รายงานการวิจัย

การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิต และการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพทางการเกษตร

(Formulation of culture media for agricultural bio-inoculant production and shelf-life extension)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร .พรรณลดา ติตตะบุตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2557

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับคำปรึกษาจาก ศ. ดร. นันทกร บุญเกิด และ อ. ดร. โสภณ วงศ์แก้ว รวมทั้งขอขอบคุณ ดร. พรพรรณ อู่สุวรรณ และ ผศ. ดร. ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ ที่เป็นผู้มอบเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด และขอขอบคุณสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อุดหนุนการวิจัย และอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานวิจัยด้านต่าง ๆ ทางคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะสามารถนำผลงานวิจัยนี้ไปต่อยอดในการผลิตเชิงพาณิชย์ได้จริงต่อไปในอนาคต

หนึ่ง เตียอำรุง

พรรณลดา ติตตะบุตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

จากงานวิจัยของมหาวิทยาลัยที่ผ่านมามีเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชที่มีศักยภาพในการต่อยอดสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์จำนวน 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Streptomyces* sp. ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ ทั้งนี้จากการทดสอบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 7 สายพันธุ์ พบว่าสูตรอาหาร Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม เป็นสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในสองกลุ่มนี้ได้ดีที่สุด โดยสามารถเพิ่มการเจริญให้อยู่ในระดับ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อพิจารณาต้นทุนการผลิตเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน (Nutrient Broth) พบว่ามีราคาต้นทุนที่ถูกกว่าถึง 28 เท่า และเมื่อทดสอบหาชนิดของสารพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ พบว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความเหมาะสมของการใช้สารพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน โดยการใช้สาร Polyvinylpyrrolidone (PVP) หรือ Polyethylene glycol (PEG) เพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง สามารถยืดอายุการเก็บรักษาให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้นาน 3-4 เดือน ณ อุณหภูมิห้อง และสามารถใช้ขวดบรรจุภัณฑ์ชนิดโพลีเอทธิลีนในการเก็บรักษาได้ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช 2 ชนิด คือ เชื้อรา *Phytophthora* spp. และเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่ามีเพียงเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR 103 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด และรองมาคือเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้เมื่อเก็บอยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หัวเชื้อ แม้มีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนานถึง 6 เดือน ดังนั้นเชื้อทั้งสองชนิดนี้จึงมีศักยภาพในการนำไปผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไปโดยใช้สูตรอาหารที่มีราคาต้นทุนการผลิตต่ำ และมีอายุการเก็บรักษาได้อย่างน้อย 3 เดือน โดยที่ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในระดับสูง

Abstract

Previously, two groups of biocontrolling bacteria, *Bacillus* sp. and *Streptomyces* sp. have been reported to have a potential for commercial production as agricultural bio-inoculant. In this research, the culture medium for these bacteria has been formulated in order to reduce the cost of production and extend the shelf-life of the product. Seven strains of bacteria in genera of Bacillus and Streptomyces were used in this study. It was found that the culture medium formulated by adding yeast extract 0.5 g, molasses 20 g, K_2HPO_4 0.05 g, and KH_2PO_4 0.15 g in 1 L of water could be used to cultivate and enhance the growth of bacterial cell up to 10^8-10^9 cells/ml. The production cost of this developed medium was 28-fold lower than the cost of standard culture medium (Nutrient broth). To extend the shelf-life of inoculant, synthetic- and bio-polymers were used to blend in the medium. It was found that different bacteria suited with different polymers. Mixing Polyvinylpyrrolidone (PVP), Polyethylene glycol (PEG) alone or mixing with cassava starch could extend the shelf-life of inoculant stored at room temperature for 3-4 months at 10^8 cells/ml. Polyethylene bottle could be used for packaging these bacterial inoculants. However, only *Streptomyces* sp. SHR 103 and *Bacillus* sp. BSN301 could perform well on the growth inhibition of plant pathogens, *Phytophthora* spp. and *Colletotrichum* spp. along the shelf-life of inoculants stored at room temperature for 6 months. Therefore, these two strains of bacteria have high potential to produce as agricultural inoculant in commercial scale by using this developed low cost medium with shelf-life at least of 3 months and high biocontrolling activity.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญเรื่อง ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญภาพ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 2

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 3

2.1 การทดสอบสูตรอาหารที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำสำหรับการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ 3

2.2 การทดสอบสูตรอาหารที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพและบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาหัวเชื้อ 4

2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช 5

2.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด 6

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์และอภิปรายผลการทดลอง 7

3.1 การทดสอบหาสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม 7

3.2 การทดสอบหาสูตรอาหารที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบบรรจุภัณฑ์สำหรับการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ 12

3.3 การตรวจสอบคุณสมบัติของหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช 17

3.4 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด 20

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 21

บรรณานุกรม 22

ประวัตินักวิจัย 23

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเจริญ..... 4
ตารางที่ 2 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบหาชนิดของพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์..... 5
ตารางที่ 3 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. เมื่อเก็บรักษาหัวเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน..... 19
ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เมื่อเก็บรักษาหัวเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน..... 19
ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบการประเมินค่าใช้จ่ายในการผลิตเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน และสูตรที่พัฒนาแล้ว..... 21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN502 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 7

รูปที่ 2 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN603 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 8

รูปที่ 3 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSD101 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 8

รูปที่ 4 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 9

รูปที่ 5 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN201 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 10

รูปที่ 6 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR103 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 11

รูปที่ 7 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. SSR107 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 11

รูปที่ 8 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN502 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 12

รูปที่ 9 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN603 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 13

รูปที่ 10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSD101 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 14

รูปที่ 11 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 14

รูปที่ 12 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN201 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 15

รูปที่ 13 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR103 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 16

รูปที่ 14 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. SSR107 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 16

รูปที่ 15 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืชด้วยวิธี dual culture 18

รูปที่ 16 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยใช้เทคนิค BOX-PCR 20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

จากการที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญกับเรื่องของสุขภาพและความปลอดภัยของอาหารมากขึ้น เกษตรกรจึงหันมาทำการเกษตรในระบบเกษตรอินทรีย์ หรือระบบเกษตรแบบปลอดสารพิษมากยิ่งขึ้น ดังนั้นบทบาทของหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพจึงมีมากขึ้น ทั้งนี้หัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพมีบทบาทในการทำหน้าที่เพิ่มธาตุอาหารให้แก่พืช ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี หรือหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพบางชนิดมีบทบาทในการควบคุมโรคพืช ซึ่งสามารถใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดโรคพืชได้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพของหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพขึ้นกับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ ซึ่งจะต้องมีปริมาณอยู่เกินกว่าที่กฎหมายกำหนด และมีอายุการเก็บรักษาได้นานอย่างน้อย 3-6 เดือน โดยที่ประสิทธิภาพการทำงานของจุลินทรีย์ยังคงเดิม ดังนั้นการตรวจสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ตลอดช่วงอายุการเก็บรักษาจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชที่ยังต้องมีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชนั้น ๆ อยู่ตลอดช่วงระยะเวลาอายุการเก็บรักษา และในแง่ของการผลิต อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัจจัยหลักที่กำหนดต้นทุน ดังนั้นการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยใช้วัสดุ หรือวัตถุดิบที่มีราคาถูกจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพให้มีราคาถูกและเป็นที่ยอมรับต่อไป

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จากการที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรได้มีงานวิจัยหลากหลายที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาบทบาทของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร โดยในปัจจุบันมีเพียง 4 เรื่องเท่านั้นที่ได้รับการพัฒนาต่อยอดในรูปแบบของหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพในเชิงธุรกิจ คือ หัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง หัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับโสน หัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วฝักยาวไร้ค้าง และ หัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียว ซึ่งมีการพัฒนาสูตรอาหารในรูปของหัวเชื้อจุลินทรีย์เหลว โดยทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อ ได้นาน 6 เดือน โดยพบว่ายังมีจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในช่วง 10^8 เซลล์ต่อมล. ทั้งนี้หัวเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้พบว่ามีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่วได้ดี ทำให้ลดอัตราการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนในการเกษตรได้ อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในกลุ่มควบคุมโรคพืชบางชนิดที่มีประสิทธิภาพแต่ยังไม่ได้รับการพัฒนาให้อยู่ในรูปของหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ โดยในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม และได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ในสภาพไร่จนเป็นที่แน่ใจแล้วว่าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีประโยชน์ทางด้านการเกษตร และสามารถใช้ได้จริงเพื่อลดการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช ดังนั้นหากสามารถพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้เหล่านี้ให้อยู่ในรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ มีอายุการเก็บ

รักษาที่นานขึ้น โดยมีการตรวจสอบคุณภาพของหัวเชื้อที่ผลิตในทุกขั้นตอน ก็จะเป็นการเพิ่มความมั่นใจที่จะนำผลงานวิจัยจากห้องปฏิบัติการไปใช้ประโยชน์ได้จริงในทางการเกษตร

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ควบคุมโรคพืชนี้ให้อยู่ในรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ ชนิดเหลว (liquid bioinoculant) เพื่อให้สะดวกในการฉีดพ่นต่อพืช ทั้งนี้ในโครงการวิจัยจะพัฒนาสูตรอาหารที่มีราคาถูกขึ้นมาใหม่ โดยมุ่งเน้นไปที่การหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นหากสามารถหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกมาใช้ทดแทนแหล่งคาร์บอนเดิมในสูตรอาหารได้ ก็จะทำให้ต้นทุนในการผลิตอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ลดลง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อให้ได้สูตรอาหารที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ
2. เพื่อให้ได้สูตรอาหารที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ
3. เพื่อให้ได้บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ
4. เพื่อให้ทราบผลกระทบของสูตรอาหาร และวัสดุพาหะต่อความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรค
5. เพื่อให้ได้ลายพิมพ์ DNA ที่จำเพาะกับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

รวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรจากงานวิจัยของสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ม.เทคโนโลยีสุรนารี แล้วตรวจสอบคุณสมบัติการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของเชื้อเหล่านี้ จากนั้นคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนต่ำเพื่อประกอบเป็นสูตรอาหารให้กับเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ แล้ว จะทำการตรวจสอบหาสารกลุ่มพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิห้อง โดยยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชได้ และมีการควบคุมคุณภาพจากการทำลายพิมพ์ DNA ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ เพื่อให้เกิดความมั่นใจเมื่อเกษตรกรนำไปใช้จริง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพทางการเกษตรที่มีราคาถูก รวมทั้งสามารถทำให้มีอายุการเก็บรักษาได้นาน และเกษตรกรสามารถนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้ไปใช้ได้จริงในการเกษตร โดยสามารถมั่นใจในคุณภาพของผลิตภัณฑ์และตรวจสอบได้ ทั้งนี้มหาวิทยาลัยสามารถที่จะพัฒนาให้อยู่ในรูปธุรกิจต่อไปได้

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การทดสอบสูตรอาหารที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำสำหรับการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ

ทำการรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชที่มีศักยภาพในการต่อยอดสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ ซึ่งใช้ในโครงการทดลอง ดังนี้

Bacillus

สายพันธุ์ BSN 502 ใช้ในการยับยั้งการก่อโรคราน้ำค้าง, โรคสแคปในองุ่น

สายพันธุ์ BSN 603 ใช้ในการยับยั้งการก่อโรคราน้ำค้าง, โรคสแคปในองุ่น

สายพันธุ์ BSD 101 ใช้ในการยับยั้งการก่อโรคสแคปในองุ่น

สายพันธุ์ BSN 301 ใช้ในการยับยั้งการก่อโรคราสนิมในองุ่น

สายพันธุ์ BSN 201 ใช้ในการยับยั้งการก่อโรคราสนิมในองุ่น

Streptomyces

สายพันธุ์ SHR 103 ใช้ในการยับยั้งการก่อโรคราน้ำค้างในองุ่น

สายพันธุ์ SSR 107 ใช้ในการยับยั้งการก่อโรคราน้ำค้าง, โรคสแคปในองุ่น

โดยทำการเก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้น Nutrient agar (NA) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบ (working stock) และเก็บรักษาเชื้อใน cryoprotectant solution (20% (w/v) glycerol) เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

จากนั้นทดสอบหาสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม โดยตรวจสอบการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารสูตรต่าง ๆ ทำการทดสอบโดยใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน (นันทกร และคณะ, 2552) การเสริมน้ำตาล glucose ในสูตรอาหาร และทดสอบใช้ beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนการใช้ Yeast extract นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบใช้สารที่มีคุณสมบัติในการรักษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (buffer) เติมลงในอาหารเพื่อปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสม และช่วยยืดอายุการเก็บรักษา (นันทกร และคณะ, 2552) โดยสูตรอาหารที่ทำการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้ตรวจสอบการเจริญ และจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยใช้เทคนิค Total Plate Count โดยเปรียบเทียบการเจริญ และการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหาร NB เป็นสูตรควบคุม ทั้งนี้ทำการทดลองใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารจำนวน 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ โดยเขย่าบน Shaker ที่ 150 rpm เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อไปจนครบ 30 วัน

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเจริญ

สูตร	สัดส่วนและองค์ประกอบ (ใน 1 ลิตร)
1	NB (Beef extract 3 กรัม, Peptone 5 กรัม)
2	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม
3	NB + Glucose 1 กรัม
4	Beef extract 3 กรัม + Molasses 20 กรัม
5	NB + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม
6	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม
7	NB + Glucose 1 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม
8	Beef extract 3 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม

2.2 การทดสอบสูตรอาหารที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ และบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาหัวเชื้อ

ทดสอบหาสูตรอาหารที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ โดยการใช้สูตรอาหารพื้นฐานที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา เสริมด้วยสารเคมีในกลุ่มพอลิเมอร์ เช่น Polyvinylpyrrolidone (PVP), Polyethylene glycol (PEG), แป้งมันสำปะหลัง (Tittabutr et al., 2005, 2007) เพื่อรักษาให้เชื้อมีอายุการเก็บรักษาที่ดีขึ้นโดยได้ทดสอบสูตรต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ทุกเดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยใช้เทคนิค Total Plate Count โดยเปรียบเทียบการเจริญ และการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่ไม่มีการเติมสารพอลิเมอร์เป็นสูตรควบคุม

ทั้งนี้หัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ทำการทดสอบการเก็บรักษาโดยบรรจุในขวดพลาสติกชนิด โพลีเอทธิลีน (polyethylene, PE) ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยบรรจุ 200 มิลลิลิตรต่อขวด เพื่อให้มีอากาศ (Head space) ประมาณ 50 มิลลิลิตร ทั้งนี้บรรจุภัณฑ์ที่นำมาทดสอบเป็นบรรจุภัณฑ์ และปริมาตรที่เหมาะสมที่ได้จากการ

ทดสอบในหัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ทางการค้า และได้ทดสอบเบื้องต้นกับเชื้อที่ทดสอบกลุ่ม *Bacillus* และ *Streptomyces* แล้วว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงนำมาทดสอบเพื่อตรวจสอบอายุการเก็บรักษาในสูตรอาหารที่มีการเติมพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 2 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบหาชนิดของพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์

สูตร	สัดส่วนและองค์ประกอบ (ใน 1 ลิตร)
1	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม
2	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม + PVP 1%
3	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม + PVP 2%
4	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม + PEG 1%
5	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม + แป้งมันสำปะหลัง 1%
6	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม + PVP 1% + แป้งมันสำปะหลัง 1%
7	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม + PVP 0.5% + แป้งมันสำปะหลัง 0.5%
8	Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม + PEG 0.5% + แป้งมันสำปะหลัง 0.5%

2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืชของหัวเชื้อระหว่างช่วงอายุการเก็บรักษาในสูตรอาหารที่ทำการทดสอบ

การตรวจสอบคุณสมบัติของหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการเก็บรักษาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. และ *Colletotrichum* spp. โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ทดสอบบนอาหาร PDA เป็นเวล 5-7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของไมซีเลียมเชื้อราแต่ละชนิด แล้วย้ายชิ้น

วุ้น 2 ชิ้น ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชวางลงบนอาหาร PDA จากนั้นปลูกเชื้อ *Bacillus* spp. หรือ *Streptomyces* spp. ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารในด้านตรงข้ามกับจุดที่วางวุ้นของเชื้อรา โดยเว้นระยะห่างเท่ากันโดยทำแยกกันแต่ละเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) จากนั้นตรวจสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ และการเจริญของเชื้อรา ทั้งนี้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของหัวเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือน ควบคู่ไปกับการตรวจสอบอายุการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

2.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองตามวิธีการมาตรฐาน จากนั้นทำการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยใช้เทคนิค BOX-PCR ด้วย primer BOX A 1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (Marques et al., 2008) โดยเตรียมสารละลาย 25 ไมโครลิตร ภายในหลอดปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย ไพรเมอร์ 10 พิโคโมล, dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 25 มิลลิโมลาร์, Taq DNA polymerase 0.5 U และบัฟเฟอร์ 1X GoTaq Flexi DNA Polymerase ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ดังนี้ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที, และ extension ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 16 นาที ซึ่งทั้งหมดทำซ้ำ 35 รอบ หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ไปทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดและใช้ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อต่อไป

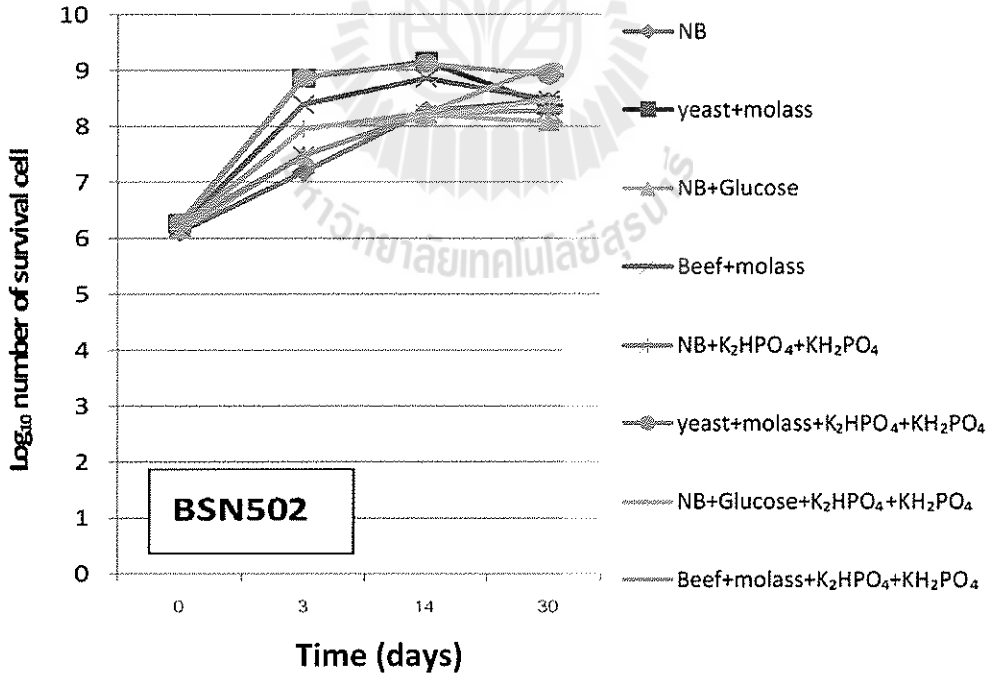
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

