333-338.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N. and Dong, X. N. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. **PLoS. Pathol**. 2: 1042-1050.
- Wasternack, C., et al. (2006). The wound response in tomato-role of jasmonic acid. **J Plant Physiol**. 163: 297-306.
- Weller, D.M. (1983). Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take all. **Phytopathology**. 73: 1548-1553.
- Wendehenne, D., Dumer, J., Chen, Z. and Kiessig, F. D. (1997). Benzoethiadiazole an inducer of plant defenses inhibits catalase and ascorbate peroxidase. **Phytochemistry**. 47(4): 651-657.
- Wiyono, S., Schulz, D.F. and Wolf, G.A. (2008). Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. **Biol Control**. 46(4): 348-357.
- Yanez, M.A., Nocker, A. E., Soria-Soria, Murtula, R. L., Martinez, V. (2011). **Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR**. J. Microbiol. Methods, 85 (2), pp. 124-130.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. and Nakahara, T. (1998). Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. **Applied Microbiology and Biotechnology** 49: 72-76.

- Zehnder, G.W., Yao, C., Murphy, J.F., Sikora, E.J. and Kloepper, J.W. (2000) Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic virus by plant growth-promoting *rhizobacteria*. **Biol Control** 45: 127-137.
- Zhao, Y., Damicone, J. P., Demezas, D. H., and Bender, C. L. (2000). **Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris***. Plant Dis. 84: 1008-1014.
- Zhao, Y., P. Li, K. Huang, Y. Wang, H. Hu and Y. Sun. (2013). Control of postharvest soft rot caused by *Erwinia carotovora* of vegetables by strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential modes of action. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 29: 411– 420.



ภาคผนวก



1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 Nutrient broth (NB)

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

แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

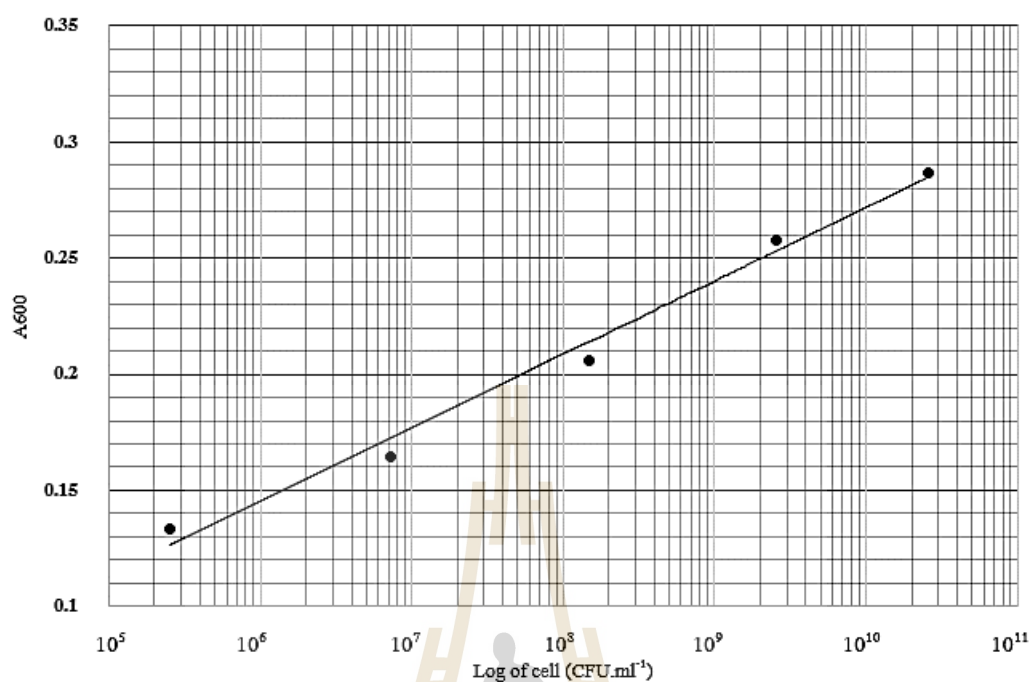
1.2 Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
วุ้นผง (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายวุ้นผงก่อนแล้วจึงใส่ส่วนประกอบอื่นๆ คนให้ละลาย แล้วต้มจนกระทั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที



กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์

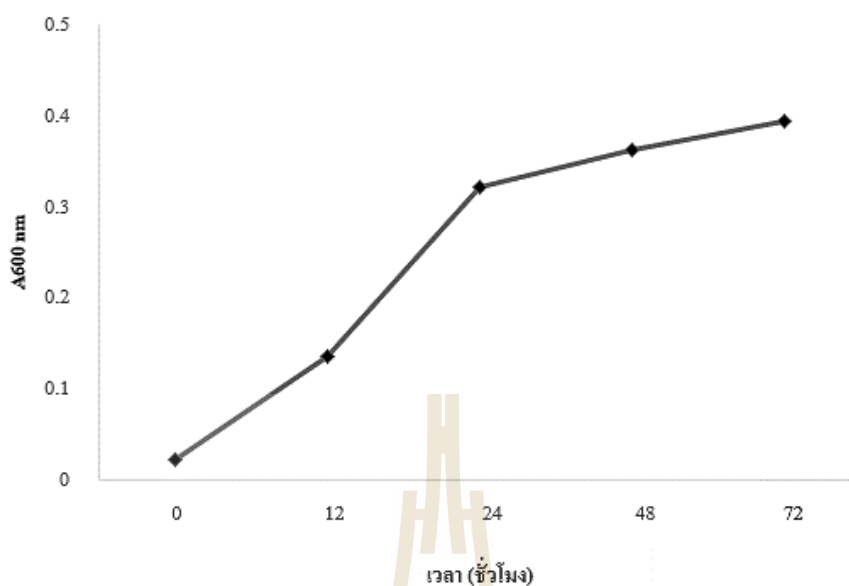


ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร และค่าล็อกจำนวนเซลล์ต่อ (Log of cell concentration (CFU.ml⁻¹)) ของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าดูดกลืนแสง (600 nm) ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007
0	0.021
12	0.135
24	0.321
48	0.363
72	0.394

กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* CaSUT007



ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

ตารางภาคผนวกที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณเชื้อเริ่มต้นของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ในแต่ละหน่วยน้ำหนักของชีวภัณฑ์

อัตราส่วนชีวภัณฑ์ (กรัม)	จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (cfu.g ⁻¹)
0.1	1.9×10^5
0.2	3.8×10^5
0.3	5.7×10^5
0.4	7.6×10^5
0.5	9.5×10^5

ตารางภาคผนวกที่ 3 เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง nutrient glucose broth (NGB) และ molasses diamonium phosphate and yeast extract (MDY)

NGB		MDY	
ส่วนผสม/ลิตร	ราคา(บาท)	ส่วนผสม/ลิตร	ราคา(บาท)
Beef extract 3 กรัม	16.2	กากน้ำตาล 25 กรัม	0.175
Peptone 5 กรัม	27.4	DAP 1 กรัม	0.36
Glucose 10 กรัม	0.3	Yeast extract 3 กรัม	17.4
ราคารวม	43.9	ราคารวม	17.93

ตารางภาคผนวกที่ 4 ต้นทุนการผลิตสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

ส่วนผสม/ลิตร	ราคา(บาท)
กากน้ำตาล 25 กรัม	0.175
DAP 1 กรัม	0.36
Yeast extract 3 กรัม	17.4
แป้งมัน 9 กรัม	0.4
CMC 1 กรัม	0.55
ราคารวม	18.88



ประวัติผู้เขียน

นางสาวจิตมนัส นิกากิจ เกิดเมื่อวันที่ 20 มีนาคม พ.ศ. 2533 ที่เขตหนองจอก จังหวัด กรุงเทพมหานคร ได้สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2555

ในปี พ.ศ. 2555 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยระหว่างการศึกษาได้รับทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย และทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก

