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

การทดลองนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 (CaSUT007) เพื่อควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลี (*Brassica juncea*) โดยทำการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อ จำนวน 3 สูตร พบว่า สูตร molasses ผสม diamonium phosphate และ yeast extract (MDY) มีปริมาณเชื้อเพิ่มสูงที่สุดเท่ากับ $1.30\pm0.16x10^{9}$cfu.ml$^{-1}$ หลังจาก 48 ชั่วโมง นำสูตรดังกล่าวไปพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์แบบผงแห้งจากการพ่นฝอย (spray dry) ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม และใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบวิธีการเพิ่มขยายในอาหารสูตรขยาย 3 สูตร พบว่า สูตรที่สามารถเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อได้สูงที่สุดคือ สูตร MDY และที่กรรมวิธีการเขย่าทุก 6 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่า เชื้อสามารถเพิ่มปริมาณได้เท่ากับ $8.2\times10^{7}$ cfu.ml$^{-1}$ จากการทดลองหาอัตราส่วนของสารชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ พบว่าการใช้สารชีวภัณฑ์สูตร SJN007 อัตราส่วน 0.5 กรัม ต่ออาหารขยาย 1 ลิตร สามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อได้ $1.7\times10^{8}$ cfu.ml$^{-1}$ การทดสอบประสิทธิภาพการทำให้อาหารขยายปลอดเชื้อและลดอัตราการปนเปื้อนจำนวน 5 กรรมวิธี พบว่า กรรมวิธีการเติมสารโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ($K_2S_2O_5$) ความเข้มข้น 250 ppm ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเพียง $1.0\pm0.14\times10^{1}$ cfu.ml$^{-1}$ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีมาตรฐานคือ การนึ่งฆ่าเชื้อที่ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ การเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างกล้าเชื้อ (starter) กับอาหารสูตรขยายที่เติมสารโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ พบว่า อัตราส่วน 1:10 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ $1.47\pm0.86\times10^{8}$ cfu.ml$^{-1}$ และเมื่อนำเชื้อที่ผ่านการเพิ่มปริมาณจากกล้าเชื้อสูตรสำเร็จมาใช้ในการควบคุมโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovara* pv. *carotovora* ในผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ในสภาพเรือนทดลอง จำนวน 9 กรรมวิธี พบว่า กรรมวิธีการคลุกเมล็ดและแช่รากด้วยเชื้อขยายจากกล้าเชื้อสูตร SJN007 อัตราส่วน 1:50 ร่วมกับการฉีดพ่น 3 ครั้ง หลังย้ายปลูก 10, 20 และ 30 วัน สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลีได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรรมวิธีการควบคุมโรคด้วยสารเคมี และสูตรสำเร็จ *Bacillus* ทางการค้า ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคเน่าเละได้ 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 ß-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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

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 $1.30\pm0.16\text{x}10^{9}$ 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 $8.2\times10^{7}$ 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 $1.7\times10^{8}$ 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 $1.0\pm0.14\times10^{1}$ 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 $1.47\pm0.86\times10^{8}$ cfu.ml$^{-1}$. The formulation was further tested for its induced resistance ability against soft rot bacterial pathogen, *Erwinia carotovara* 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$^{-1}$), ß-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.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2016 Advisor's Signature_____