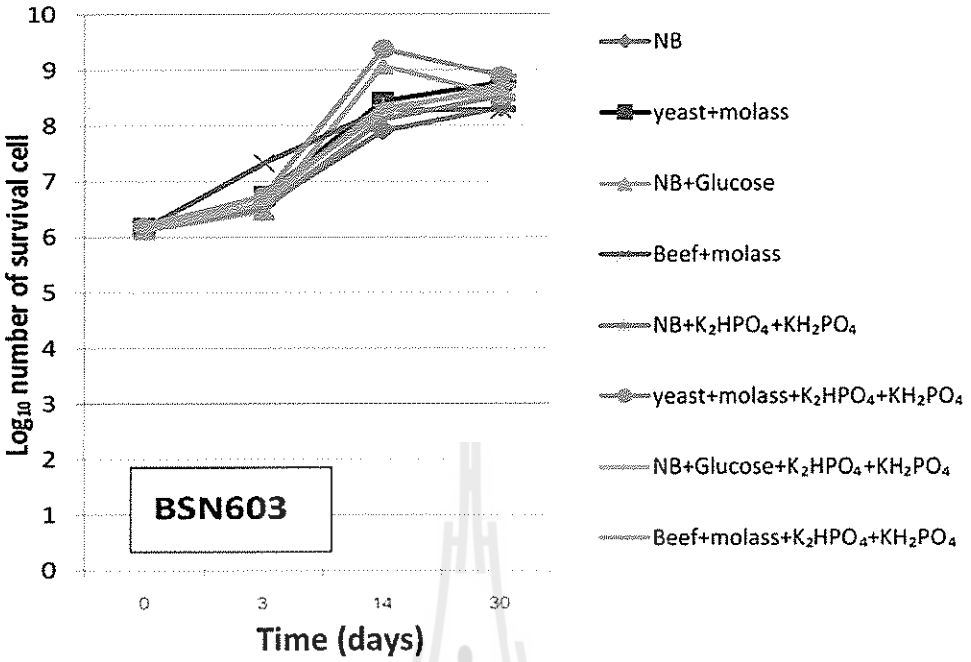
ผลการวิเคราะห์และอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การทดสอบหาสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม

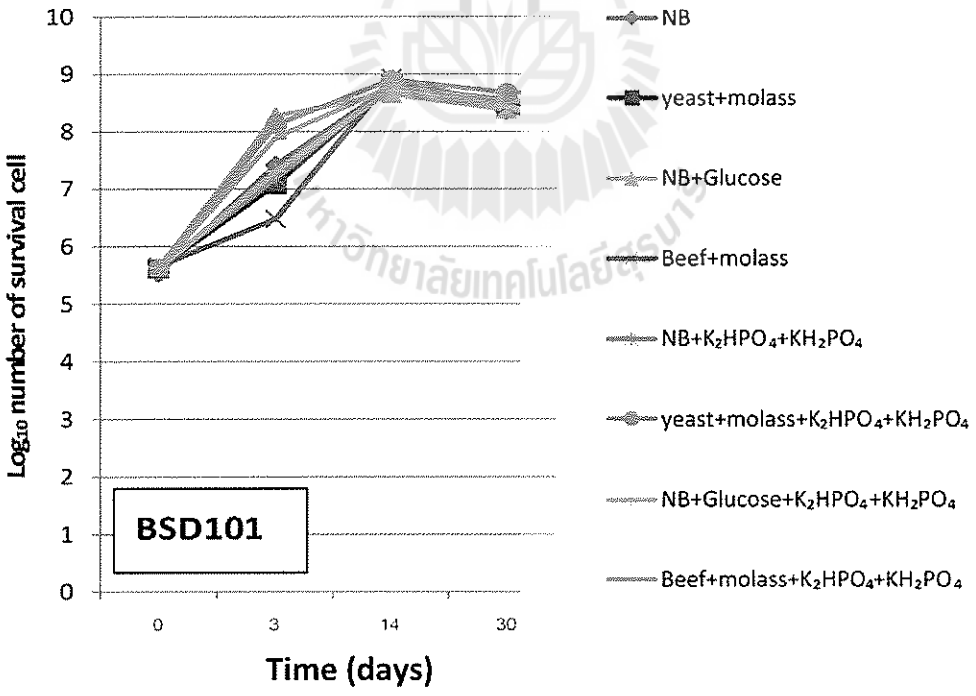
เมื่อทำการทดสอบสูตรอาหารต่าง ๆ โดยใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งการเสริมน้ำตาล glucose ในสูตรอาหาร และทดสอบใช้ beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนการใช้ Yeast extract อีกทั้งทดสอบใช้สารที่มีคุณสมบัติในการรักษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (buffer) เติมลงในอาหารเพื่อปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสม และช่วยยืดอายุการเก็บรักษา (สูตรอาหารแสดงในตารางที่ 1) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 1-7 ทั้งนี้พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. BSN502, BSN603 และ BSD101มีการเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดได้ดี หลังจากเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องนาน 30 วันในอาหารสูตรที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน NB แต่การเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มลงในสูตรอาหาร NB ไม่ได้ทำให้เชื้อแบคทีเรียที่ทดลองมีการเจริญได้มากขึ้น สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ทดสอบคือ beef extract ร่วมกับกากน้ำตาล พบว่าให้การส่งเสริมการเจริญของเชื้อโดยรวมได้น้อยกว่าการใช้ yeast extract ร่วมกับกากน้ำตาล แต่พบว่าการเติมสาร K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 เพื่อเป็น buffer ในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาล และ yeast extract สามารถส่งเสริมการเจริญและทำให้เชื้อที่ทำการทดสอบส่วนใหญ่มีชีวิตรอดได้ในปริมาณสูงที่สุด (มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) (รูปที่ 1, 2 และ 3)



รูปที่ 1 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN502 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

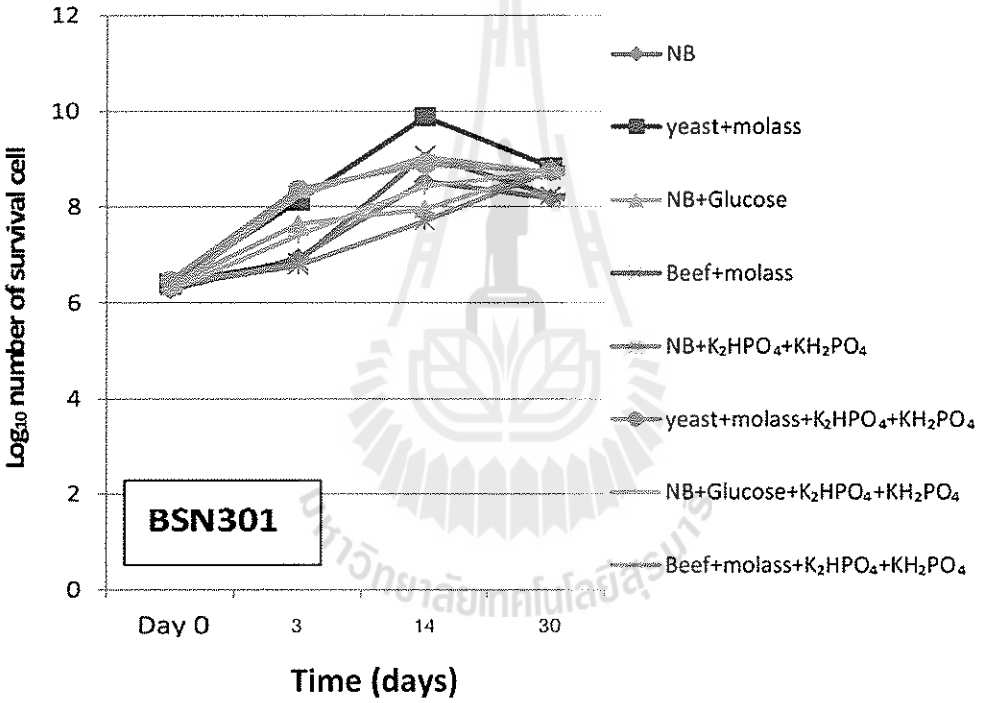


รูปที่ 2 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN603 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

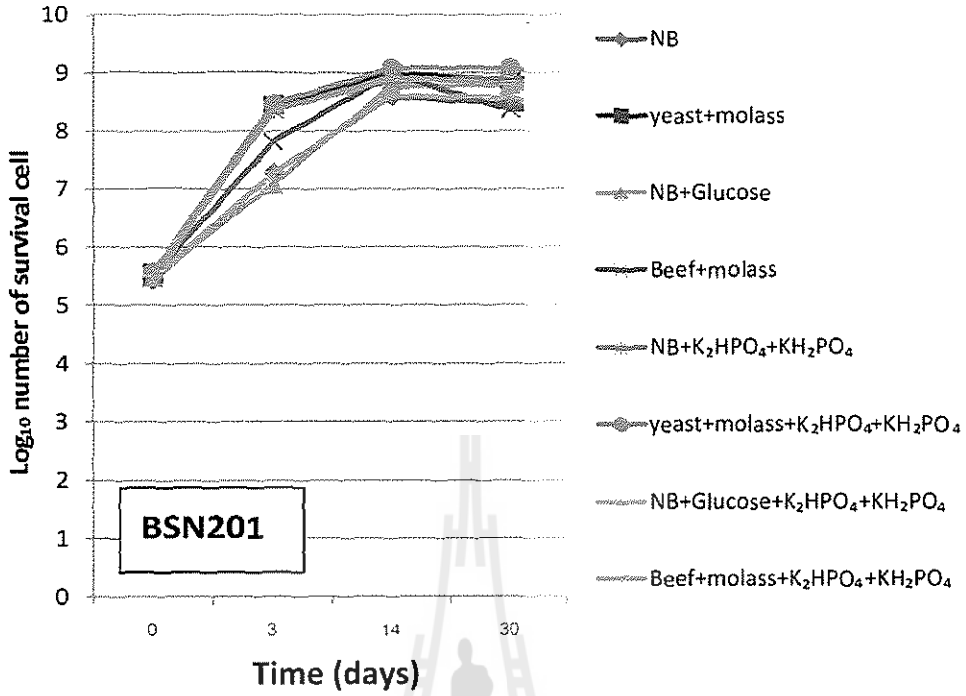


รูปที่ 3 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSD101 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

ผลการทดสอบในเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 พบว่าให้ผลแตกต่างจากที่ผ่านมา โดยสูตรอาหารที่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถส่งเสริมให้เชื้อ BSN301 มีการเจริญได้สูงที่สุดโดยมีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเจริญได้ 14 วัน อย่างไรก็ตามสูตรอาหารอื่น ๆ ก็ส่งผลให้เชื้อเจริญได้ดี และมีชีวิตอยู่รอดในระยะเวลา 30 วัน ได้ในจำนวนมากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4) สำหรับผลการทดสอบในเชื้อ *Bacillus* sp. BSN201 พบว่าสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่างคาร์บอนสามารถส่งเสริมให้เชื้อมีแนวโน้มการเจริญได้สูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ โดยการเติม yeast extract และการเติมสาร K_2HPO_4 + KH_2PO_4 สามารถช่วยให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้ในระยะ 30 วัน ในระดับที่มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สูตรอื่น ๆ มีปริมาณเซลล์ลดลงมา เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 วัน (รูปที่ 5)



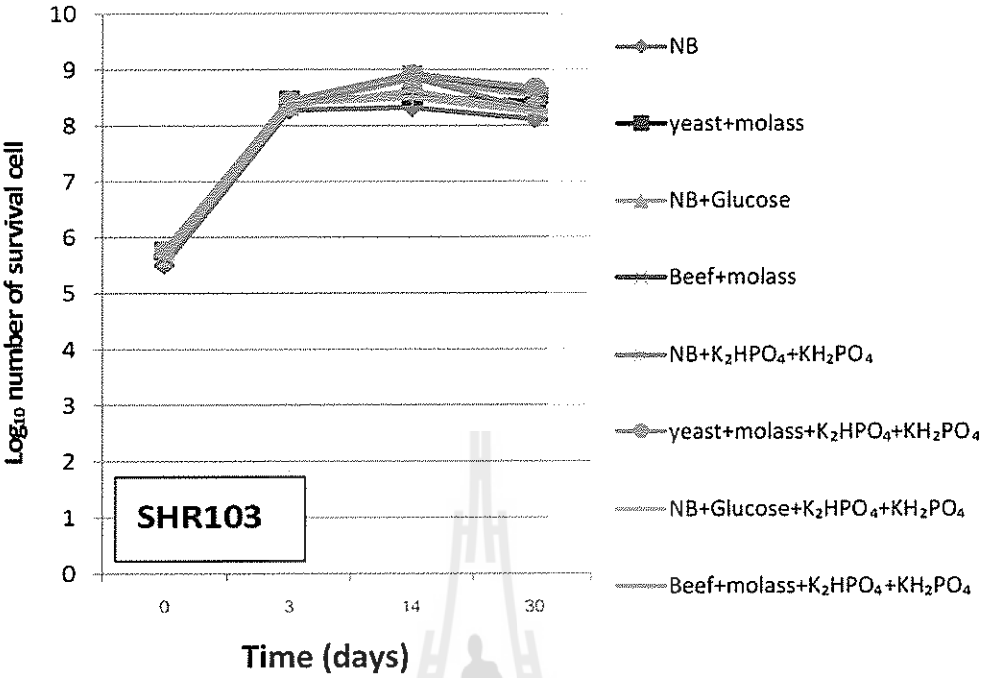
รูปที่ 4 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 ในอาหารสูตรต่าง ๆ



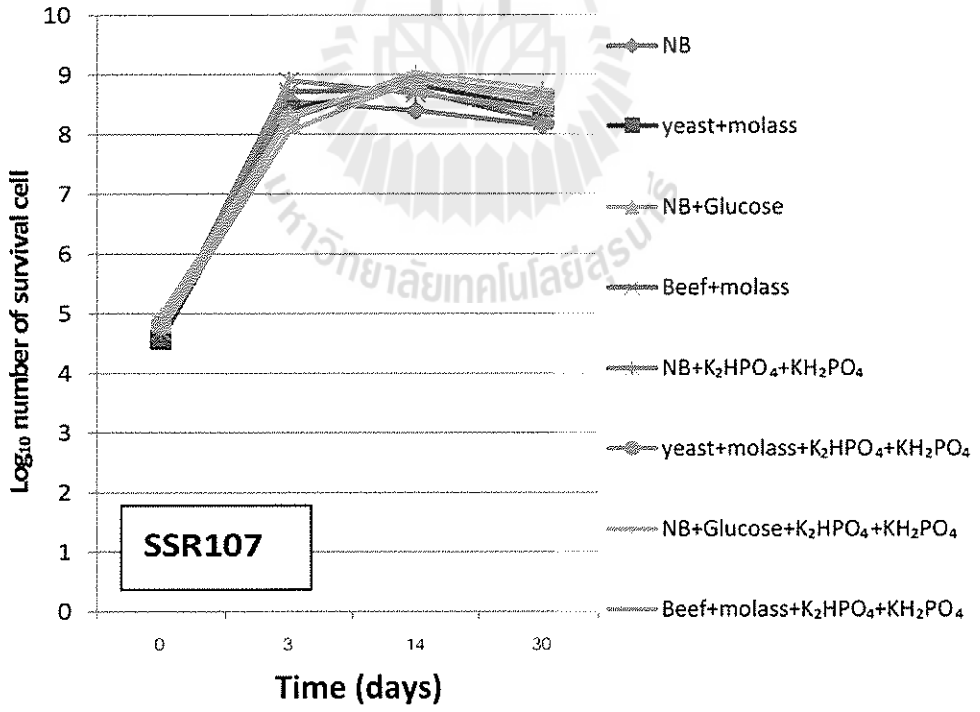
รูปที่ 5 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN201 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

สำหรับการทดลองในเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR103 พบว่าการใช้สูตรอาหาร yeast extract + molass สามารถส่งเสริมให้เชื้อเจริญได้สูงสุดถึง 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน (รูปที่ 6) ในขณะที่เมื่อทดสอบในเชื้อ *Streptomyces* sp. SSR107 พบว่าสูตรอาหาร NB + glucose+ K_2HPO_4 + KH_2PO_4 และสูตร yeast extract + molass + K_2HPO_4 + KH_2PO_4 สามารถส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญได้สูงถึง 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และพบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มลดลงเช่นกันเมื่อเก็บไว้นาน 30 วัน (รูปที่ 7)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบโดยส่วนใหญ่สามารถใช้สูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาล (molass) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเติมสาร K_2HPO_4 + KH_2PO_4 ที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ สามารถช่วยให้เชื้อมีการเจริญเติมโตได้ดีขึ้น โดยอาจช่วยปรับสภาวะความเป็นกรดด่างไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปตามสารเมทาบอไลท์ที่เชื้อผลิตออกมาระหว่างการเจริญ อย่างไรก็ตามเชื้อมีแนวโน้มลดปริมาณลงเมื่อเก็บไว้นาน 30 วัน ดังนั้นจึงใช้อาหารสูตรนี้เป็นสูตรอาหารพื้นฐานในการทดลองเพื่อหาสารที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาต่อไป



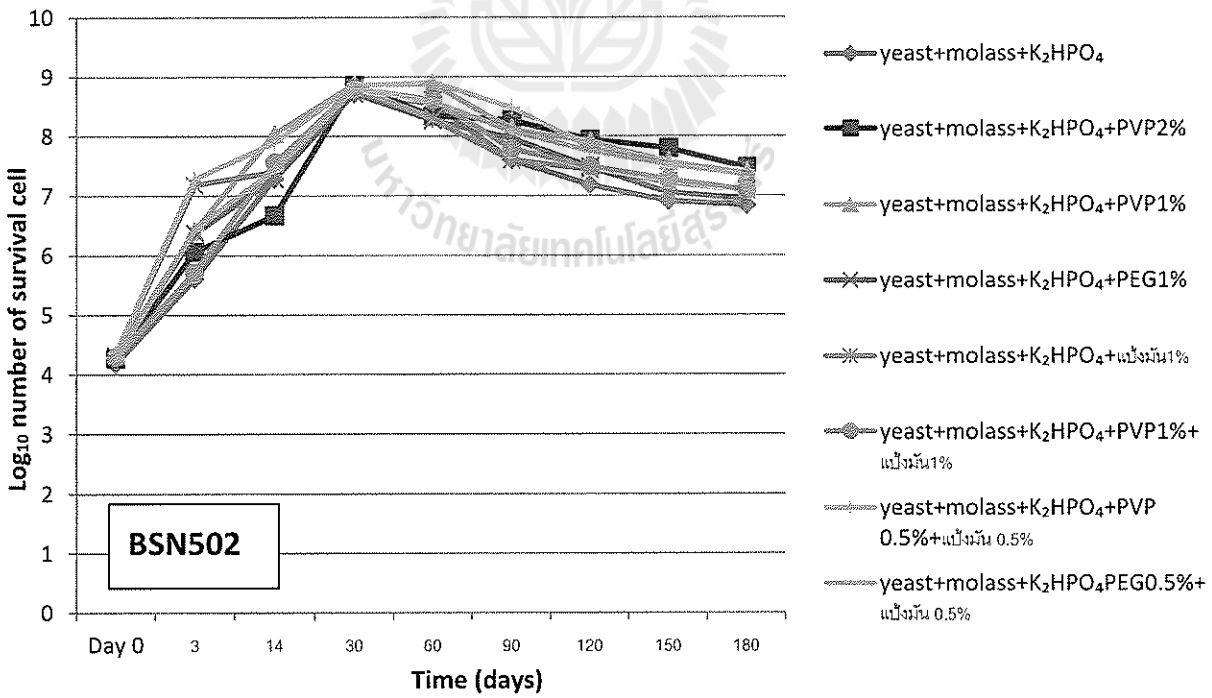
รูปที่ 6 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR103 ในอาหารสูตรต่าง ๆ



รูปที่ 7 การเจริญและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. SSR107 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

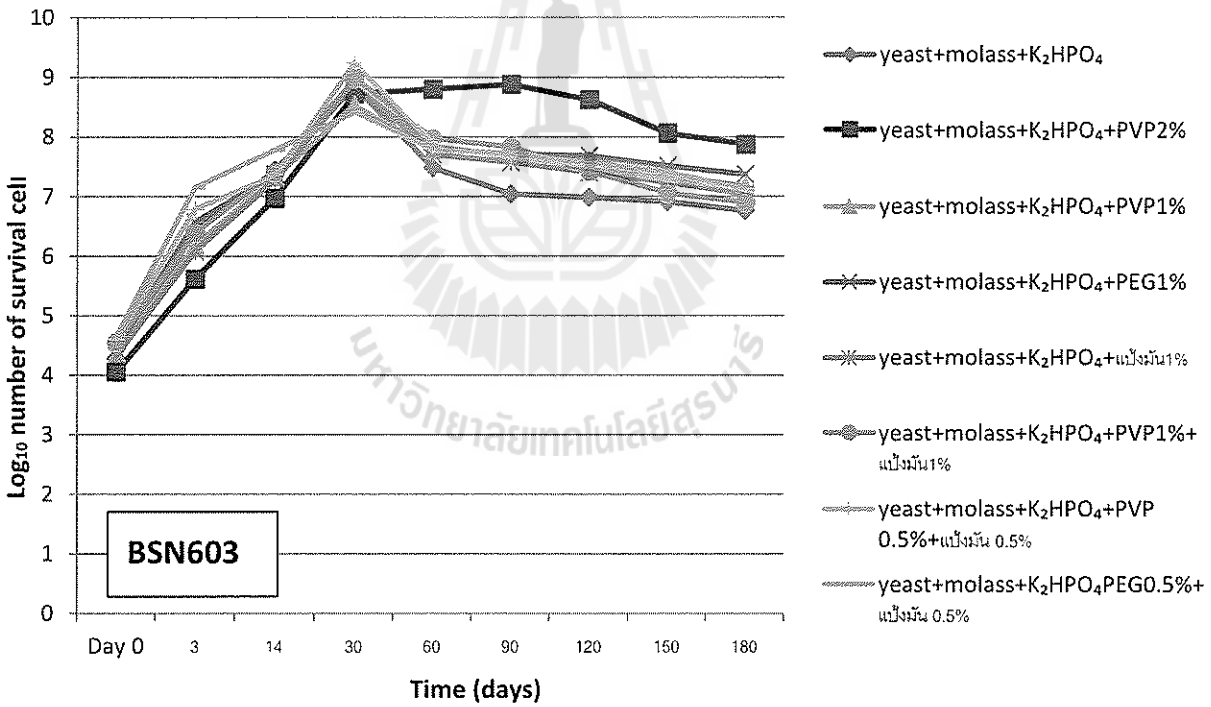
3.2 การทดสอบหาสูตรอาหารที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบบรรจุภัณฑ์สำหรับการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหารพื้นฐานที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ผ่านมา นำมาใช้ทดสอบการเสริมด้วยสารเคมีในกลุ่มพอลิเมอร์ เช่น Polyvinylpyrrolidone (PVP), Polyethylene glycol (PEG), แป้งมันสำปะหลัง เพื่อรักษาให้เชื้อมีอายุการเก็บรักษาที่ดีขึ้นโดยได้ทดสอบสูตรต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยทดสอบบรรจุในขวดพลาสติก Polyethylene ปริมาตรบรรจุ 200 มิลลิลิตร โดยผลของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่เมื่อเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ในอาหารสูตรต่าง ๆ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดตอบสนองต่อสารเคมีกลุ่มพอลิเมอร์ที่แตกต่างกันในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีอายุการเก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้องที่แตกต่างกัน โดยผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. BSN502 สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในระดับจำนวนเซลล์มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 90 วัน ในสูตรอาหารที่มีการเติมสารพอลิเมอร์ PVP 2% หรือการใช้ PVP 0.5% ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 0.5% และมีเพียงสูตรที่มีการเติม PVP 2% สามารถทำให้เชื้อ BSN502 มีอายุการเก็บรักษาได้เป็นเวลา 120 วัน ในระดับจำนวนเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สูตรอื่น ๆ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้เพียง 60 วัน (รูปที่ 8)



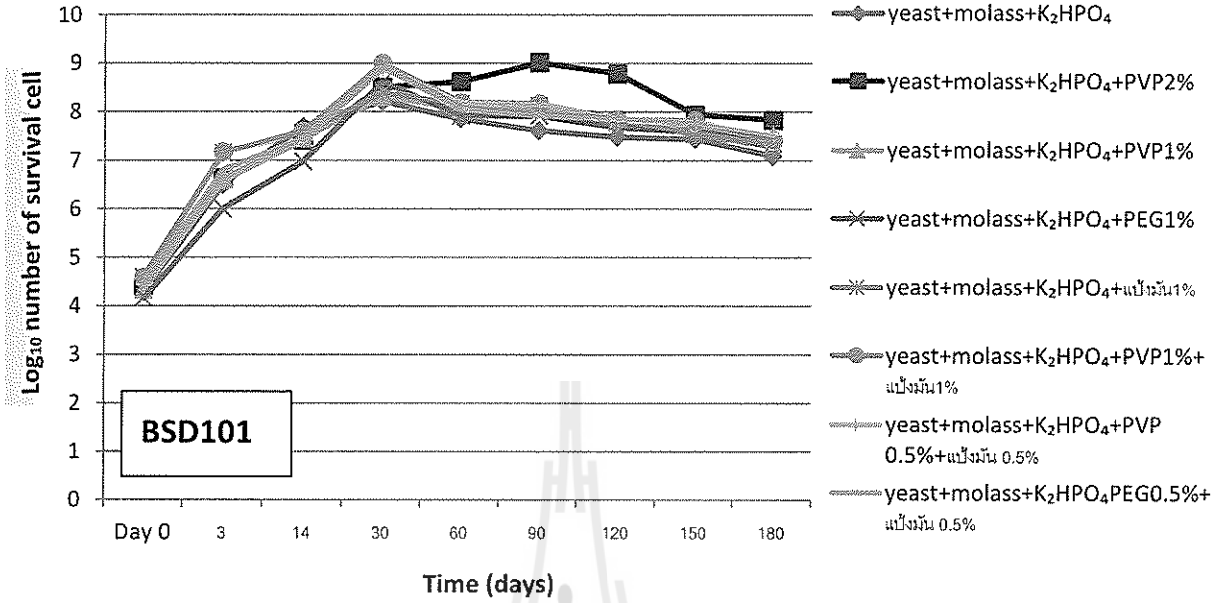
รูปที่ 8 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN502 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

ทั้งนี้สูตรอาหารที่มีการเติมพอลิเมอร์ PVP 2% ยังสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus* sp. BSN603 ได้นานถึง 150 วัน ในระดับจำนวนเซลล์มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สูตรอื่น ๆ พบระดับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงต่ำกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อมีอายุการเก็บรักษาได้ 60-90 วัน (รูปที่ 9) เช่นเดียวกับเชื้อ *Bacillus* sp. BSD101 สูตรอาหารที่มีการเติมพอลิเมอร์ PVP 2% สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของเชื้อได้นานถึง 150 วัน ในระดับจำนวนเซลล์มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 10) อย่างไรก็ตามในเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 พบว่าสูตรอาหารที่มีการเติมสารพอลิเมอร์ PVP 0.5% ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 0.5% และสูตรที่มีการเติมสาร PEG 1% สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานเพียง 90-120 วัน ในระดับจำนวนเซลล์มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 11) ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* sp. BSN201 มีเพียงสูตรอาหารที่เติมสาร PVP 1% ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 1% ที่สามารถรักษาจำนวนเซลล์ให้อยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาได้นาน 90-120 วัน (รูปที่ 12)

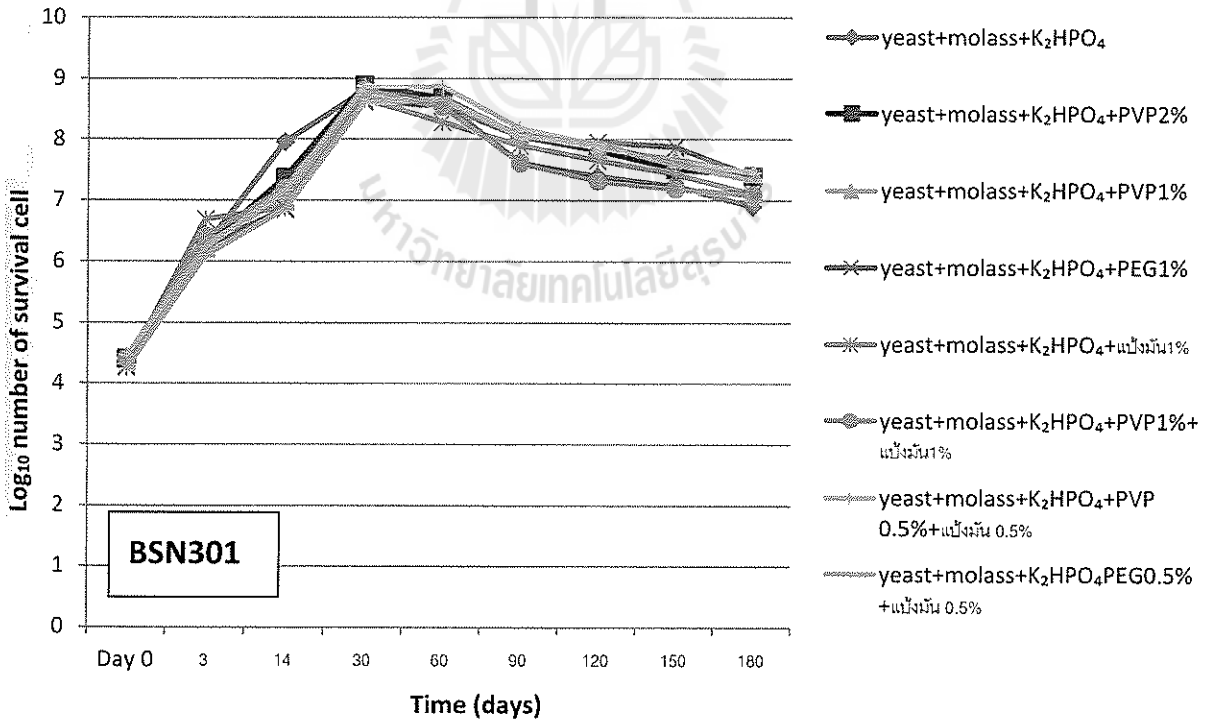


รูปที่ 9 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN603 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

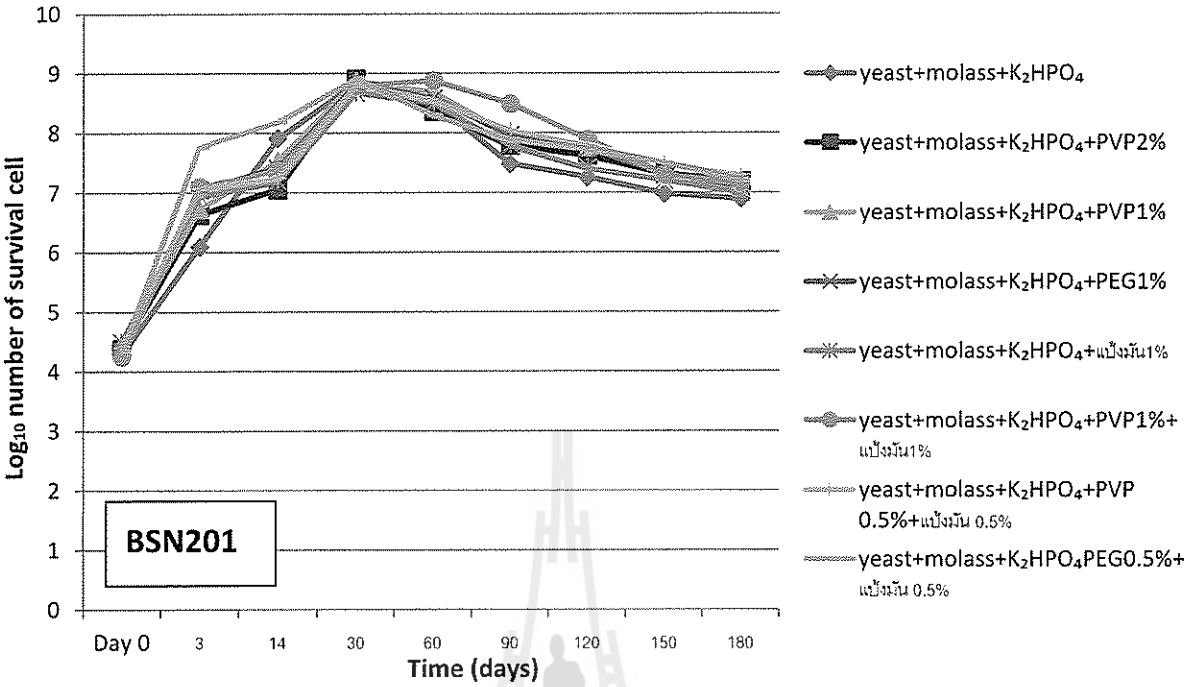
ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSD101 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

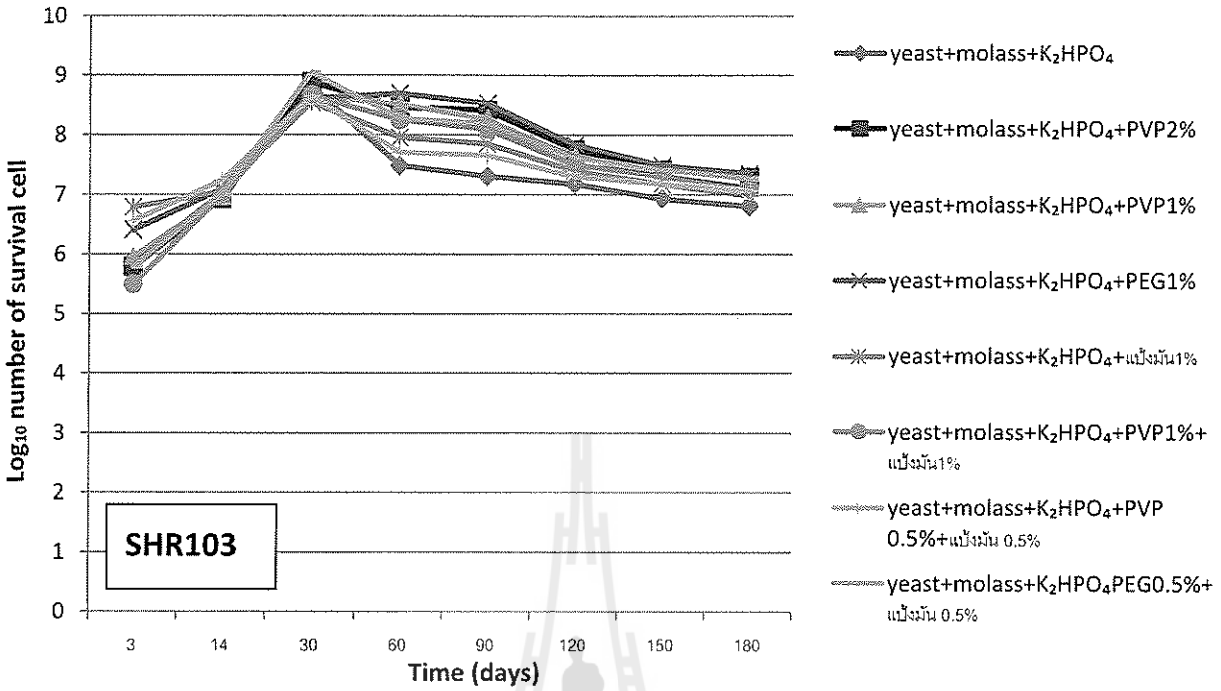


รูปที่ 11 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

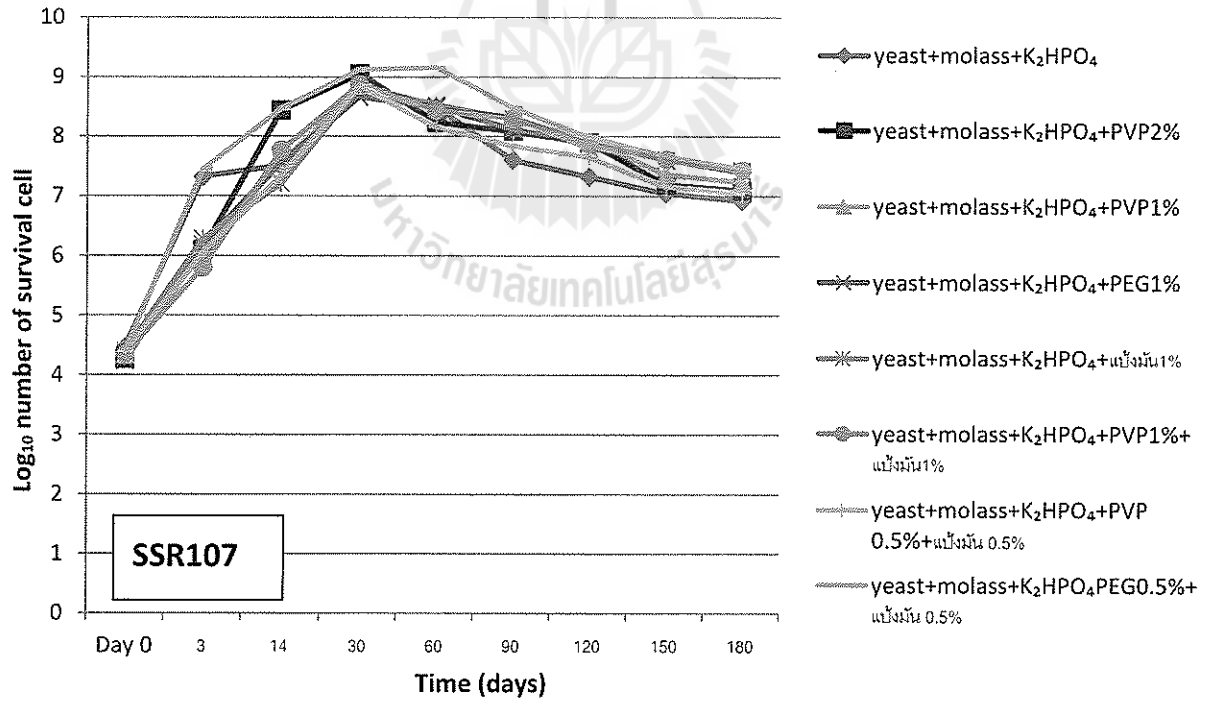


รูปที่ 12 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Bacillus* sp. BSN201 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

และเมื่อตรวจสอบผลในเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR103 พบว่าสูตรอาหารส่วนใหญ่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้เพียง 90 วัน โดยสูตรที่สามารถรักษาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้ในระดับสูงที่สุด คือ สูตรที่มีการเติมสาร PEG 1% (รูปที่ 13) ในขณะที่ผลการทดลองในเชื้อ *Streptomyces* sp. SSR107 สูตรที่มีการเติมสารพอลิเมอร์ PEG 0.5% ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 0.5% ให้ระดับของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่น ๆ และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นาน 90-120 วัน (รูปที่ 14)



รูปที่ 13 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR103 ในอาหารสูตรต่าง ๆ



รูปที่ 14 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. SSR107 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

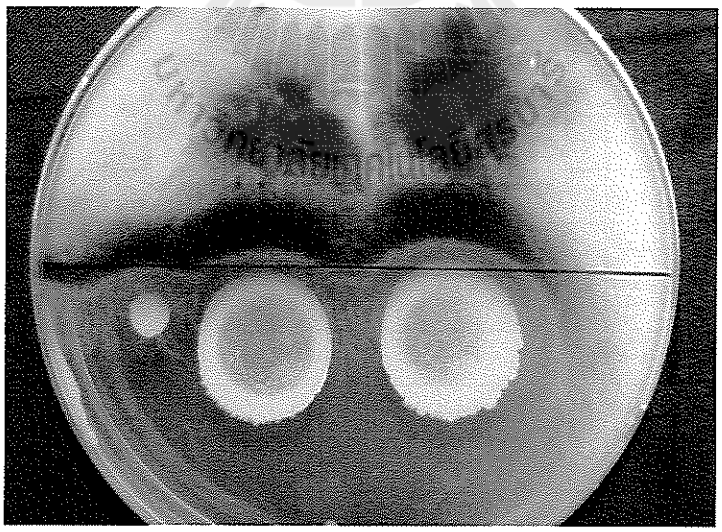
ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเติมสารเคมีในกลุ่มพอลิเมอร์ เช่น PVP, PEG หรือการใช้ร่วมกันกับ biopolymer เช่น แป้งมันสำปะหลัง สามารถช่วยรักษาให้เชื้อมีอายุการเก็บรักษาที่ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ดี ชนิดของสารเคมีที่ใช้และปริมาณ รวมทั้งอายุการเก็บรักษาจะแตกต่างกันไปในเชื้อแต่ละชนิด ทั้งนี้เคยมีรายงานการใช้สารพอลิเมอร์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อแบคทีเรียชนิดเหลวมาแล้ว ตามรายงานของ Singleton และคณะ (2002) และ Tittabutr และคณะ (2007) โดยพบว่าสาร PVP สามารถผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้เลี้ยงเชื้อ Bradyrhizobium ได้ตามปกติโดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียไม่สามารถใช้สารพอลิเมอร์เหล่านี้เป็นแหล่งพลังงานได้ อย่างไรก็ตามสารพอลิเมอร์เหล่านี้มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญและการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากสารเหล่านี้มีคุณสมบัติความเหนียว ซึ่งช่วยเพิ่มให้เซลล์แบคทีเรียยึดเกาะกับเมล็ดได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยให้เชื้อที่เคลือบอยู่บนเมล็ดพืชไม่แห้งเร็วจนเกินไปเมื่อนำไปใช้ในสภาพไร่ (Deaker et al., 2004) นอกจากนี้สาร PVP ยังมีค่า water binding capacity สูงจึงสามารถคงความชื้นโดยการยึดเกาะน้ำบริเวณรอบ ๆ เซลล์ได้มากขึ้น จึงทำให้เซลล์สามารถใช้น้ำในกระบวนการต่าง ๆ และยืดอายุการเก็บรักษาได้ ในขณะที่สารกลุ่ม PEG และแป้งมันสำปะหลัง มีคุณสมบัติความเหนียวเช่นกัน นอกจากนี้ยังสามารถยึดเกาะเซลล์เข้าไว้ด้วยกันโดยยังสามารถลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในรูปของ colloid ซึ่งทำให้อากาศที่อยู่ในอาหารสามารถเข้าถึงเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีขึ้นกว่าการที่เซลล์ตกตะกอนอยู่ด้านล่างของภาชนะบรรจุ ดังนั้นจึงอาจเป็นกลไกที่ทำให้เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่รอด และยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น นอกจากนี้ในส่วนของบรรจุภัณฑ์ที่นำมาทดสอบพบว่าขวดพลาสติกชนิด Polyethylene เป็นบรรจุภัณฑ์ที่สามารถใช้ในการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีคุณสมบัติในการยอมให้ก๊าซซึมผ่านได้ดี แต่ยอมให้ไอน้ำซึมผ่านได้น้อย ทนความเป็นกรดได้ปานกลาง นอกจากนี้ยังทนความร้อนได้ปานกลางทำให้สามารถนึ่งฆ่าเชื้อก่อนการบรรจุได้ และยังมีความเหมาะสมในการขนส่ง เนื่องจากมีน้ำหนักเบา และรับแรงกระแทกได้

3.3 การตรวจสอบคุณสมบัติของหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. และ *Colletotrichum* spp. ของเชื้อแบคทีเรียระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องทุก ๆ 1 เดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือน ควบคู่ไปกับการตรวจสอบอายุการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA แล้วตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังแสดงในรูปที่ 15 ทั้งนี้ผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. และ *Colletotrichum* spp. แสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ในกรณีการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. (ตารางที่ 3) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BSN502, *Bacillus* sp. BSN201 และเชื้อ *Streptomyces* sp. SSR107 เมื่อเก็บรักษาอยู่ในรูปหัวเชื้อนาน 1 เดือนพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราชนิดนี้น้อยลงกว่าเชื้อที่เตรียมใหม่ และเมื่อมีอายุการเก็บรักษาเพิ่มเป็น 2 เดือน พบว่าไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้เลย ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* sp. BSN603 และเชื้อ *Bacillus* sp. BSD101 ในเดือนแรกของการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ดี และความสามารถในการยับยั้งเชื้อราลดลงไปเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มเป็น 2-6 เดือน สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 พบว่าในเดือนแรกของอายุการเก็บรักษาเชื้อมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ดีมาก และระดับความสามารถในการยับยั้งเชื้อราลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มเป็น 2-6 เดือน แต่ยังคงอยู่ในระดับที่ดี ในขณะที่เชื้อ *Streptomyces* sp. SHR103 พบว่าเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. ได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งเชื้อราในระดับดีมาก แม้มีอายุการเก็บรักษา 6 เดือน และจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียต่ำกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

สำหรับความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ตารางที่ 4) เมื่อเก็บรักษาหัวเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่ามีเพียงเชื้อ *Bacillus* sp. BSN502 และเชื้อ *Streptomyces* sp. SSR107 ที่มีระดับความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้น้อยเมื่อมีอายุการเก็บรักษาเพียง 1 เดือน และพบว่าเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 2-6 เดือน ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เลย ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ในระดับดีมากแม้มีอายุการเก็บรักษานาน 6 เดือน



รูปที่ 15 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืชด้วยวิธี dual culture

ตารางที่ 3 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. เมื่อเก็บรักษาหัวเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน (- ยับยั้งไม่ได้, + ยับยั้งได้น้อย, ++ ยับยั้งได้ดี, +++ ยับยั้งได้ดีมาก)

เชื้อแบคทีเรีย	ระดับความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp.					
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6
BSN 502	+	-	-	-	-	-
BSN 603	++	+	+	+	+	+
BSD 101	++	+	+	+	+	+
BSN 301	+++	++	++	++	++	++
BSN 201	+	-	-	-	-	-
SHR 103	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SSR 107	+	-	-	-	-	-

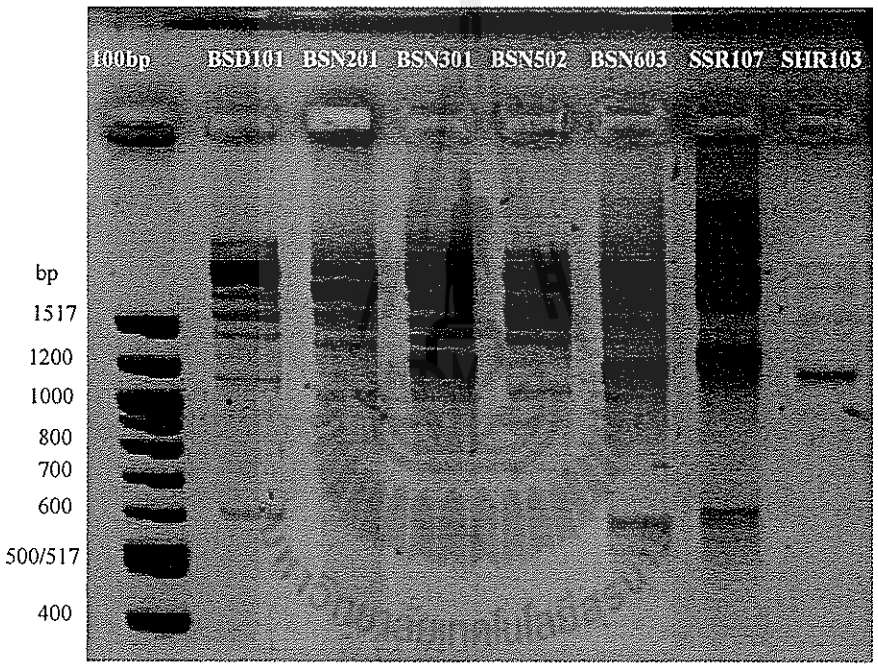
ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เมื่อเก็บรักษาหัวเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน (- ยับยั้งไม่ได้, + ยับยั้งได้น้อย, ++ ยับยั้งได้ดี, +++ ยับยั้งได้ดีมาก)

เชื้อแบคทีเรีย	ระดับความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp.					
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6
BSN 502	+	-	-	-	-	-
BSN 603	+++	+++	+++	+++	+++	++
BSD 101	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BSN 301	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BSN 201	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SHR 103	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SSR 107	+	-	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

จากการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยใช้เทคนิค BOX-PCR (รูปที่ 16) พบว่ามีรูปแบบของลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกัน โดยสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นลายพิมพ์ DNA นี้จะใช้เป็นสิ่งบ่งชี้ถึงความจำเพาะเจาะจงทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียทางการค้าที่ใช้ตรวจสอบได้ต่อไป



รูปที่ 16 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยใช้เทคนิค BOX-PCR

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้นำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชที่มีศักยภาพในการต่อยอดสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์จำนวน 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม *Bacillus* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ และเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* sp. จำนวน 2 สายพันธุ์ เพื่อนำมาพัฒนาสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการได้โดยมีต้นทุนในการผลิตต่ำ ซึ่งผลการทดลองพบว่าสูตรอาหาร Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม เป็นสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้ดีที่สุด โดยสามารถเพิ่มการเจริญให้อยู่ในระดับ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อพิจารณาต้นทุนการผลิตเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน (Nutrient Broth) พบว่ามีราคาต้นทุนที่ถูกกว่าถึง 28 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบการประเมินค่าใช้จ่ายในการผลิตเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน และสูตรที่พัฒนาแล้ว

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	ราคาวัตถุดิบ (บาทต่อกรัม)	ปริมาณที่ใช้ (กรัมที่ใช้ใน 1 ลิตร)	ราคา (บาทต่อลิตร)	ประเมินค่าใช้จ่ายรวม (บาทต่อลิตร)
Nutrient broth				
- Beef extract	33.215	3	99.64	188.14
- Peptone	17.7775	5	88.5	
สูตรที่พัฒนาใหม่				
- Molasses	0.000025	20	0.0005	
- yeast extract	12.77	0.5	6.385	6.69
- K_2HPO_4	0.405	0.05	0.020	
- KH_2PO_4	1.900	0.15	0.285	

เมื่อนำสูตรอาหารที่พัฒนาได้มาเป็นสูตรอาหารพื้นฐานในการทดสอบหาชนิดของสารพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความเหมาะสมของการใช้สารพอลิเมอร์ในการยืดอายุการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน โดยสามารถใช้สาร Polyvinylpyrrolidone (PVP) หรือ Polyethylene glycol (PEG) เพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับแป้งมัน

สำปะหลังสามารถยืดอายุการเก็บรักษาให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้นาน 90-120 วัน ณ อุณหภูมิห้อง โดยขวดบรรจุภัณฑ์ชนิด polyethylene ขนาด 250 มิลลิลิตร และบรรจุปริมาตร 200 มิลลิลิตร สามารถใช้ในการเก็บรักษาหัวเชื้อได้ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชตัวอย่าง พบว่ามีเพียงเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR 103 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. และเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ดีที่สุด แม้มีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนานถึงเดือนที่ 6 และรองมาคือเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้เมื่อเก็บอยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หัวเชื้อ ดังนั้นเชื้อทั้งสองชนิดนี้จึงมีศักยภาพในการนำไปผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไปโดยใช้สูตรอาหารที่มีราคาต้นทุนการผลิตต่ำ และมีอายุการเก็บรักษาได้อย่างน้อย 90 วัน โดยที่ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในระดับสูง

บรรณานุกรม

นันทกร บุญเกิด, หนึ่ง เตียอำรุง, กมลลักษณ์ เทียมไธสง. 2552. การพัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในเชิงธุรกิจ. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Deaker, R., Roughley, R.J., Kennedy, I.R., 2004. Legume seed inoculation technology-a review. Soil Biology and Biochemistry 36, 1275-1288.

Marques, A.S.A, Marchaison, A., Gardan L., Samson, R. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae-P. viridiflava* group. Genetics and Molecular Biology, 31, 1, 106-115.

Singleton, P., Keyser, H., Sande, E., 2002. Development and evaluation of liquid inoculants. Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. ACIAR, Canberra, 52-66.

Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., Boonkerd, N., 2005. Cassava as a cheap source of carbon for rhizobial inoculant production using an amylase-producing fungus and a glycerol-producing yeast. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21, 823-829.

Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., Singleton, P.W., Boonkerd, N., 2007. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. Science Asia 33, 69-77.

ประวัตินักวิจัย

ดร. หนึ่ง เตียอำรุง เป็นศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระดับปริญญาโท จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระดับปริญญาเอก จาก University of Innsbruck ประเทศออสเตรีย ความเชี่ยวชาญงานวิจัยทางด้าน Molecular Biology, Microbiology, Nitrogen fixing bacteria และด้านปุ๋ยชีวภาพ ตัวอย่างงานวิจัยที่ผ่านมา

Watanarojanaporn, N., Longtonglang, A., Boonkerd, N., Tittabutr, P., Lee, J., Teaumroong, N. (2014). Biases for detecting arbuscular mycorrhizal fungal mixture by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 30(1): 77-86.

N. Watanarojanaporn, N. Boonkerd, P. Tittabutr, A. Longtonglang, P. W. Young, N. Teaumroong* (2013). Effect of rice cultivation systems on indigenous arbuscular mycorrhizal fungal community structure. Microbes Environ. 28(3): 316-324.

R. Noisangiam, K. Teamtisong, P. Tittabutr, N. Boonkerd, U. Toshiki, K. Minamisawa and N. Teaumroong* (2012). Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. Appl. Environ. Microbiol. 78: 6236-6250.

Piromyou, P., B. Buranabanyat, P. Tantasawat, P. Tittabutr, N. Boonkerd, and N. Teaumroong*. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. European Journal of Soil Biology, 47(1): 44-54.

ประวัตินักวิจัยร่วม

ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร เป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี และระดับปริญญาเอก จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ความเชี่ยวชาญงานวิจัยทางด้าน Nitrogen fixing bacteria, Plant Growth Promoting Rhizobacteria และด้านการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพ ตัวอย่างงานวิจัยที่ผ่านมา

W. Yuttavanichakul, P. Lawongsa, S. Wongkaew, N. Teaumroong, N. Boonkerd, N. Nomura, P. Tittabutr*. (2012). Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, Aspergillus niger. Biological Control. 63: 87-97.

P. Tittabutr, K. Teamthisong, B. Buranabanyat, N. Teaumroong, N. Boonkerd* (2012). Gamma irradiation and autoclave sterilization peat and compost as the carrier for rhizobial inoculant production. Journal of Agricultural Science. 4: 59-64.

P. Tittabutr*, P. Piromyou, A. Longtonglang, R. Noisa-ngiam, N. Boonkerd, and N. Teaumroong. (2013). Alleviation of the effect of environmental stresses using co-inoculation of mungbean by bradyrhizobium and rhizobacteria containing stress induced ACC deaminase enzyme. Soil Science and Plant Nutrition. 59(4): 559-571.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี