



การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันเพื่อควบคุมเชื้อ
Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

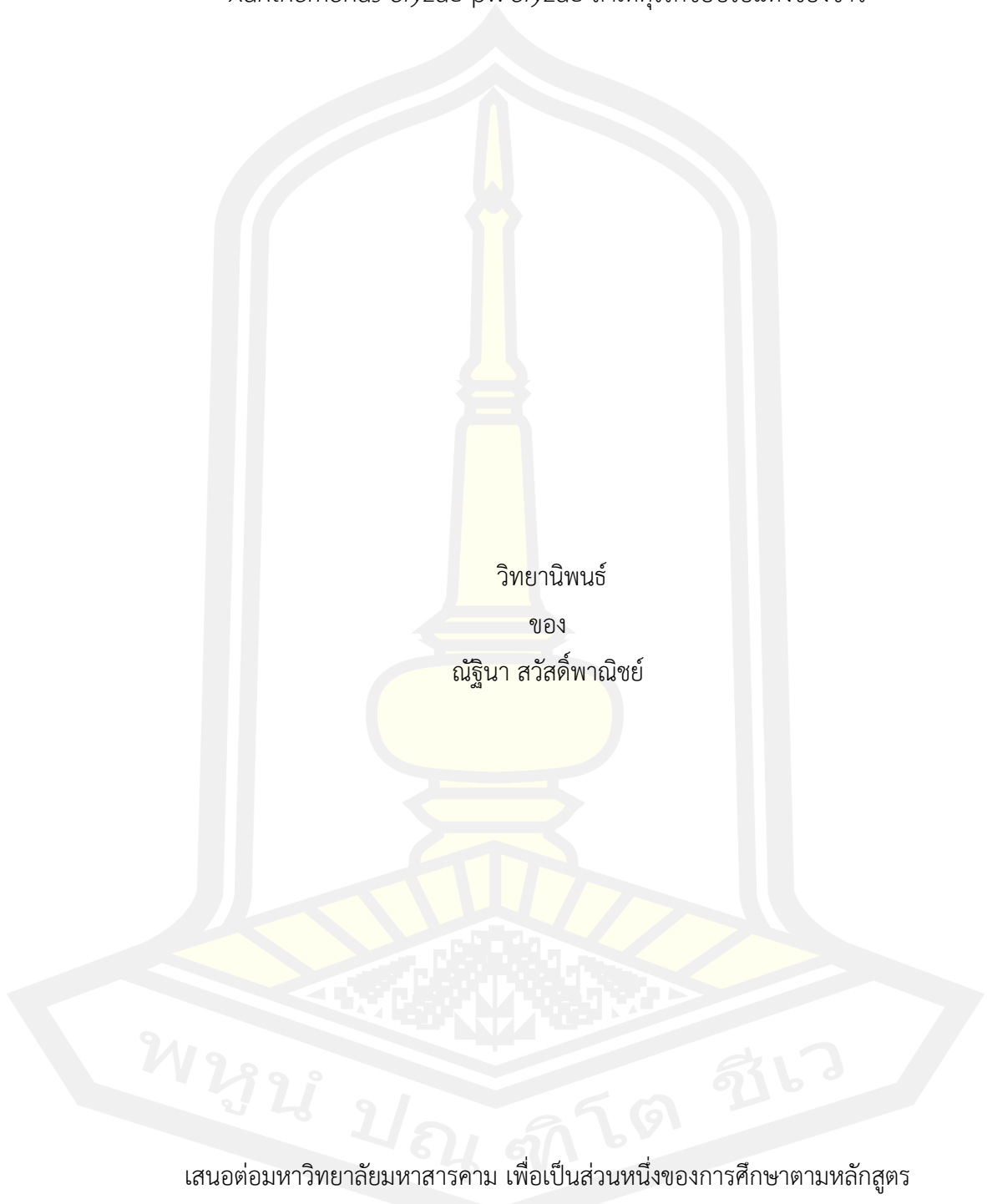
วิทยานิพนธ์
ของ
ณัฐนา สวัสดิ์พานิชย์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

กันยายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันเพื่อควบคุมเชื้อ
Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว



เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

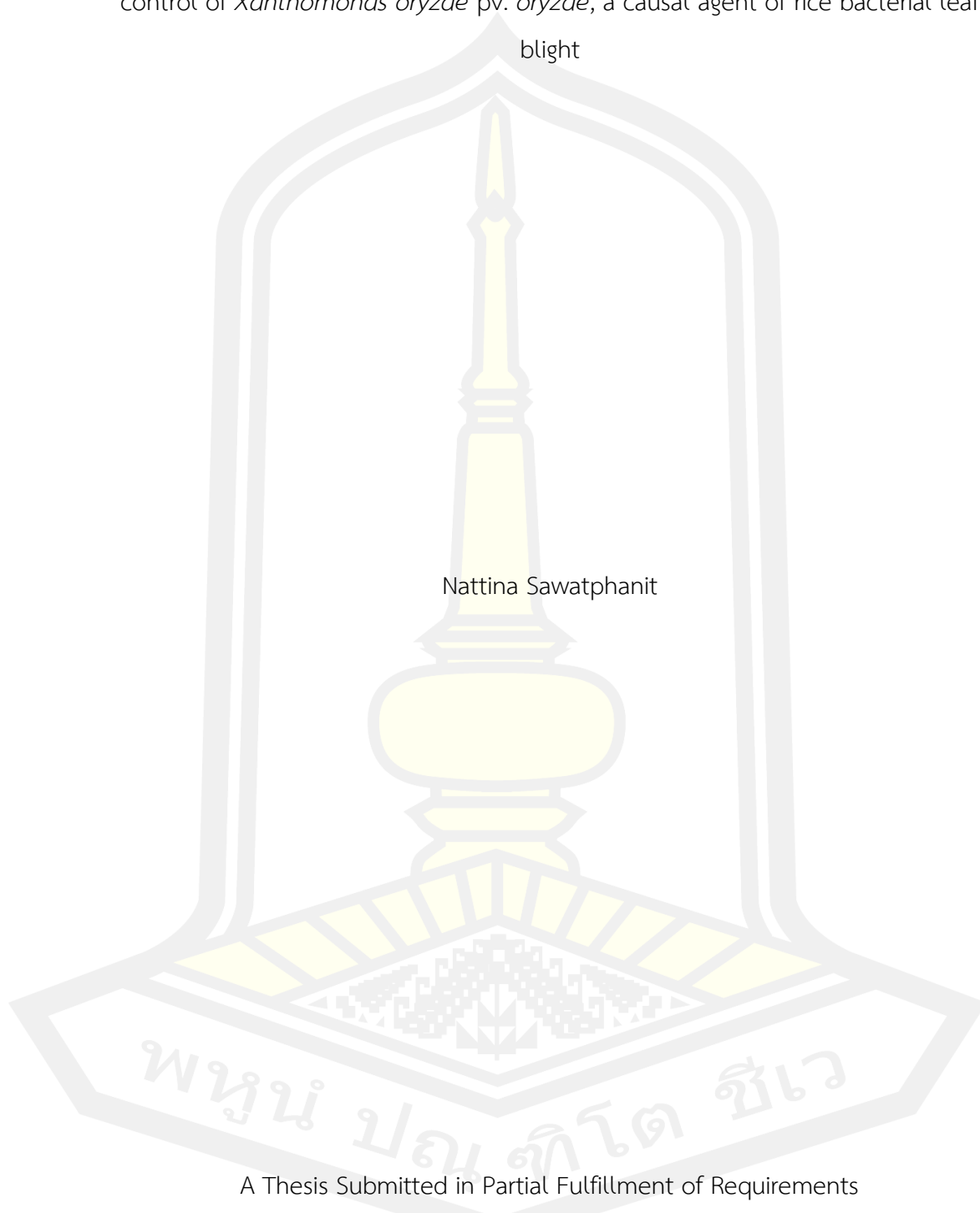
กันยายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Development of *Bacillus* spp. bio-product using microencapsulation technique for control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, a causal agent of rice bacterial leaf

blight

Nattina Sawatphanit



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Microbiology)

September 2021

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวณัฐริษา สวัสดิ์พาศิษย์ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. วุทธิวัฒน์ จิตจักร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. วราภรณ์ สุทธิสา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. ตันติมา กำลิ่ง)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร. อรุมา แก้วกล้า)

.....กรรมการ

(ดร. สุรศักดิ์ ชันคำ)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาชีวภัณฑ์ <i>Bacillus</i> spp. ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันเพื่อควบคุมเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว		
ผู้วิจัย	ณัฐนา สวัสดิ์พาณิชย์		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ สุทธิสา ดร. ตันติมา กำลัง		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2564

บทคัดย่อ

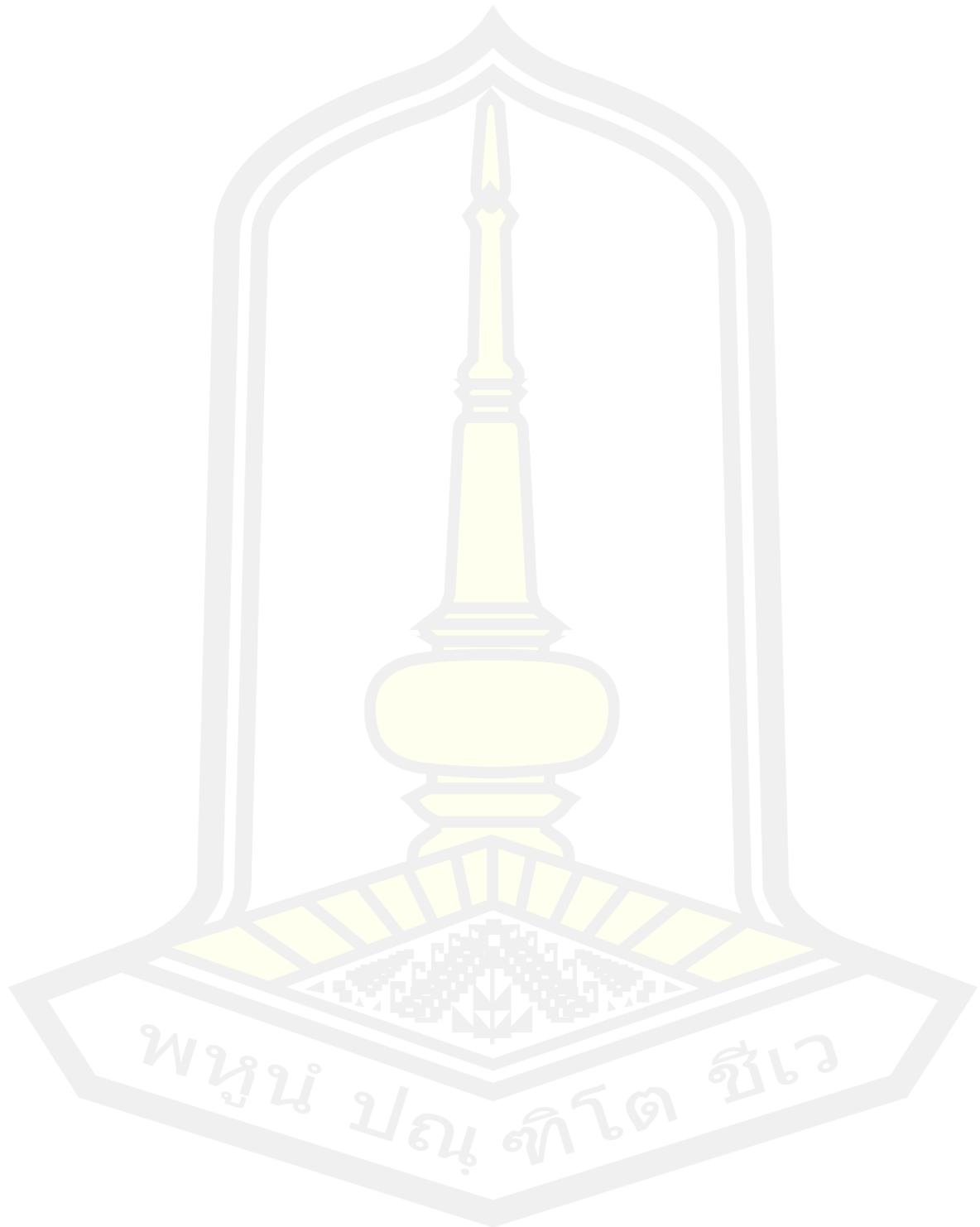
โรคขอบใบแห้งของข้าวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) เป็นโรคที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของข้าว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและนำไปพัฒนาชีวภัณฑ์ จากการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลต ในการยับยั้งเชื้อ Xoo ด้วยวิธี agar plate inhibition assay พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อ Xoo ได้ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 มีความสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้สูงสุด มีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.73 ± 0.15 เซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลตอื่น ๆ จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพของในการยับยั้งเชื้อ Xoo ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต N1 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคสูงสุด มีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 4.76 ± 1.53 เซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 สามารถทนต่อสารเคมีทางการเกษตรประเภทกลุ่มกำจัดวัชพืช ได้แก่ อะมิโก้ (amigo) ปีม 75WP (beam WP75) กรีนไต้ฟ 500EC (greendive 500EC) โอเมย์ซิน (omycin) และไทแบค (thibac) กลุ่มกำจัดวัชพืช ได้แก่ คลอแรค (clorac) เลวินเอฟ (levin F) กลุ่มกำจัดแมลง ได้แก่ โปรวาโด (provado) ยกเว้นสารเคมีกำจัดวัชพืชพาราควอต (paraquat) การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสดในการยับยั้งเชื้อ Xoo ในพืชทดสอบ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุด มีดัชนีการยับยั้งโรคสูงสุดเท่ากับ 65.08 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth 4 สูตร ภายใต้สภาวะเขย่า ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรจะมีความเข้มข้นของซูโครสแตกต่างกัน คือ 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth สูตรที่ 2 ที่มีองค์ประกอบของซูโครส 20 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.36 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์และเอนโดสปอร์สูงสุดเท่ากับ 1.32×10^9 CFU/มิลลิลิตร และ 3.09×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จึงพิจารณาเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth + ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์

การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูลเขย่า ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย จำนวน 3 สูตร พบว่าชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรที่ 3 (skim milk 10 เปอร์เซ็นต์, maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์, sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์ และแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์) มีความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยสูงสุดเท่ากับ 1.24×10^7 CFU/กรัม ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลง 1.68 Log CFU/กรัม หลังจากเก็บรักษาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ สูตรที่ 2 (skim milk 10 เปอร์เซ็นต์, maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์, sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์ และแป้งข้าวโพด 5 เปอร์เซ็นต์) มีจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงสุดเท่ากับ 1.44×10^6 CFU/กรัม ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลง 0.61 Log CFU/กรัม การศึกษาลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าอนุภาคของชีวภัณฑ์มีลักษณะกลมมีทั้งแบบผิวเรียบและหยาบผิวขรุขระ

เมื่อนำชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Xoo* ในพืชทดสอบ พบว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 สามารถควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดี โดยมีดัชนีการยับยั้งโรคสูงสุดเท่ากับ 45.87 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคขอบใบแห้งของข้าวสามารถนำมาพัฒนาชีวภัณฑ์ใช้ในการควบคุมโรคได้ ซึ่งเป็นทางเลือกให้กับเกษตรกรในการควบคุมคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมได้

คำสำคัญ : โรคขอบใบแห้งของข้าว, แบคทีเรียปฏิปักษ์, ชีวภัณฑ์, การทำแห้งแบบพ่นฝอย



TITLE	Development of <i>Bacillus</i> spp. bio-product using microencapsulation technique for control of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , a causal agent of rice bacterial leaf blight		
AUTHOR	Nattina Sawatphanit		
ADVISORS	Assistant Professor Waraporn Sutthisa , Ph.D. Tantima Kumlung , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Microbiology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2021

ABSTRACT

Rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) is a major problem that decreases the yield and quality of rice. The objectives of this research are (1) to search for antagonistic bacteria that inhibit the development of rice bacterial leaf blight disease and (2) to develop bio-products to control *Xoo*. Fifteen isolates of antagonist bacteria against *Xoo* were identified using an agar plate inhibition assay. Five of these isolates were able to inhibit *Xoo*. Isolate N1 appeared to be the most effective with an inhibition zone of 1.73 ± 0.15 cm, which is statistically significantly larger than the inhibition zones of other isolates in this study. The efficacy of isolate N1 against *Xoo* was tested by paper disc diffusion method, showing that had the highest inhibition ability with an inhibition zone of 4.76 ± 1.53 cm, which was significantly larger than that of the control. Morphological and 16S rRNA sequence data indicated that the antagonist bacteria of isolate N1 are closely related to *Bacillus velezensis* and are resistant to (1) the pesticides Amigo, Beam 75WP, Greendive 500EC, Omycin and Thibac; (2) the herbicides Clorac and Levin Fand; and (3) the insecticides Provado, but not Paraquat. The best inhibition of rice bacterial leaf blight was obtained with fresh isolate N1 cells, yielding a disease reduction index of 65.08%.

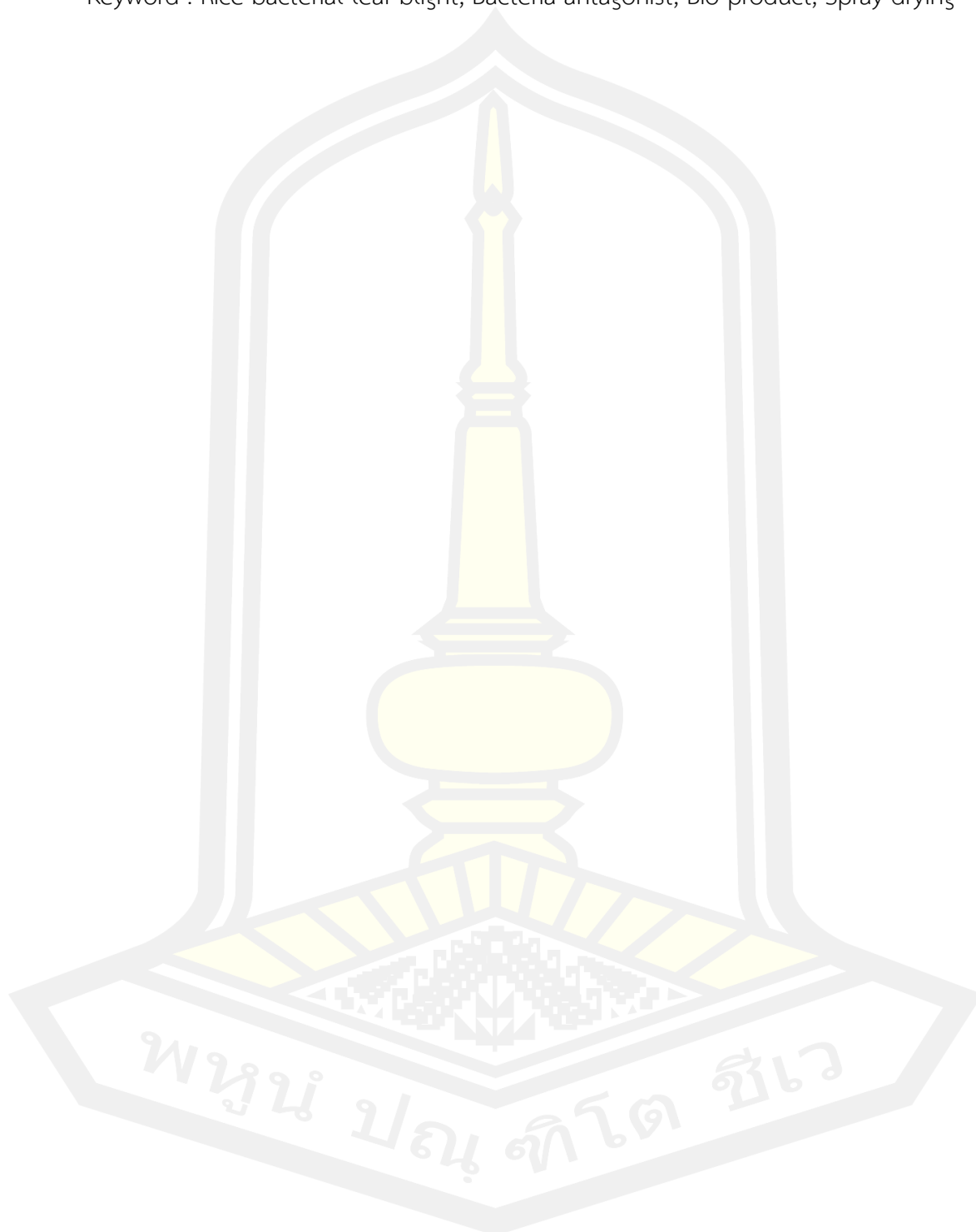
In order to find the most optimal culture medium for the growth and

endospore production of isolate N1 bacteria, four modified nutrient broth media in shake flasks were compared, each with different sucrose concentrations ranging from 10 to 40 g/L. The results showed that after 96 hours of incubation, the modified nutrient broth culture medium containing 20 g/L of sucrose had a maximum dry cell weight of 2.36 g/L, a maximum cell production of 1.32×10^9 CFU/mL, and a maximum endospore production of 3.09×10^6 spore/mL. Therefore, this modified nutrient broth medium with 20 g/L sucrose was selected to cultivate isolate N1 for the development of bio-products.

For the further development of isolate N1 for bio-products, three different formulae were tested using microencapsulation technique through a spray drying process. This showed that formula 3 (10% skim milk, 20% maltodextrin, 0.06% sodium alginate, and 5% tapioca starch) yielded the highest antagonistic bacterial viability after spray drying of 1.24×10^7 CFU/g with decreased of 1.68 Log CFU/g. After storage at room temperature for three months it appeared that formula 2 (10% skim milk, 20% maltodextrin, 0.06% sodium alginate, and 5% corn starch) showed the highest survival of antagonistic bacteria with 1.44×10^6 CFU/g with decreased of 0.61 Log CFU/g. The morphological characteristic of the isolate N1 bacteria in the bio-product were studied by scanning electron microscopy. This revealed that in the three formulae, the antagonistic bacteria had a spherical shape with both smooth and wrinkled surfaces.

Among the three formulae of isolate N1 bacteria against *Xoo*, formula 2 was able to control rice bacterial leaf blight disease with the highest disease reduction index (45.87%). In conclusion, this research shows that antagonistic bacteria can be effective against rice bacterial leaf blight disease and can be used to develop bio-products for disease control. As such, this opens the possibility for agriculturists to control the quantity and quality of their rice production in an environmental-friendly condition.

Keyword : Rice bacterial leaf blight, Bacteria antagonist, Bio-product, Spray drying



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณบุคคลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือด้านวิชาการทำให้งานวิจัยดำเนินการสำเร็จเป็นอย่างดี อันได้แก่

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนจากโครงการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับโท-เอก ระหว่างสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กับสถาบันการศึกษา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์วราภรณ์ สุทธิสา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความเมตตาอบรมสั่งสอนทั้งความรู้และการดำเนินชีวิต ช่วยเหลือเอาใจใส่เป็นอย่างดี คอยติดตามการทำงานอยู่เสมอ และตรวจสอบวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.ต้นติมา กำลิ่ง นักวิจัยอาวุโส สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้มอบโอกาสและประสบการณ์ในการทำงานวิจัย พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ความรู้ และการช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบพระคุณท่านผู้ทรงคุณวุฒิและคณะกรรมการทั้งในการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์และการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้กรุณาใช้เวลาอันมีค่าเพื่อดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบและให้คำแนะนำ ให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ได้เมตตาสั่งสอนและมอบวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณบุคลากรศูนย์เครื่องมือกลางคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยมหาสารคามทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่อบรมสั่งสอน คอยดูแลเอาใจใส่ ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ สนับสนุนทางด้านการศึกษา และเป็นกำลังใจสำคัญให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ณัฐนา สวัสดิ์พาณิชย์

สารบัญ

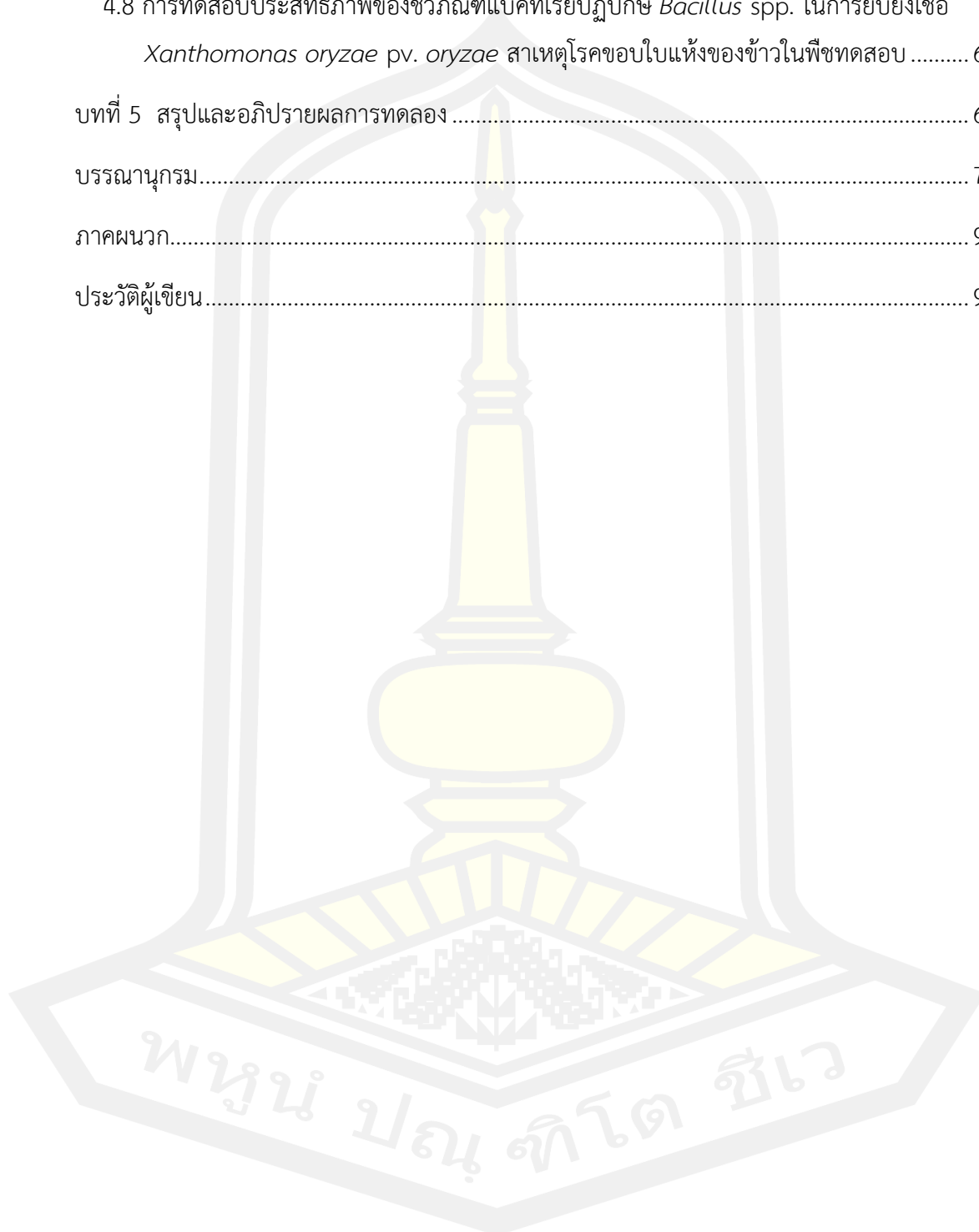
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ช
กิตติกรรมประกาศ.....	ญ
สารบัญ.....	ฎ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ปรัชศน์เอกสารข้อมูล.....	4
2.1 ที่มาและความสำคัญของข้าว.....	4
2.2 การเจริญเติบโตของข้าว.....	4
2.2.1 ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative growth phase).....	4
2.2.2 ระยะการเจริญเติบโตทางด้านการสืบพันธุ์ (reproductive growth phase).....	6
2.3 พันธุ์ข้าว.....	7
2.3.1 พันธุ์ข้าวไวต่อช่วงแสง หรือข้าวไวแสง (photoperiod sensitive varieties).....	7
2.3.2 พันธุ์ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง หรือข้าวไม่ไวแสง (insensitive varieties).....	8

2.4 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรค ขอบใบแห้งของข้าว	8
2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ...	9
2.4.2 ลักษณะอาการของโรคขอบใบแห้งของข้าว.....	9
2.4.3 การแพร่ระบาดและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งเสริมการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าว ..	10
2.4.4 การควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว	11
2.5 การควบคุมโดยชีววิธี (biological control หรือ biocontrol).....	15
2.6 กลไกการควบคุมโดยชีววิธี (mechanisms of biological control).....	15
2.6.1 การแข่งขัน (competition).....	15
2.6.2 การสร้างสารยับยั้งหรือสารปฏิชีวนะ (antibiosis).....	15
2.6.3 การเป็นปรสิต (parasitism).....	17
2.6.4 การชักนำระบบการต้านทานของพืช (induction of systemic resistance in plant)	17
2.7 ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์.....	17
2.7.1 รูปแบบของชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์.....	18
2.7.1.1 แบบแห้ง (dry formulation)	18
2.7.1.2 แบบน้ำ (liquid formulations)	19
2.8 การพัฒนาชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน	19
2.8.1 วัสดุสำหรับการผลิตชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน	21
2.8.2 วิธีการผลิตไมโครเอนแคปซูเลชัน.....	25
2.8.2.1 วิธีเอ็กซ์ทรูชัน (extrusion)	25
2.8.2.2 วิธีการอิมัลซิฟิเคชัน (emulsification).....	25
2.8.2.3 วิธีการโคอะเซอร์เวชัน (coacervation).....	26
2.8.2.4 วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying).....	27

2.9 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.	28
2.9.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี และลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.	29
2.9.2 ความสำคัญของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการควบคุมโรคพืช.....	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	35
3.1 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว	35
3.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ.....	36
3.2.1 การทดสอบด้วยวิธี agar plate inhibition assay	36
3.2.2 การทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion.....	37
3.3 การจัดทำแผนชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	38
3.4 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ...	39
3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. รูปแบบเชื้อสดในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ ...	40
3.6 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp.	41
3.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp.	41
3.6.2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	41
3.6.3 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp.	42
3.7 การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน	43
3.7.1 การคัดเลือกองค์ประกอบสารพาที่เหมาะสมต่อการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์	43
3.7.2 การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย	43

3.7.3 การประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์.....	45
3.7.4 ศึกษาลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์.....	45
3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ.....	45
บทที่ 4 ผลการทดลอง	47
4.1 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว	47
4.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ.....	48
4.2.1 การทดสอบด้วยวิธี agar plate inhibition assay	48
4.2.2 การทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion.....	49
4.3 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	51
4.4 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp... ..	54
4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. รูปแบบเชื้อสดในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ	55
4.6 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp.....	56
4.6.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์	56
4.6.2 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์.....	57
4.7 การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน.....	59
4.7.1 การคัดเลือกองค์ประกอบสารพาที่เหมาะสมต่อการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์.....	59
4.7.2 การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย	60
4.7.3 การประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์.....	62

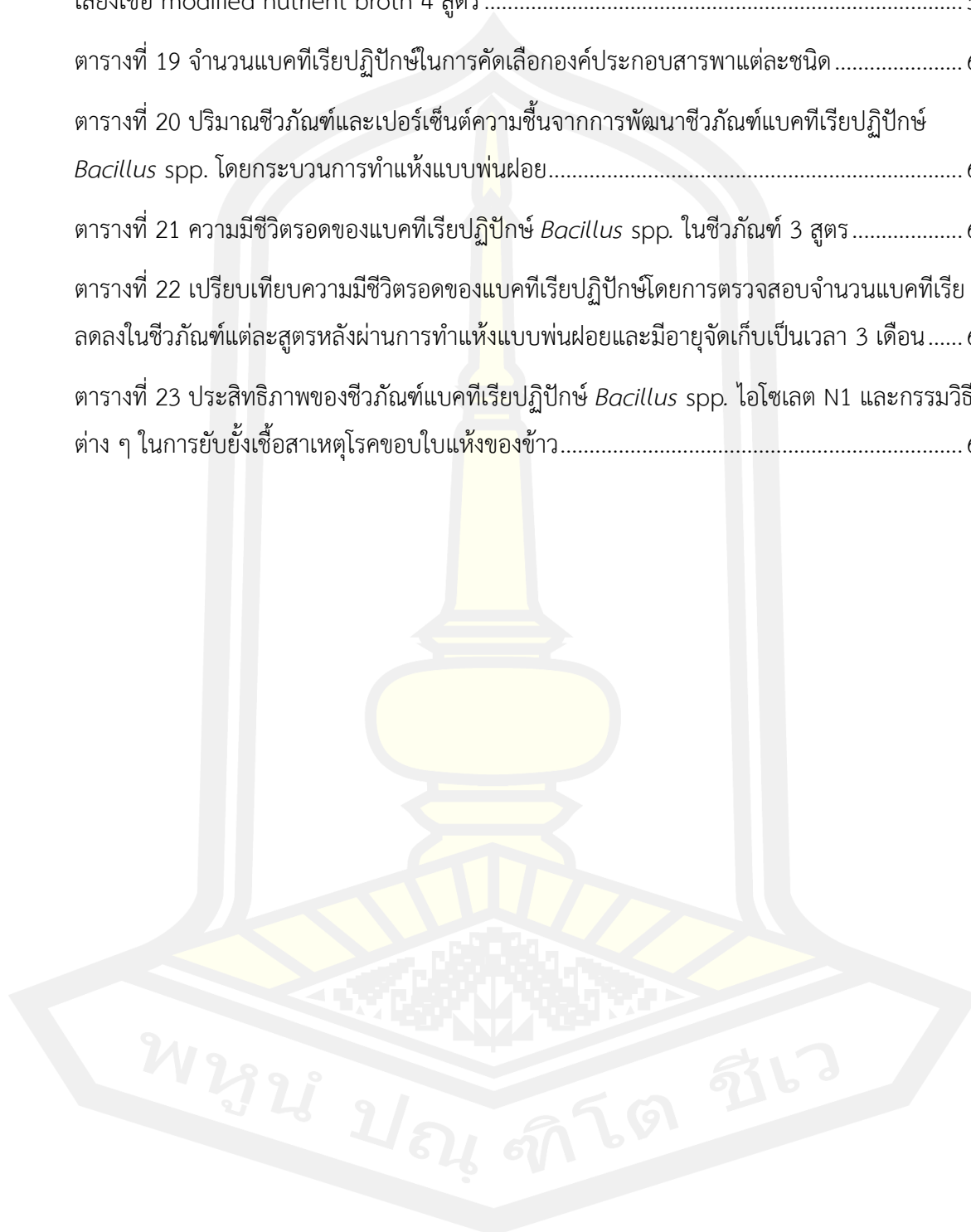
4.7.4	ศึกษาลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์.....	63
4.8	การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ.....	65
บทที่ 5	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	67
	บรรณานุกรม.....	76
	ภาคผนวก.....	94
	ประวัติผู้เขียน.....	98



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การศึกษาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว	13
ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะควบคุมโรคพืช	16
ตารางที่ 3 โพลีเมอร์ทั่วไปที่ใช้ในเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชั่นของเซลล์จุลินทรีย์	22
ตารางที่ 4 คุณสมบัติที่แตกต่างของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.....	31
ตารางที่ 5 สารชีวภัณฑ์ทางการค้าจากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.....	34
ตารางที่ 6 ระดับอาการการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าว	35
ตารางที่ 7 สภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal cycle	38
ตารางที่ 8 สารเคมีทางการเกษตรและอัตราแนะนำที่ใช้ในการทดสอบ	39
ตารางที่ 9 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์.....	42
ตารางที่ 10 องค์ประกอบและอัตราส่วนของสารพาแต่ละชนิด.....	43
ตารางที่ 11 องค์ประกอบและอัตราส่วนในสูตรชีวภัณฑ์.....	44
ตารางที่ 12 ความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวเมื่อทดสอบกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 21 และ 28 วัน.....	47
ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธี agar plate inhibition assay.....	49
ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวใน ระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion.....	50
ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสดและกรรมวิธีต่าง ๆ ใน การยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว.....	55
ตารางที่ 16 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. จากการเพาะเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth จำนวน 4 สูตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	58
ตารางที่ 17 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth จำนวน 4 สูตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	58

ตารางที่ 18 จำนวนเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth 4 สูตร	59
ตารางที่ 19 จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการคัดเลือกองค์ประกอบสารพาแต่ละชนิด	60
ตารางที่ 20 ปริมาณชีวภัณฑ์และเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. โดยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย	61
ตารางที่ 21 ความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ในชีวภัณฑ์ 3 สูตร	63
ตารางที่ 22 เปรียบเทียบความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียลดลงในชีวภัณฑ์แต่ละสูตรหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยและมีอายุจัดเก็บเป็นเวลา 3 เดือน	63
ตารางที่ 23 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ไอโซเลต N1 และกรรมวิธีต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว	66



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	9
ภาพที่ 2 ลักษณะของไมโครแคปซูล	20
ภาพที่ 3 แผนผังกระบวนการทำไมโครเอนแคปซูลชั้นด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชันและอิมัลชัน	26
ภาพที่ 4 แผนผังกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย	28
ภาพที่ 5 แผนภาพจำลองการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อ สาเหตุโรคด้วยวิธี agar plate inhibition assay	37
ภาพที่ 6 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวที่ทดสอบด้วยวิธี agar plate inhibition assay	48
ภาพที่ 7 บริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion	50
ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1	52
ภาพที่ 9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต N1 ในส่วน 16S rRNA โดยใช้ ไพรเมอร์ 27F และ 1492R	52
ภาพที่ 10 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ไอโซเลต N1 จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี neighbor-joining โดย โปรแกรม MEGA11	53
ภาพที่ 11 ความทนทานของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 ต่อสารเคมีทางการเกษตร	54
ภาพที่ 12 ลักษณะผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ไอโซเลต N1 3 สูตร	61
ภาพที่ 13 ลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ไอโซเลต N1 จำนวน 3 สูตรเทียบกับอนุภาคของชีวภัณฑ์ที่ไม่มีแบคทีเรีย (control)	64

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารหลักสำหรับประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรทั่วโลก ในแต่ละปีมีการปลูกข้าวประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่การเพาะปลูกทั่วโลก การปลูกข้าวในเอเชียมีผลผลิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Latif et al., 2011) ในประเทศไทยข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุดโดยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวเป็นหลัก ถึงแม้ว่าผลผลิตข้าวจะมีปริมาณสูงขึ้น แต่ยังพบปัญหาที่มีผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตและคุณภาพของข้าว ซึ่งอาจเกิดผลกระทบจากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ การเพาะปลูกในพื้นที่ไม่เหมาะสม การใช้พันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตน้อยในการเพาะปลูก ภัยธรรมชาติ หรือเกิดจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ แมลงศัตรูพืชและการเกิดโรคที่ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติโดยมีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว พบครั้งแรกโดยเกษตรกรชาวญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1884 โดยทำให้เกิดความผิดปกติในทอลำเลี้ยงในช่วงต้นของการเจริญเติบโตของพืชและในระยะต่อมาใบจะเหี่ยวแห้ง โรคนี้สามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วทางน้ำและอากาศในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูงลมพัดแรง สามารถก่อให้เกิดโรคในข้าวได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนกระทั่งออกรวง (Tagami, 1962) โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรค ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 พืชกุล 2 และชัยนาท 1 (กรมการข้าว, ม.ป.ป.) ซึ่งพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูงมักจะเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ ในเขตที่เกิดการติดเชื้อมันแรงอาจทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โรคขอบใบแห้งของข้าวเป็นโรคที่สำคัญอย่างมากในประเทศแถบเอเชียเขตร้อน นอกจากนี้ยังพบการเกิดโรคในภูมิภาคเอเชีย ออสเตรเลียตอนเหนือ แอฟริกา และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (Gnanamanickam et al., 1999) ความรุนแรงของโรคและความเสียหายที่เกิดจากการติดเชื้อโรคจึงต้องมีการจัดการและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคเพื่อลดการสูญเสียผลผลิตข้าว ซึ่งการจัดการโรคพืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรค การตัดแปลงระบบการเพาะปลูกไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรคพืช ซึ่งส่วนใหญ่เกษตรกรมักจะใช้สารเคมีและสารต้านจุลชีพที่มีการออกฤทธิ์กว้าง เช่น คอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ สารฟอกขาว สารประกอบอะเซทิลีน และสเตรปโตมัยซิน เป็นต้น (Niño-Liu et al., 2006) ในขณะเดียวกันสารเคมีที่นำมาใช้กำจัดศัตรูพืชเหล่านี้เมื่อมีการนำมาใช้มากขึ้นและใช้ในระยะเวลานานทำให้สารเคมีสะสมในพื้นที่เพาะปลูกเกิดมลภาวะในดินซึ่งส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์ และห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศน์ อาจทำให้พืชเกิดการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้และ

เพิ่มต้นทุนในการผลิตอีกด้วย (Chanprapai & Chavasiri, 2017) ดังนั้นเพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร จึงมีการใช้ประโยชน์จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการต้านเชื้อโรคพืชได้ เรียกจุลินทรีย์เหล่านั้นว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อเชื้อโรคพืชที่เป็นเป้าหมาย และมีต้นทุนการผลิตต่ำ (Shoda, 2000) โดยวิธีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันและกำจัดโรคพืชเรียกว่าการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) กลไกการทำงานของจุลินทรีย์ในการควบคุมโรคพืช ได้แก่ การเป็นปรสิต การแก่งแย่งอาหารและที่อยู่อาศัย การชักนำให้พืชสร้างความต้านทาน การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการผลิตสารปฏิชีวนะ

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อ *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อนำมาพัฒนาชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สะดวกต่อการใช้งาน เนื่องจากการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมโรคอาจไม่เหมาะสมหากเกษตรกรนำไปใช้ในนาข้าว (Kanjanamaneesathian et al., 1998) สารชีวภัณฑ์สามารถพัฒนาออกมาได้หลายรูปแบบทั้งเป็นสูตรของเหลวและสูตรแห้ง ได้แก่ แบบฝุ่นผง (dust powder) แบบเม็ด (granules) แบบผงผสมน้ำ (wetable powder) แบบอิมัลชัน (emulsions) และแบบสารที่ถูกห่อหุ้ม (capsule suspensions) เป็นต้น (Gasic & Tanovic, 2013) ผลิตภัณฑ์แต่ละรูปแบบจะมีการใช้สารเติมแต่งเพื่อให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังคงมีชีวิตอยู่ได้นาน ในระหว่างที่เก็บรักษาและจนกว่าจะนำไปใช้งานในการควบคุมจุลินทรีย์เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ถือได้ว่าเป็นวิธีที่ดีในการเก็บรักษาแบบที่เรียกว่าสามารถอยู่รอดได้ แต่หากนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมจะมีข้อจำกัดด้วยค่าใช้จ่ายที่สูง (Chávez & Ledebor, 2007) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาพัฒนาสารชีวภัณฑ์ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูลชัน (Microencapsulation) ด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ซึ่งเป็นกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพในการห่อหุ้มหรือตรึงเซลล์จุลินทรีย์เอาไว้ สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก มีค่าใช้จ่ายน้อย และยังปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากผลกระทบจากปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ การปนเปื้อน อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม สภาวะแวดล้อมที่แห้ง รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือกลไกที่ทำให้เกิดผลกระทบ เพื่อให้มีการยืดอายุและเก็บรักษากิจกรรมเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและคงความสามารถในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ เกษตรกรสามารถเข้าถึงการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ได้ง่ายและผลิตภัณฑ์มีความสะดวกต่อการใช้งาน ซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการและในพืชทดสอบ

1.2.2 เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันที่มีศักยภาพในการยับยั้งโรคขอบใบแห้งของข้าวและทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในพืชทดสอบ

1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการและในพืชทดสอบ เมื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1.4.1 ศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการและในพืชทดสอบ

1.4.2 ศึกษาการพัฒนาสารชีวภัณฑ์รูปแบบผงจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในในพืชทดสอบ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาสารชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 ที่มาและความสำคัญของข้าว

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักสำหรับเกือบครึ่งหนึ่งของประชากรทั่วโลก โดยพื้นที่การปลูกข้าวกระจายอยู่ใน 6 ทวีปทั่วโลก ได้แก่ เอเชีย แอฟริกา ออสเตรเลีย ยุโรป อเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ ซึ่งในแต่ละปีมีการปลูกข้าวประมาณ 11 เพอร์เซ็นต์ของพื้นที่การเพาะปลูกทั่วโลก โดยการปลูกข้าวในเอเชียมีผลผลิตมากกว่า 90 เพอร์เซ็นต์ (Latif et al., 2011) ในประเทศไทยข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุด ซึ่งมีการเพาะปลูกและส่งออกข้าวรายใหญ่ติดอันดับ 1 ใน 5 ของโลก (Thai Rice Exporters Association, 2021) การปลูกข้าวในประเทศไทยสันนิษฐานจากการพบเมล็ดข้าวและเศษแกลบในภาชนะดินเผาซึ่งคาดว่ามียุคประมาณ 5500 ปี จึงเชื่อว่าการปลูกข้าวในประเทศไทยตั้งแต่คริสต์ศตวรรษที่ 6 หรือพุทธศตวรรษที่ 13 (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550) การค้าขายข้าวกับต่างประเทศมีตั้งแต่สมัยโบราณ ในสมัยกรุงศรีอยุธยาช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2199 ถึง พ.ศ. 2257 มีการซื้อขายข้าวกับชาวฮอลันดาเพื่อจัดส่งไปขายยังประเทศหมู่เกาะมลายูและชวา ต่อมาช่วงหลังจากปี พ.ศ. 2265 ประชากรของประเทศจีนมีปริมาณมากทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนข้าว ประเทศจีนจึงเข้ามามีบทบาทในการซื้อขายข้าวแทนทำให้สมัยอยุธยาในช่วงเวลานั้นมีความรุ่งเรืองมากที่สุด ในปี พ.ศ. 2460 ไทยจึงเริ่มส่งออกข้าวอีกครั้งอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งในปี 2560 การส่งออกข้าวมีปริมาณรวม 11,628,301 ตัน มูลค่า 174,503 ล้านบาท หรือ 5,167 ล้านเหรียญสหรัฐฯ ซึ่งเป็นสถิติการส่งออกสูงที่สุดของการส่งออกข้าวไทยในช่วงที่ผ่านมา (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2561)

2.2 การเจริญเติบโตของข้าว

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในสกุล *Oryzae* พัฒนาการของการเจริญเติบโตของข้าวมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงการเก็บเกี่ยวผลผลิต ความสมบูรณ์แข็งแรงของข้าวจึงเป็นสิ่งสำคัญ หากพืชไม่แข็งแรงในช่วงการเจริญเติบโตจะทำให้ผลผลิตของพืชมีจำกัด ดังนั้นสิ่งสำคัญคือต้องเข้าใจระยะการเจริญต่าง ๆ ของพืชเพื่อการจัดการข้าวที่เหมาะสม ช่วงการเจริญของข้าวสามารถแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ดังนี้

2.2.1 ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative growth phase)

เริ่มตั้งแต่การเจริญของพืชตั้งแต่เริ่มงอกจนถึงช่วงเริ่มระยะสร้างช่อดอก (panicle) ซึ่งข้าวแต่ละสายพันธุ์จะใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดยจะสร้างราก ลำต้น ใบ

สะสมอาหารไว้สำหรับการเจริญเติบโตทางด้านการสืบพันธุ์ ซึ่งมีพัฒนาการ 2 ระยะ ได้แก่ ระยะต้นกล้า (seedling stage) และระยะแตกกอ (tiller stage)

ระยะต้นกล้าเกิดขึ้นเมื่อเมล็ดสัมผัสกับความชื้น ออกซิเจน และอุณหภูมิที่สูงกว่า 10 องศาเซลเซียส ทำให้ต้นข้าวงอกออกจากเมล็ด เมล็ดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมไว้ภายในและมีส่วนเอมบริโอที่ห่อหุ้มด้วยเปลือก มีการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาลเกิดขึ้นจึงทำให้ส่วนงอกข้าว (embryo) เริ่มทำงาน ในงอกข้าวจะเกิด 2 โครงสร้างหลัก โดยส่วนแรกเป็นส่วนที่เจริญต่อไปเป็นส่วนราก (radicle) และส่วนเนื้อเยื่อหุ้มยอดแรกเกิด (coleoptile) เพื่อปกป้องยอดแรกเกิดขณะงอก รากของข้าวจัดอยู่ในระบบรากฝอย (fibrous) ประกอบด้วย รากย่อย (rootlets) และรากขน (root hairs) โดยรากรุ่นแรก (seminal roots) จะงอกออกจากเมล็ดทางงอกข้าว ซึ่งแตกแขนงไม่มากและมีอายุได้ไม่นานหลังจากการงอก ต่อมายอดอ่อนจะงอกหลังจากนั้นประมาณ 12-24 ชั่วโมง ในขณะที่ยอดอ่อนกำลังพัฒนาเป็นใบอ่อน เมื่อต้นอ่อนอายุประมาณ 25-30 วัน รากชุดที่สอง (secondary roots หรือ adventitious roots) จะงอกออกจากข้อใต้ระดับดินของต้นข้าวแตกแขนงอย่างอิสระ เมื่อข้าวเจริญเติบโตมากขึ้นจะพบรากอีกชนิด เรียกว่า รากค้ำจุน (mat roots) เกิดขึ้นบริเวณข้อเหนือดิน ทำหน้าที่ยึดลำต้น และดูดน้ำและแร่ธาตุไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของต้น หลังจากยอดอ่อนโผล่พ้นเมล็ดจะเห็นใบแรกโผล่ออกมาจากเนื้อเยื่อหุ้มยอดแรกเกิด หลังจากนั้น 5-10 วัน ใบที่สองและใบที่สามจะงอกตามมา โดยในช่วงนี้ต้นอ่อนจะใช้อาหารที่สะสมอยู่ในเมล็ด เมื่อถึงระยะใบที่สี่เริ่มแตกใบส่วนต้นอ่อนจะใช้อาหารจากรากดูดน้ำแร่และแร่ธาตุขึ้นมาจากดินแทน เมื่อต้นกล้ามีอายุ 25-30 วัน จะมีระบบรากฝอยที่สมบูรณ์และลำต้นสูงประมาณ 20-30 เซนติเมตร จึงพร้อมนำไปปักดำได้ในการทำนาแบบนาดำ หรือปล่อยต้นข้าวให้เจริญเติบโตต่อไปหากมีการทำนาแบบวิธีหว่าน

ระยะแตกกอเริ่มตั้งแต่ต้นข้าวแตกกอจนกระทั่งต้นข้าวสร้างดอกอ่อน ต้นกล้าจะเริ่มแตกกอหลังจากปักดำ 7-10 วัน โดยปริมาณการแตกแขนงและระยะเวลาในการแตกกอจะแตกต่างกันตามชนิดพันธุ์ข้าวและสิ่งแวดล้อมของพื้นที่เพาะปลูก ซึ่งปกติต้นข้าวจะใช้เวลาแตกกอประมาณ 30-50 วันหลังจากระยะกล้า ในระยะกล้าจนถึงระยะแตกกอสูงสุดจะมีการพัฒนาส่วนรากและส่วนลำต้นเกิดขึ้นไปพร้อมกัน โดยรากข้าวจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในระยะนี้ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรากต้องมีความชื้นที่พอเหมาะและออกซิเจนในดินสูง ในระยะนี้จึงต้องเอาน้ำออกจากนาสักระยะเพื่อให้พื้นที่ได้รับออกซิเจนจากอากาศ ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตอย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนลำต้นของต้นข้าวจะมีลักษณะมีปล้อง หลายปล้องต่อเชื่อมกันด้วยข้อ (node) บริเวณข้อจะมีตา (bud) ต้นข้าวจะมีการยึดข้อปล้องในเวลาเริ่มสร้างช่อดอก ความสูงของลำต้นประมาณ 100-200 เซนติเมตร โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าวและสภาพแวดล้อมของพื้นที่เพาะปลูก ลำต้นจะทำหน้าที่พยุงเพื่อให้ได้รับแสงแดด สังเคราะห์แสงสำหรับการสร้างอาหาร และลำเลียงน้ำ

อาหาร และแร่ธาตุ ไปยังส่วนต่าง ๆ ของข้าว ส่วนใบข้าวเกิดจากส่วนข้อของลำต้น ใบข้าวเป็นใบแท้ชนิดใบเดี่ยว มีลักษณะเป็นแผ่นแบน ปลายยาว ประกอบด้วย แผ่นใบ (leaf blade) กาบใบ (leaf sheath) และข้อต่อใบ (leaf collar) ซึ่งแผ่นใบจะมีเส้นกลางใบแบ่งใบข้าวเป็น 2 ซีก โดยแผ่นใบจะมีคลอโรฟิลล์มากกว่าส่วนอื่น คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียวที่สะสมในใบพืชจะดูดกลืนแสงสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์เป็นพลังงานให้กับพืชทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและแร่ธาตุไปยังแผ่นใบเพื่อสะสมอาหารสำหรับการเจริญของรวงข้าวและลำต้น

2.2.2 ระยะเวลาการเจริญเติบโตทางด้านการสืบพันธุ์ (reproductive growth phase)

เริ่มตั้งแต่ช่วงสิ้นสุดช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบจนกระทั่งสร้างเมล็ดเต็มวัย โดยต้นข้าวจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียภายในช่อดอก จากนั้นจะมีการผสมเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศจึงได้เป็นเมล็ด ใช้ระยะเวลาประมาณ 30-40 วัน ซึ่งมีพัฒนาการ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะเริ่มสร้างช่อดอกหรือรวงข้าว ระยะตั้งท้อง (booting stage) ระยะออกดอก และการผสมพันธุ์ (flowering and fertilization stage) และระยะเวลาการเจริญทางเมล็ด (grain development)

ระยะเริ่มสร้างช่อดอกหรือรวงข้าวอยู่ในช่วงสุดท้ายของการแตกกอ ต้นข้าวจะพร้อมสร้างรวงโดยต้องได้รับปัจจัยที่เหมาะสมในระยะนี้ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ ได้แก่ ช่วงแสงที่ต้นข้าวได้รับแต่ละวัน อุณหภูมิ ความชื้น และธาตุอาหาร เป็นต้น

ระยะตั้งท้องดอกของข้าวจะขยายตัวจนเป็นช่อดอกที่สมบูรณ์ ระยะนี้จะสังเกตเห็นกาบใบสุดท้ายใหญ่กว่าส่วนกลางของลำต้น ซึ่งข้าวตั้งท้องจะต้องการสารอาหาร จึงต้องมีการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรียในช่วงที่ต้นข้าวเริ่มออกช่อดอกเพื่อช่วยให้ข้าวมีผลผลิตที่ดี

ระยะออกดอกและการผสมพันธุ์ เมื่อข้าวตั้งท้องเต็มที่แล้ว ช่อดอกจะโผล่พ้นกาบใบแล้วบาน ใช้เวลาประมาณ 6-7 วัน โดยจะเริ่มบานจากปลายช่อจนถึงโคนรวงข้าว ช่อดอกหลายดอกรวมกันเป็นช่อจะแตกออกจากแกนกลาง ซึ่งพัฒนาไปเป็นช่อเมล็ดเรียกว่า รวงข้าว ดอกข้าวจะประกอบด้วยกลีบดอกใหญ่และกลีบดอกเล็ก 2 เปลือกประกบกันประสานกันด้วยก้านสั้นที่อยู่ตรงฐาน เรียกว่า ข้าวดอก

เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียจะอยู่ในดอกข้าวเดียวกัน จัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศที่สามารถผสมพันธุ์ได้ด้วยตัวเอง (self-pollination) เกสรเพศผู้จะมีอับเกสรเพศผู้ (anther) อยู่บนก้านอับเกสร (filament) ภายในอับเกสรเพศผู้จะมีละอองเกสร (pollen grain) ขนาดเล็ก ส่วนเกสรเพศเมียจะมียอดเกสรตัวเมีย (stigma) ที่อยู่บนก้านเกสรเพศเมีย (style) สำหรับรับละอองเกสรเพศผู้ ซึ่งจะอยู่ติดกับรังไข่ (ovary) ที่มีไข่ (ovule) อยู่ภายใน ระยะนี้จะสิ้นสุดเมื่อมีการผสมเกสร (pollination) โดยที่เกสรเพศผู้แตกตัวปล่อยละอองเกสรผสมกับเกสรเพศเมียแล้วมีการผสมพันธุ์ของดอกข้าว ระยะเวลาในการผสมเกสรและผสมพันธุ์ของดอกข้าวจะใช้เวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง จนได้เมล็ดในระยะต่อมา

ระยะการเจริญทางเมล็ด (grain development) หลังจากผสมเกสรและผสมพันธุ์ของดอกข้าวในระยะต้นเป็นเวลา 7 วัน เมล็ดข้าวจะมีสีขาวคล้ายน้ำนม เปลือกเมล็ดข้าวมีสีเขียว เรียกว่า ระยะข้าวเป็นน้ำนม (milky) หลังจากผสมเกสร 14-21 วัน เปลือกข้าวแข็งและเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวอมน้ำตาล เนื้อในเมล็ดเหนียวและแข็งขึ้น เรียกว่า ระยะข้าวเმა (dough stage) และหลังจากผสมเกสร 30 วัน การพัฒนาเมล็ดข้าวจะสมบูรณ์เต็มที่ ขนาดใหญ่ขึ้น เปลือกเมล็ดข้าวแข็ง สีเปลือกข้าวเป็นสีน้ำตาลทอง หรือสีอื่น ๆ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าว เนื้อเมล็ดข้าวจะมีสีขาว จะใช้เวลาปลูกข้าวประมาณ 120-150 วัน ตั้งแต่วันตกกล้าจึงพร้อมที่จะเก็บเกี่ยวได้ (บุญหงส์, 2014; อรอนงค์, 2550; อัมมาร & วิโรจน์, 2533)

2.3 พันธุ์ข้าว

ข้าวปลูกในประเทศเขตร้อนเป็นส่วนใหญ่ มี 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ ข้าวเจ้า และข้าวเหนียว สามารถเจริญได้ในภูมิประเทศและภูมิอากาศแตกต่างกันทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ปลูกในพื้นที่หลากหลายตั้งแต่พื้นที่น้ำท่วมสูงจนถึงพื้นที่สูงตามไหล่เขา จึงทำเกิดพันธุ์ข้าวที่หลากหลายแพร่กระจายทั่วโลก โดยพันธุ์ข้าวสามารถแบ่งตามลักษณะการตอบสนองช่วงแสงของวันซึ่งมีผลต่อการตอบสนองในการเจริญของต้นข้าวออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

2.3.1 พันธุ์ข้าวไวต่อช่วงแสง หรือข้าวไวแสง (photoperiod sensitive varieties)

พันธุ์ข้าวที่มีความต้องการแสงในช่วงกลางวันสั้นเพื่อเปลี่ยนการเจริญทางลำต้นและใบมาเป็นการเจริญทางด้านกรสปีพันธุ์ในการสร้างช่อดอกและเมล็ด โดยจะสร้างช่อดอกเมื่อมีช่วงแสงสั้นกว่า 12 ชั่วโมง ส่วนมากจะเป็นข้าวที่ปลูกในช่วงนาปี ความต้องการช่วงแสงของข้าวแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน ทำให้ช่วงการออกดอกตลอดจนอายุการเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน ซึ่งสามารถจำแนกชนิดตามระยะเวลาที่ต้องเก็บเกี่ยวออกเป็น ข้าวเบา (early variety) ข้าวกลาง (medium variety) และข้าวหนัก (late variety) โดยข้าวเบาจะใช้ระยะเวลาในการปลูกสั้น ต้องการช่วงแสงน้อยกว่า 12 ชั่วโมงเล็กน้อย ข้าวกลางใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกปานกลาง ต้องการช่วงแสงสั้นกว่าข้าวเบา และข้าวหนักใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกนาน ต้องการช่วงแสงสั้นกว่าข้าวกลาง ในประเทศไทยมีการปรับปรุงพันธุ์โดยผสมพันธุ์ข้าวระหว่างพันธุ์ข้าวไทยและต่างประเทศ ทำให้เกิดข้าวพันธุ์ กข โดยพันธุ์ข้าวที่ไวต่อช่วงแสง เช่น นางมลเอส-4 เหมยนอง62เอ็ม ขาวดอกมะลิ105 เหนียวสันป่าตอง แก้วรอง88 นางพญา132 ขาวปากหม้อ148 เหลืองประทิวา123 เหลืองใหญ่148 เผือกน้ำ43 พวงไร่2 น้ำสะกุกุย19 หางยี71 กข6 กข8 กข13 กข15 กข27 แก่นจันทร์ ข้าวเหนียวอุบล1 ข้าวเจ้าชุมแพ60 ข้าวเจ้าปทุม60 และข้าวเจ้าพิษณุโลก60-1 เป็นต้น (อัมรา และคณะ, 2547)

2.3.2 พันธุ์ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง หรือข้าวไม่ไวแสง (insensitive varieties)

พันธุ์ข้าวที่ไม่มีอิทธิพลของช่วงแสงต่อการสร้างช่อดอกจึงเป็นพันธุ์ข้าวที่สามารถปลูกได้ตลอดปี สามารถปลูกได้ดีในฤดูร้อน ระยะเวลาการเพาะปลูกตั้งแต่ 100-150 วัน อย่างไรก็ตามช่วงอายุของข้าวแต่ละสายพันธุ์อาจแตกต่างกันตามวิธีการจัดการพื้นที่การเพาะปลูกข้าว โดยพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวแสง เช่น กข1 กข2 กข3 กข4 กข5 กข7 กข9 กข10 กข11 กข21 กข25 ข้าวเจ้าพิษณุโลก60-2 ข้าวเจ้าสุพรรณบุรี60 ข้าวเจ้าสุพรรณบุรี90 ข้าวเจ้าชัยนาท1 ข้าวเหนียวแพร่1 ข้าวเจ้าสุพรรณบุรี1 ข้าวเจ้าสุพรรณบุรี2 ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง1 ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี1 สันป่าตอง1 พิษณุโลก2 ข้าวตาแห้ง17 เป็นต้น (อัมรา และคณะ, 2547)

2.4 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

โรคขอบใบแห้งของข้าวมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ซึ่งเป็นหนึ่งในโรคพืชที่รุนแรงในข้าว พบข้าวเกิดอาการโรคและบันทึกไว้ครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1884 โดยชาวนาเมืองฟูกูโอกะ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเดิมทีเชื่อกันว่าอาการโรคเกิดจากปัญหาดินเปรี้ยว (Tagami, 1962) ในปี ค.ศ. 1909 ได้มีการแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำค้ำบนใบข้าวที่มีอาการของโรค และได้ทำการทดสอบปลูกเชื้อที่แยกได้ลงบนใบข้าวที่ไม่เป็นโรค จากนั้นใบข้าวเกิดอาการโรคขอบใบแห้งจึงทำให้ทราบว่าแบคทีเรียชนิดนั้นเป็นสาเหตุของโรค แบคทีเรียสาเหตุโรคจึงถูกแยกและจำแนกเป็น *Bacillus oryzae* (Mizukami & Wakimoto, 1969) แบคทีเรียสาเหตุโรคได้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Pseudomonas oryzae* ต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็น *Xanthomonas oryzae* (Gnanamanickam et al., 1999) ซึ่งเป็นชื่อที่มีการใช้มาแล้วเป็นเวลา 40 ปี สามารถจัดอันดับอนุกรมวิธานได้ ดังนี้

Domain Bacteria

Phylum Proteobacteria

Class Gammaproteobacteria

Order Xanthomonadales

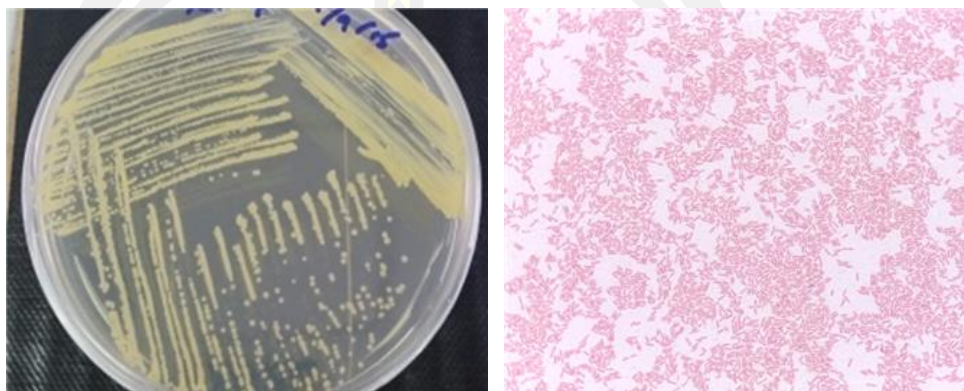
Family Xanthomonadaceae

Genus *Xanthomonas*

Species *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

แบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างท่อนสั้น ขนาดยาวประมาณ 0.7-2.0 ไมโครเมตร และกว้างประมาณ 0.4-0.7 ไมโครเมตร ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) มีรูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวเมือก มีสีเหลืองจากการสร้าง xanthomonadin ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Xanthomonas* (Niño-Liu et al., 2006; Zhou et al., 2013) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

(ก) โคโลนีสีเหลืองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar

(ข) รูปร่างเป็นท่อนสั้น แกรมลบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 1000X

ที่มา : Jonit et al., (2016)

เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากมีแฟลกเจลลา 1 เส้น (single polar flagellum) มีการสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) ที่มีความสำคัญในการก่อตัวของหูดแบคทีเรียที่ไหลซึมออกมาจากการติดเชื้อที่ใบ ป้องกันเซลล์แบคทีเรียจากการทำให้แห้งและช่วยในการแพร่กระจายของเชื้อโดยลมและฝน Xoo เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (obligately aerobic) และไม่สร้างเอนโดสปอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส (Niño-Liu et al., 2006)

2.4.2 ลักษณะอาการของโรคขอบใบแห้งของข้าว

โรคขอบใบแห้งเป็นโรคกลุ่มท่อลำเลียงน้ำและอาหาร จึงทำให้เกิดการติดเชื้อแพร่กระจายทั่วระบบของพืช สามารถเกิดโรคได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโตของข้าวและเกิดโรคมากที่สุดในระยะแตกกอ (tillering) จนกระทั่งระยะการเจริญเต็มที่ (maturity) ซึ่งอาการของโรคขอบใบแห้งของข้าวทางใบสามารถสังเกตเห็นได้ในข้าวระยะแตกกอ รอยโรคมักจะเริ่มพบที่ขอบใบข้าวซึ่งมีปากใบที่แบคทีเรียสาเหตุโรคจะสามารถบุกรุกเข้าทางช่องเปิดธรรมชาตินี้ได้

ทำให้ใบข้าวเกิดเป็นรอยช้ำ ซึ่งภายใน 2-3 วัน รอยช้ำน้ำสีเขียวจะขยายไปตามแนวความยาวของใบข้าวแล้วใบข้าวจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (chlorotic) โดยรอยโรคสีเหลืองที่ขยายใหญ่ขึ้นแล้วกลายเป็นสีขาวหรือสีเทาและเหี่ยวแห้งในที่สุด (necrotic) ในกรณีการติดเชื้อในช่วงก่อนปักดำอาการของโรคจะปรากฏภายใน 3-4 สัปดาห์หลังจากการปักดำและโรคจะค่อย ๆ แพร่กระจายไปเช่นเดียวกับข้าวที่มีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ นอกเหนือจากอาการทั่วไปเหล่านี้ ในบางครั้งใบจะมีลักษณะม้วนงอและเหี่ยวหลังจากติดเชื้อ บางครั้งอาจพบหยดแบคทีเรียขนาดเล็กสีเหลืองครีม (bacterial ooze) ออกมาบนผิวใบบริเวณรอยโรค สามารถสังเกตเห็นได้ในช่วงสภาพอากาศอบอุ่นชื้น ซึ่งลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏจะขึ้นอยู่กับ พีชอาศัย ความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรค และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค (Gnanamanickam et al., 1999; Mizukami & Wakimoto, 1969; Niño-Liu et al., 2006)

2.4.3 การแพร่ระบาดและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งเสริมการเกิดโรคของใบแห้งของข้าว

การติดเชื้อแบคทีเรียของพีชจะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียเข้าสู่โฮสต์โดยเชื้อแบคทีเรีย *Xoo* สาเหตุโรคสามารถเข้าสู่โฮสต์ได้โดยทางช่องเปิดทางธรรมชาติ เช่น ปากใบ อาจเกิดจากเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคที่อยู่บนผิวใบจะเข้าไปรวมกับของเหลวที่พืชคายน้ำออกมาในเวลากลางวันแล้วจะถูกดึงกลับเข้าสู่ใบในตอนเช้าหรือเข้าสู่โฮสต์ทางบาดแผลที่อยู่บริเวณรากหรือใบ โดยบาดแผลที่เกิดขึ้นใหม่จะมีแนวโน้มที่ทำให้ติดเชื้อได้ดีกว่าบาดแผลเก่า (Curtis, 1943; Gnanamanickam et al., 1999) ซึ่งการติดเชื้อทางบาดแผลจะมีโอกาสในการเกิดโรคมมากกว่าทางช่องเปิดธรรมชาติ เมื่อแบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าสู่โฮสต์แล้วจะเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในช่องว่างระหว่างเซลล์พีชหลังจากนั้นจึงแพร่กระจายเข้าสู่ท่อลำเลียงน้ำ (Noda & Kaku, 1999) เชื้อสาเหตุโรคจะเคลื่อนที่ไปตามแนวตั้งของใบผ่าน primary vein และผ่านไปยัง commissural veins ต่อมาภายใน xylem vessel จะเต็มไปด้วยเซลล์แบคทีเรีย *Xoo* และ extracellular polysaccharide (EPS) แล้วหยดแบคทีเรียมีสีเหลือง ลักษณะกลม ขนาดเล็ก ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้โดยจะออกมาทางช่องเปิดธรรมชาติหรือทางบาดแผลบริเวณใบข้าว หยดแบคทีเรียนี้บ่งบอกถึงการเกิดโรคและจะส่งผลต่อการแพร่กระจายของโรคโดยทางน้ำกระจายทางลม ฝน และแมลง หรืออื่น ๆ (Mew, 1993) แบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถอยู่ในน้ำบริเวณทุ่งนาได้เพียง 15 วัน นอกจากนั้นยังมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมซึ่งช่วยส่งเสริมในการเกิดโรคของใบแห้งของข้าว โดยพื้นที่ที่มีการระบายน้ำที่ไม่ดีส่งผลให้พื้นที่มีน้ำขัง โดยเฉพาะพื้นที่น้ำขังที่อยู่ใกล้แหล่งน้ำยิ่งจะทำให้มีการชักนำการเกิดโรคเนื่องจากช่วงเช้าพื้นที่ใกล้แหล่งน้ำมีหมอกหนา เชื้อสาเหตุโรคอาจแพร่กระจายได้ง่าย ดินที่มีความเป็นกรดจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรครุนแรง ปัจจัยของสภาพอากาศที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ ปริมาณฝน ความชื้น อุณหภูมิ น้ำท่วม และพายุ เกิดขึ้นระหว่างช่วงปลูกข้าวด้วย (Mizukami & Wakimoto, 1969)

2.4.4 การควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว

ความเสียหายที่เกิดจากความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งของข้าวจึงต้องมีวิธีการควบคุมโรค ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ เขตกรรม (cultural practice) การใช้สารเคมี (chemical control) หรือการใช้ข้าวพันธุ์ต้านทานต่อโรค (host genetic resistance) เป็นต้น

เขตกรรมเป็นแนวทางในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยขึ้นอยู่กับพื้นที่ในการเพาะปลูกและบันทึกการเกิดโรคก่อนหน้าเพื่อจัดการระบบการเพาะปลูกไม่ให้เกิดโรค ในแปลงเพาะปลูกข้าวที่เคยเกิดโรคควรมีการทำลายเชื้อสาเหตุโรคที่อาจสะสมอยู่ในฟางข้าว หลังจากการเก็บเกี่ยวโดยวิธีการเผาฟางข้าว รวมทั้งกำจัดวัชพืชตามแนวท้องนาและในแหล่งน้ำใกล้เคียงเพื่อลดแหล่งที่อยู่อาศัยธรรมชาติของเชื้อสาเหตุโรคและการแพร่กระจายของเชื้อในแหล่งน้ำ ควรเลือกใช้ปุ๋ยอย่างเหมาะสมและเว้นระยะห่างของต้นข้าวอย่างเหมาะสม (Goto, 1992; Mizukami & Wakimoto, 1969) หลีกเลี่ยงการใช้ปุ๋ยที่ประกอบด้วยไนโตรเจนซึ่งช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชในอัตราสูงเกินไป เนื่องจากไนโตรเจนจะส่งเสริมการเกิดโรคได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดินในพื้นที่เพาะปลูกข้าว ส่วนแนวทางปฏิบัติควบคุมการเกิดโรคหลังจากเกิดพายุ ลมแรง และน้ำท่วมหนัก ที่เป็นปัจจัยในการแพร่กระจายและเกิดโรคสามารถควบคุม โดยการใช้ปุ๋ยที่อุดมไปด้วยโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสรวมถึงการใช้สารเคมีทางการเกษตรในช่วงระยะแตกกอไปจนถึงระยะตั้งท้อง (Goto, 1992; Ho & Lim, 1979)

การปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เป็นวิธีการจัดการและควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพอย่างมาก ช่วยลดใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ส่งผลเสียต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม โดยมีการระบุยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าว ทั้งยีนที่เด่นและด้อยอย่างน้อย 40 ยีน ซึ่งมีตั้งแต่ยีน *Xa1* ถึง *Xa40* ให้คำนำหน้าเป็น *Xa* แทน *Xanthomonas* ยีนส่วนใหญ่แยกได้จาก *O. sativa ssp. indica* และบางส่วนของยีนที่ได้จากข้าวจากปอนิก้าและข้าวป่าชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *O. longistaminata*, *O. rufipogon*, *O. minuta* และ *O. officinalis* (Bhasin et al., 2012; Kumar et al., 2012; Lee et al., 2003) การสร้างยีนต้านทานโดยจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของข้าวที่ปลูกโดยใช้วิธีต่าง ๆ ได้แก่ การใช้สาร N-methyl-N-nitrosourea การใช้รังสีความร้อนนิวตรอน หรือทำให้เกิดการเพิ่มหรือขาดของโครโมโซม เป็นต้น (Gao et al., 2002; Lee et al., 2003) อย่างไรก็ตามการเพิ่มความต้านทานต่อศัตรูพืชถือเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อทำให้ข้าวเกิดการต้านทานต่อโรค แต่ถ้ามีความผันแปรของ *Xoo* ในระดับสูงอาจจะก่อให้เกิดการสลายตัวของความต้านทานได้ (Suh et al., 2013) พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าว เช่น พันธุ์สุพรรณบุรี60 สุพรรณบุรี90 สุพรรณบุรี1 สุพรรณบุรี2 กข7 และ กข23 เป็นต้น (กรมการข้าว, ม.ป.ป.)

การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อสาเหตุโรคโดยการขัดขวางวิถีเมทาบอลิซึมของเชื้อสาเหตุโรค เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 ที่มีการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในนาข้าว สารเคมีที่นำมาใช้มีหลายชนิด ได้แก่ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และคอปเปอร์ซัลเฟต คอปเปอร์ออกซีคลอไรด์ สารกำจัดเชื้อรา คอปเปอร์เมอร์คิวรี สารฟอกขาว (Gnanamanickam et al., 1999; Niño-Liu et al., 2006) การฆ่าเชื้อสาเหตุโรคที่มาจากทางน้ำในนาข้าวจะใช้สารฟอกขาว (bleaching powder) นอกจากนี้ยังมีการแนะนำให้ใช้สารฆ่าแบคทีเรียที่เป็นสารอินทรีย์สังเคราะห์ ได้แก่ nickel dimethyl dithiocarbamate, dithianone, phenazine และ phenazine n-oxide (Gnanamanickam et al., 1999) ส่วนการทำลายเชื้อสาเหตุโรคที่ติดเชื้อจากเมล็ดพันธุ์ข้าวมีการใช้สารประกอบเมอร์คิวริก สารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ เช่นในน้ำร้อนอุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือมีการใช้สารฟอกขาว กับคลอรีน 30 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับการฆ่าเชื้อสาเหตุโรคทางน้ำ (Tagami, 1962) ในการควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีอย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นจะต้องกำหนดช่วงเวลาที่เหมาะสมด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่มีการพัฒนาสารเคมีที่ใช้สำหรับควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดและมีต้นทุนต่ำได้ อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคได้มีการพัฒนาความต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ในการควบคุม นอกจากนี้สารเคมีทางการเกษตรหลายชนิด อาจทำลายจุลินทรีย์ในดินที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของข้าวอีกด้วย

องค์กร FAO-WHO และ The United States Food and Drug Administration ได้พบว่าการนำสารเคมีมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชทำให้มีสารเคมีตกค้างอยู่ในผลผลิตทางการเกษตร และพื้นที่การเกษตร จึงตระหนักต่อผลกระทบที่ได้จากการใช้สารเคมีในการควบคุมอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน และส่งผลกระทบต่อมนุษย์สัตว์และห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศน์ ดังนั้นจึงได้ให้ความสำคัญกับการพัฒนาวิธีควบคุมโรคพืชที่ปลอดภัยและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (Syed Ab Rahman et al., 2018) นักวิจัยจึงได้ศึกษาหาสารควบคุมโรคพืชที่สามารถทดแทนการใช้สารเคมีได้ โดยเฉพาะจากพืชสมุนไพรไทยที่เคยใช้มานานในการรักษาโรคต่าง ๆ ในคน งานวิจัยของ Chanprapai และ Chavasiri (2017) ได้ศึกษาความสามารถของสกัดสารจากชะพลูในการยับยั้งเชื้อ Xoo ซึ่งสารสกัดของพืชชนิดนี้ได้รับการรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ผลของชะพลูที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนยับยั้ง Xoo ได้ดีที่สุด เมื่อตรวจสอบชนิดของสารพบว่า เป็นสาร brachyamide B และ piperonal มีฤทธิ์ยับยั้ง Xoo ได้ดีที่สุด โดยความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 7.62 มิลลิโมลต่อลิตร และความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 1.90 มิลลิโมลต่อลิตร นอกจากนี้ Shi และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษา melittin ซึ่งเป็น antimicrobial peptides (AMPs) คือเปปไทด์สายสั้นที่มีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันตัวของร่างกาย (host defense mechanism) ต่อการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

โดย melittin เป็นส่วนประกอบของพืชผึ้งซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xoo* ได้ สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Xoo* เกิดเซลล์เสียหายและรื้อทำให้ส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ออกมา นอกจากนั้นกระบวนการเมแทบอลิซึม การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย *Xoo* ลดลงอีกด้วย จึงสันนิษฐานได้ว่า melittin สามารถนำไปประยุกต์ในการควบคุมโรคพืชได้ ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการวิจัยและพัฒนาการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ประโยชน์ในการจัดการโรคขอบใบแห้งของข้าวมากขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วสามารถอาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชได้ดี ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัย และชักนำให้ความต้านทานต่อเชื้อโรคพืชได้ (Khoa et al., 2016) ปัจจุบันจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังได้รับการยอมรับว่าเป็นเครื่องมือสำคัญของการควบคุมโรคพืชในระบบการเกษตรแบบยั่งยืนอีกด้วย มีการศึกษาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมเชื้อ *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวต่างตารางที่ 1 โดยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีกลไกการควบคุมที่หลากหลาย จากการศึกษาเหล่านี้สามารถนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวทางการค้าได้ นอกจากนั้นกลยุทธ์นี้ยังสามารถใช้ร่วมกับวิธีการอื่น ๆ ในการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการป้องกันและผลผลิตข้าวที่ยั่งยืนยิ่งขึ้น

ตารางที่ 1 การศึกษาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	การออกฤทธิ์/กลไก	อ้างอิง
<i>Lysobacter antibioticus</i> 13-1	ไม่ได้ตรวจสอบกลไกการทำงานของเชื้อที่แน่ชัด โดยสารออกฤทธิ์ยับยั้ง <i>Xoo</i> มาจากส่วนใสของเชื้อปฏิปักษ์ จึงอาจมีการสร้างสารยับยั้งการเจริญ (antibiosis)	Ji et al., 2008
<i>Promopsis longicolla</i> S1B4	สร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ dicerandrols A, B, และ C, deacetylphomoxanthone B, และ fusaristatin A	Lim et al., 2010
<i>Bacillus pumilus</i> SE34 <i>Bacillus subtilis</i> GBO3	ชักนำให้เกิดความต้านทานโดยสร้างเอนไซม์เพื่อป้องกัน ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POX) และ polyphenol oxidase (PPO) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting rhizobacteria ; PGPR)	Chithrashree et al., 2011
<i>Streptomyces</i> spp. (LBR02, AB131-1 และ AB131-2)	ไอโซเลต AB131-1 และ AB131-2 มีการสร้างฮอร์โมนพืช indole acetic acid (IAA) ไอโซเลต LBR02 และ AB131-1 มีการสร้างเอนไซม์ chitinase, phosphatase และ siderophore	Hastuti et al., 2012

ตารางที่ 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	การออกฤทธิ์/กลไก	อ้างอิง
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B014	สร้าง lipopeptide AXLP14 ที่ช่วยลดการสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้ลดความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อโรคนบนพืชอาศัย มีฤทธิ์กระตุ้นการยับยั้งแบคทีเรียและชักนำให้เกิดความต้านทาน	Li et al., 2016
<i>Serratia nematodiphila</i> CT-78	สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งอาจเป็น bacteriocin A หรือ B สร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ผลิต siderophore ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria ; PGPR)	Khoa et al., 2016
<i>Pseudomonas</i> spp. (E227, E233 และ Rh323)	ผลิต siderophore, cyanide	Yasmin et al., 2016
<i>Serratia</i> sp. Rh269	มีความสามารถย่อยสลายแป้ง (hydrolyze starch)	
<i>Bacillus</i> sp. Rh219	ผลิตเอนไซม์ glucanase ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria ; PGPR) สร้างฮอร์โมนพืช indole acetic acid (IAA) สร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) ผลิตกรดซิตริก (citric acid) ชักนำให้เกิดความต้านทานโดยสร้างเอนไซม์เพื่อป้องกัน ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POD) , polyphenol oxidase (PPO) และ catalase (CAT)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BRp3	สร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ได้แก่ siderophore (1-hydroxy-phenazine, pyocyanin และ pyochellin), rhamnolipids, 4-hydroxy-2-alkylquinolines, 2,3,4-trihydroxy-2-alkylquinolines และ 1,2,3,4-tetrahydroxy-2-alkylquinolines	Yasmin et al., 2017
<i>Acinetobacter</i> sp. ACMS25	สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)	Shalini et al., 2017
<i>Bacillus</i> spp. D13	สร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compound) ได้แก่ decyl alcohol and 3,5,5-trimethylhexanol	Xie et al., 2018

2.5 การควบคุมโดยชีววิธี (biological control หรือ biocontrol)

การควบคุมศัตรูพืชเป็นสิ่งสำคัญเพื่อรักษาคุณภาพและความอุดมสมบูรณ์ของผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งอาจใช้หลากหลายวิธีในการป้องกันและควบคุม นอกเหนือจากวิธีการดูแลพื้นที่การเกษตรเป็นอย่างดีแล้วเกษตรกรมักจะใช้ปุ๋ยเคมีหรือสารกำจัดศัตรูพืชเป็นหลัก ซึ่งผลเสียจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรมากเกินไปและใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานทำให้ในแต่ละประเทศจึงเริ่มมีข้อกำหนดที่เข้มงวดสำหรับการใช้สารกำจัดศัตรูพืช (Barratt et al., 2018) นักวิจัยจึงได้มุ่งเน้นพัฒนาวิธีการในการจัดการศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมีเรียกว่า การควบคุมโดยชีววิธี โดยนำสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งที่ได้จากธรรมชาติหนึ่งชนิดหรือมากกว่ามาควบคุมสิ่งมีชีวิตที่สร้างความเสียหายขึ้น ซึ่งอาจเป็นสารสกัดที่ได้จากวัชพืชธรรมชาติ ยีนหรือผลผลิตจากยีน โดยเฉพาะจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นทางเลือกในการควบคุมศัตรูพืชและเชื้อโรคพืชที่ดีที่สุดเพื่อแนวทางการลดต้นทุนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ช่วยลดความเสี่ยงต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภคง่ายต่อการจัดการและใช้งานจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดไม่เพียงแต่ควบคุมโรคเท่านั้น แต่ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Syed Ab Rahman et al., 2018)

2.6 กลไกการควบคุมโดยชีววิธี (mechanisms of biological control)

2.6.1 การแข่งขัน (competition)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่ในดินหรือบนพื้นผิวของพืชมักมีสภาพแวดล้อมที่จำกัด จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีความสามารถในการเจริญแข่งขันกับเชื้อโรคพืชเพื่อแย่งครอบครองพื้นที่อาศัย แร่ธาตุ สารอาหาร ให้สามารถอยู่รอดได้ในแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ ทำให้เกิดเชื้อโรคพืชลดลง ไม่สามารถเจริญเพื่อทำลายพืชได้ โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีประสิทธิภาพในการดูดซึมและใช้ประโยชน์จากสารอาหารแร่ธาตุในดินได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรค (Handelsman & Stabb, 1996) แบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. fluorescens* หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถผลิต siderophore ซึ่งมีความสำคัญในทางการเกษตรเพื่อแย่งจับธาตุเหล็กในดินที่สำคัญต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้เชื้อโรคพืชที่อยู่บริเวณนั้นไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ siderophore ยังช่วยละลายและขนส่งธาตุเหล็กไปยังพืชเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย (มานิตา & วสุ, 2557)

2.6.2 การสร้างสารยับยั้งหรือสารปฏิชีวนะ (antibiosis)

กลไกนี้มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการควบคุมโดยชีววิธี โดยสารที่ได้จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือพืชผลิตออกมาเป็นสื่อกลางในการยับยั้งเชื้อโรคได้ ซึ่งอาจเป็นสารทำลายเซลล์ (lytic agents) เอนไซม์ (enzyme) สารประกอบระเหย (volatile compounds) สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตสารที่มีฤทธิ์ปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิด หรือสารที่เป็นพิษอื่น ๆ (Köhl et al., 2019; Syed Ab Rahman et al., 2018)

โดยมีรายงานสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากจุลินทรีย์สามารถควบคุมโรคพืชได้ ดังตารางที่ 2 สารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพจะต้องสามารถผลิตในปริมาณเพียงพอต่อการควบคุมเชื้อโรคและสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเป้าหมายได้ทั้งการทดสอบในห้องปฏิบัติการและการทดสอบในเรือนทดลอง

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะควบคุมโรคพืช

สารปฏิชีวนะ	จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	เชื้อสาเหตุโรค	โรค	อ้างอิง
2, 4-diacetylphloroglucinol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Pythium</i> spp.	โรคน้ำคอดิน	Shanahan et al., 1992
Agrocin 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	โรคราวัน กอลล์ (Crown gall)	Kerr, 1980
Bacillomycin D	<i>Bacillus subtilis</i> AU195	<i>Aspergillus flavus</i>	การปนเปื้อนของAflatoxin	Moyne et al., 2001
Bacillomycin, fengycin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium oxysporum</i>	โรคเหี่ยว	Koumoutsis et al., 2004
Xanthobaccin A	<i>Lysobacter</i> sp. strain SB-K88	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	โรคน้ำคอดิน	Islam et al., 2005
Gliotoxin	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	โรครากเน่า	Wilhite et al., 2001
Phenazines	<i>P. fluorescens</i> 2-79 และ 30-84	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	โรค take-all	Thomashow et al., 1990
Herbicolin	<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	<i>Erwinia amylovora</i>	โรค fire blight	Sandra et al., 2001
Turin A	<i>B. subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinerea</i> และ <i>R. solani</i>	โรคน้ำคอดิน	Paulitz and Belanger, 2001 Kloepper et al., 2004
Mycosubtilin	<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Pythium aphanidermatum</i>	โรคน้ำคอดิน	Leclere et al., 2005
Pyoluteorin, pyrrolnitrin	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>Pythium ultimum</i> และ <i>R. solani</i>	โรคน้ำคอดิน	Howell and Stipanovic, 1980
Pyrrolnitrin, pseudane	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>R. solani</i> และ <i>Pyricularia oryzae</i>	โรคน้ำคอดิน และโรคไหม้ข้าว	Homma et al., 1989
Zwittermicin A	<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>Phytophthora medicaginis</i> และ <i>P. aphanidermatum</i>	โรคน้ำคอดิน	Smith et al., 1993

ที่มา: Pal et al., (2006)

2.6.3 การเป็นปรสิต (parasitism)

กระบวนการนี้เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตหนึ่งใช้ประโยชน์จากอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่ง โดยเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิดอาจมีเชื้อปรสิตเข้าไปดูดกินอาหารทำให้อ่อนแอและตายในที่สุด จึงนำเชื้อปรสิตนั้นมาควบคุมโรคพืชได้ เชื้อราที่เป็นปรสิตกับเชื้อราอีกชนิดจะเรียกว่า mycoparasite โดยเชื้อราบางชนิดเป็นปรสิตต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น เชื้อราจันัส *Cladobotryum* ที่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและเป็นปรสิตต่อ *basidiomycetes* มีรายงาน *C. mycophilum* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราเหตุโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *F. solani*, *Phytophthora parasitica*, *P. capsici*, *Pythium aphanidermatum* และ *Mycosphaerella melonis* (Dos Santos et al., 2019)

2.6.4 การชักนำระบบการต้านทานของพืช (induction of systemic resistance in plant)

พืชมีการตอบสนองต่อสิ่งรบกวนในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย ได้แก่ แสง โชน้ำ ธาตุอาหาร อากาศ อุณหภูมิ แสง ความเครียดทางกายภาพ น้ำและสารอาหาร นอกจากนั้นพืชยังตอบสนองต่อความหลากหลายของสารกระตุ้นที่เกิดจากจุลินทรีย์ทำให้เกิดการชักนำการต้านทาน จุลินทรีย์ไม่ก่อโรคหรือสารเคมีบางชนิดที่ได้จากธรรมชาติหรือสังเคราะห์มากระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโดยระบบ ISR (induced systemic resistance) และ SAR (systemic acquired resistance) สิ่งเร้าเหล่านี้สามารถป้องกันพืชโดยการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่ช่วยทำให้เพิ่มความทนทานต่อการติดเชื้อสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ ได้ (Pal et al., 2006) มีงานวิจัยได้ศึกษาสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย SYST2-VOCs จากแบคทีเรีย *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชอยู่บริเวณรากพืช มีคุณสมบัติในการแสดงออกของยีนต้านการเหี่ยวและการผลิตฮอร์โมนพืชเอทิลีนที่ส่งเสริมการเจริญของพืช สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ได้จากแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชอยู่บริเวณรากพืช จึงมีบทบาททั้งสามารถควบคุมโรคพืช ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการชักนำการต้านทานโรคพืช (Tahir et al., 2017)

2.7 ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เชื้อสาเหตุโรคพืชมีอยู่ทุกช่วงระยะการเจริญของพืชจนกระทั่งเก็บเกี่ยว ส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างมาก ผลผลิตกักตุนกำจัดศัตรูพืชจึงมีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมศัตรูพืชที่เข้าบุกรุกเข้าทำลายพืชผลทางการเกษตร อย่างไรก็ตามการใช้ผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชที่มีความอันตรายจะสร้างผลเสียอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการผลักดันให้เกษตรกรใช้ทางเลือกที่ปลอดภัยในการควบคุมศัตรูพืช การนำจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์มาประยุกต์ใช้ทางด้านการเกษตรจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก การชีวภัณฑ์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมศัตรูพืช

การพัฒนาชีวภัณฑ์จุลินทรีย์จะต้องมีส่วนผสมของสารพาและสารเสริมที่ช่วยปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ให้มีความรอดชีวิตจากกระบวนการผลิตชีวภัณฑ์ การเก็บรักษา และสภาวะแวดล้อมที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ นอกจากนี้ยังเป็นตัวช่วยเพิ่มการยึดเกาะระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับศัตรูพืชเป้าหมายได้มากขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และส่วนประกอบแต่ละชนิดในชีวภัณฑ์ต้องไม่ก่อให้เกิดโรค มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม การผลิตชีวภัณฑ์เพื่อการค้าจะต้องคำนึงถึงต้นทุนวิธีการใช้งาน และมีประสิทธิภาพในการควบคุม ในปัจจุบันมีการจำหน่ายชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับใช้ประโยชน์ทางการเกษตรในเชิงพาณิชย์เป็นเวลานาน (Montesinos, 2003)

2.7.1 รูปแบบของชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีหลายรูปแบบเพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการใช้งานและความคงตัวของความมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ ชีวภัณฑ์ทางการค้าแบ่งตามสถานะทางกายภาพได้เป็นแบบแห้ง (dry formulations) และแบบน้ำ (liquid formulations) โดยใช้เทคนิคในกระบวนการผลิตที่หลากหลายซึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมักจะแสดงประสิทธิภาพในการใช้งานได้ดี เนื่องจากพื้นที่ผิวอนุภาคมากขึ้นช่วยให้สามารถเข้าถึงสารออกฤทธิ์ได้ง่ายขึ้น จึงต้องเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ (Gasic & Tanovic, 2013)

2.7.1.1 แบบแห้ง (dry formulation)

ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบแห้งจะมีลักษณะผงและเม็ดโดยมีสารปกป้องเซลล์ทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์เป็นองค์ประกอบ ขนาดอนุภาครูปแบบผงมีขนาดตั้งแต่ 1 ถึง 300 ไมโครเมตร และรูปแบบเม็ดขนาดเล็กและขนาดใหญ่มีขนาด 0.1 ถึง 2.5 และ 6 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งขนาดอนุภาคจะขึ้นอยู่กับวิธีการผลิต เทคนิคในกระบวนการทำแห้งแบบผงของจุลินทรีย์มีหลายวิธีที่ถูกใช้อย่างแพร่หลาย เช่น ไลโอไฟล์ (lyophilize) และการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) เป็นต้น (Bejarano & Puopolo, 2020) วิธีการไลโอไฟล์มักถูกใช้ในการเก็บรักษาการมีชีวิตของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นวิธีการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เช่น แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตรอดในอุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 21 เดือน (Manonmani et al., 2008) ถึงแม้วิธีการไลโอไฟล์จะมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์แต่ไม่เหมาะกับการผลิตปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากกระบวนการผลิตมีต้นทุนสูง (Chávez & Ledebor, 2007) ส่วนวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีการใช้ลมร้อนอุณหภูมิสูงเหมาะกับการใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ (Yáñez-Mendizábal et al., 2012) ส่วนเทคนิคการผลิตแบบเม็ดจะมีการผสมสารพาและเซลล์แขวนลอยจุลินทรีย์แล้วอัดเม็ดผ่านตะแกรงให้ได้ขนาดอนุภาคที่ต้องการแล้วอบแห้งและมีวิธีการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้ส่วนผสมของ sodium alginate ผสมกับสารพาโพลิเมอร์หยดลงสาร

แขวนลอย CaCl_2 จะได้จุลินทรีย์รูปแบบเม็ดแล้วนำไปอบแห้ง (Locatelli et al., 2018) รูปแบบชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิบัติแบบแห้งที่มีในชีวภัณฑ์ทางการค้า ได้แก่ รูปแบบฝุ่นผง (dusts; DP), รูปแบบแบบเม็ด (granules; GR) และรูปแบบผงผสมน้ำ (wetable powders; WP) (Gasic & Tanovic, 2013)

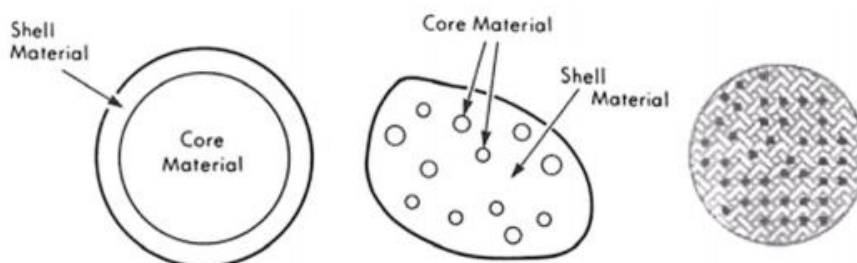
2.7.1.2 แบบน้ำ (liquid formulations)

ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิบัติแบบน้ำจะมีการนำเซลล์แขวนลอยจุลินทรีย์ปฏิบัติซึ่งอาจใช้จุลินทรีย์เซลล์อิสระที่ได้จากการเพาะเลี้ยงหรือจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงเซลล์ผสมกระจายในส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น น้ำ แร่ธาตุ น้ำมันชีวภาพ และวัสดุกลุ่มโพลิเมอร์ ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิบัติแบบน้ำมีหลายประเภท เช่น แบบอิมัลชัน (emulsions) เกิดจากน้ำมันกระจายตัวในน้ำ (o/w) หรือน้ำกระจายตัวในน้ำมัน (w/o) ซึ่งต้องเลือกสารช่วยอิมัลชันให้เหมาะสมเพื่อความคงตัวแต่น้ำมันหรือสารอิมัลชันบางชนิดอาจมีผลเสียต่อพืชและความคงตัวของความรอดชีวิตของจุลินทรีย์ต่ำ แบบสารแขวนลอยเข้มข้น (suspension concentrate; SC) ส่วนของแข็งกระจายตัวอยู่ในรูปของเหลว อนุภาคที่เป็นของแข็งจะไม่ถูกละลายในของเหลว ดังนั้นก่อนนำไปใช้ต้องทำให้ส่วนผสมกระจายอย่างสม่ำเสมอ (Gasic & Tanovic, 2013) มีงานวิจัยศึกษาการพัฒนาชีวภัณฑ์ *Pseudomonas aeruginosa* Pf1 แบบน้ำในการยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่าเซลล์แขวนลอย *P. aeruginosa* Pf1 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) และเติม 10 มิลลิโมลาร์ กลีเซอรอล (glycerol) สามารถคงความมีชีวิตรอดได้นาน 180 วัน โดยมีจำนวนเซลล์ 9.50×10^7 CFU/มิลลิลิตร และยังสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ (Manikandan et al., 2010)

2.8 การพัฒนาชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิบัติด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูล

ไมโครเอนแคปซูลเป็นเทคนิคเกี่ยวกับการตรึงสารโดยใช้วัสดุโพลิเมอร์เคลือบบางหรือส่วนผสมอื่น ๆ ห่อหุ้มสารให้เป็นอนุภาคของแข็งหรือการห่อหุ้มของเหลวเอาไว้ ซึ่งมีขนาดอนุภาคไมโครแคปซูลอยู่ในช่วง 1 ถึง 1000 ไมโครเมตร โครงสร้างไมโครแคปซูลจะประกอบด้วยส่วนสารห่อหุ้มซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ เรียกว่า วัสดุห่อหุ้ม (shell material) ส่วนสารที่ถูกห่อหุ้มจะเรียกว่า วัสดุแกน (core material) ประเภทของไมโครแคปซูลจะขึ้นอยู่กับลักษณะของสารที่ถูกห่อหุ้ม สารที่ใช้ห่อหุ้ม และวิธีการผลิต โดยมี 3 ประเภท คือ แบบโมนิวเคลียร์ (mononuclear core) วัสดุแกนทั้งหมดจะถูกห่อหุ้มด้วยวัสดุห่อหุ้ม แบบมัลตินิวเคลียร์ (multinuclear core) วัสดุแกนเล็ก ๆ จำนวนมากถูกห่อหุ้มด้วยวัสดุห่อหุ้ม และแบบการห่อหุ้มภายในแมทริกซ์ (matrix encapsulation) วัสดุแกนจะแทรกอยู่ในวัสดุห่อหุ้ม (ภาพที่ 2) ในการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์จะมีวัสดุโพลิเมอร์ที่ห่อหุ้มอยู่เปรียบเสมือนฟิล์มที่ช่วยปกป้องเซลล์ให้

คงความมีชีวิตรอดและช่วยป้องกันจุลินทรีย์ปฏิบัติจากปัจจัยรุนแรงทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และเป็นกรดต่าง นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยของเซลล์ได้ เทคนิคไมโครเอนแคปซูลชั้นได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น เกษษกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ เวชสำอาง อาหาร และการเกษตร เป็นต้น (Rathore et al., 2013; Sanjoy et al., 2011) จากการควบคุมโดยชีววิธีจึงมีพัฒนาชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิบัติโดยใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูลชั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิบัติ โดยเซลล์จุลินทรีย์ปฏิบัติจะถูกห่อหุ้มเพื่อป้องกันการสลายตัวของเซลล์ที่เกิดจากปัจจัยสภาพแวดล้อมภายนอก ได้แก่ แสง ความร้อน ความชื้น การเกิดออกซิเดชัน การระเหย การปนเปื้อน และควบคุมการปลดปล่อยเซลล์สู่สภาพแวดล้อมภายนอกได้ ในขณะเดียวกันยังคงอัตราการเจริญเติบโตและ กิจกรรมเมตาบอลิซึมไว้ ทำให้เพิ่มอายุการเก็บรักษาเป็นระยะเวลาอันยาวนานขึ้นอีกด้วย เทคนิคไมโครเอนแคปซูลชั้นยังช่วยแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นกับเทคนิคการตรึงเซลล์ด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น การจำกัดปริมาณเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม การรั่วไหลของอนุภาค ความคงตัวของความรอดชีวิตของเซลล์ต่ำ การปนเปื้อน และมีข้อจำกัดในการบรรจุและเคลื่อนย้าย (Park & Chang, 2000)



ภาพที่ 2 ลักษณะของไมโครแคปซูล

(ก) แบบโมนิวเคลียร์ (mononuclear core)

(ข) แบบมัลตินิวเคลียร์ (multinuclear core)

(ค) แบบการห่อหุ้มภายในแมทริกซ์ (matrix encapsulation)

ที่มา: Sanjoy et al., (2011)

2.8.1 วัสดุสำหรับการผลิตชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน

การผลิตไมโครแคปซูลสำหรับการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความคงตัวจะต้องเลือกวัสดุห่อหุ้มที่เหมาะสม มีการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของโพลีเมอร์ที่เป็นวัสดุห่อหุ้มจะมีความสำคัญต่อคุณสมบัติของไมโครแคปซูล ซึ่งการใช้วัสดุโพลีเมอร์ที่สามารถละลายน้ำได้จะช่วยให้การซึมผ่านของสารอาหารและสารเมแทบอไลต์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ดีเหมาะสมต่อการทำงานของเซลล์จุลินทรีย์ที่ตรึงเอาไว้ โดยวัสดุพอลิเมอร์ที่สามารถละลายน้ำมีทั้งประเภทที่ได้จากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ พอลิเมอร์สังเคราะห์จะให้ความแข็งแรงสูงและมีเสถียรภาพทางเคมีที่ดี แต่การใช้โพลีเมอร์ธรรมชาติจะทำให้ลดความอันตรายต่อความสมบูรณ์และความมีชีวิตรอดของเซลล์จุลินทรีย์ได้ดีกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ธรรมชาติ เช่น อัลจีเนต (alginate) คาราจีแนน (carrageenan) อาการ์ (agar) หรือ อากาโรส (agarose) เจลแลนแกม (gellan gum) กัวร์แกม (guar gum) อากาเซียแกม (acacia gum) แป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose) เพคติน (pectin) ลิกนิน (lignin) และไคโตซาน (chitosan) เป็นต้น รวมทั้งกลุ่มโพลีเปปไทด์ เช่น poly-L-lysine กลุ่มโปรตีน เช่น เจลาติน (gelatin) หรือเวย์ (whey) กลุ่มไขมัน เช่น แวกซ์ (wax) (John et al., 2011; Rathore et al., 2013) วัสดุที่ใช้ในเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันแต่ละชนิดจะมีลักษณะแตกต่างกัน ดังตัวอย่างในตารางที่ 3 ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้วัสดุห่อหุ้มให้เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ปฏิบัติเพื่อประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์



ตารางที่ 3 โพลีเมอร์ทั่วไปที่ใช้ในเทคนิคไมโครเอนแคปซูลชั้นของเซลล์จุลินทรีย์

โพลีเมอร์	แหล่งที่มา	โครงสร้างเคมี	กลไกการแข็งตัว	หมายเหตุ	อ้างอิง
agar	สาหร่ายสีแดง	agarbiiose backbone กับ alternating 1, 3-linked 3-D-galactopyranose และ 1, 4-linked 3, 6-anhydro- α -L-galactopyranose	แข็งตัวด้วยความร้อน	- ทนต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ - ความแข็งแรงต่ำ - ต้นทุนสูง	Olguin, 2012; and Rosevear, 1984
k-Carrageenan	สาหร่ายสีแดง	alternating 1-3 linked β -D-galactopyranose 1-4 linked α -D-galactopyranose units	แข็งตัวด้วยความร้อนและการกระตุ้นด้วยไอออนของโพแทสเซียมและแคลเซียม	- มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากมีโพแทสเซียมมากเกินไป	Adhikari et al., 2000, Olguin, 2012; Rokka and Rantamaki, 2010; Yu et al., 2002
starch	ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าว บาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต และอื่น ๆ	amylose และ amylopectin units เชื่อมกันด้วยพันธะ glycosidic	แข็งตัวด้วยความร้อน	- มักจะผสมกับ alginate เพื่อการปกป้องที่ดีต่อเซลล์แบคทีเรียและการแพร่กระจายที่เหมาะสม - สลายตัวภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและมีเอนไซม์ตับอ่อนใน GIT - แบ่งที่ทนต่อการใช้เป็นพอลิเมอร์ห่อหุ้มโปรไบโอติก	Mortazavian et al., 2007; Anal and Singh 2007; Jankowski et al., 1997; O'Riordan et al., 2001, Sajilata et al., 2006; Sultana et al., 2000
chitosan	สัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง	linear polysaccharide ของ glucosamine units	แข็งตัวเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีไอออน	- พบว่าลดความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม - ส่วนใหญ่มักจะใช้สำหรับห่อหุ้มอนุภาคที่มีความเข้มข้นต่ำ	Chavarri et al., 2010; Krasaekoopt et al., 2003; Olguin, 2003
gellan gum	แบคทีเรีย <i>Sphingomonas elodea</i>	linear polysaccharide ประกอบด้วย หน่วยของ glucose, glucuronic acid, glucose และ rhamnose	แข็งตัวด้วยความร้อนและการกระตุ้นด้วยไอออนบวก	- 2 ประเภทหลักของ gellan gum ได้แก่ acetylated (เจลไม่แข็งและยืดหยุ่น) และ deacetylated (เจลแข็งและเปราะ) - สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงของกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อ - ทนกรด	Moslemy et al., 2002; Muthukumara samy et al., 2006

ที่มา: Rathore et al., (2013)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

โพลีเมอร์	แหล่งที่มา	โครงสร้างเคมี	กลไกการ แข็งตัว	หมายเหตุ	อ้างอิง
alginate	สาหร่ายสี น้ำตาล	linear polysaccharide ของ D-mannuronic และ L-guluronic acids	แข็งตัวเมื่ออยู่ใน สภาวะที่มี ไอออนอะตอม หรือหมู่ที่มี วาเลนซี 2 เช่น แคลเซียม	- ไม่เป็นพิษ - ต้นทุนต่ำ - ไวต่อสารที่ สามารถจับแร่ธาตุ ประจุบวกได้และ ไม่ทำให้เกิดเจล เมื่ออยู่ในสภาวะที่ เป็นกรด สามารถ ทำให้แคปซูล เสียหายได้	Chan et al., 2011; Chandramouli et al., 2004; Ding and Shah 2007; Gouin, 2004; Mandal et al., 2006; Olguin 2012, Prevost and Divies, 1992; Qi et al., 2006; Rowley et al., 1999; Shah and Ravula, 2000; Smidsrod and SkjakBræk, 1990
xanthan- gum	แบคทีเรีย <i>Xanthomonas campestris</i>	glucose, mannose และ glucuronic acid	แข็งตัวเมื่ออยู่ใน สภาวะที่มี ไอออนอะตอม หรือหมู่ที่มี วาเลนซี 2	- ทนต่อการย่อย สลายด้วยเอนไซม์ - ทนต่อความแปร ผันของ pH	Muthukumara samy et al., 2006; Sun and Griffiths, 2000
polyacryla mide	การสังเคราะห์ ทางเคมี	acrylamide subunits	cross-linking using ammonium persulfate, N,N- methylenebi s (acrylamide), N,N,N,N- tetramethyl enediamine	- สัดส่วนของเซลล์ ต่อ acrylamide มีผลต่อความแข็ง ของเจล - เจลมีรูพรุนมาก และมีปริมาณน้ำสูง - การเกิด พอลิเมอร์ไครเซชัน ทำให้เกิดความ เสียหายอย่าง รุนแรงต่อผนังเซลล์ และสูญเสียความมี ชีวิตของเซลล์	Calvet et al., 2004; Wyss et al., 2004

ที่มา: Rathore et al., (2013)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

โพลีเมอร์	แหล่งที่มา	โครงสร้างเคมี	กลไกการแข็งตัว	หมายเหตุ	อ้างอิง
gelatin	collagen	glycine proline และ 4- hydroxyproline residues	- แข็งตัวด้วย ความร้อน - การเชื่อมโยงพอลิเมอร์โดยใช้ formaldehyde หรือ glutaraldehyde - การใช้แรงดัน และการฉายรังสี	- สามารถใช้ในการ ห่อหุ้มเพียงชนิด เดียวหรือใช้ ร่วมกับโพลีเมอร์ ชนิดอื่น - มีประโยชน์ใน การสร้างโครงสร้าง ปฏิสัมพันธ์ ที่แข็งแกร่งกับ anionic polymer เช่น gellan gum	Annan et al., 2008; da Silva and Pinto, 2012; Hyndman et al., 1993
โปรตีนนม (casein, whey protein)	นม	lactose และ soluble proteins	สำหรับ casein กรดทำให้เกิดการ แข็งตัวและ สำหรับ whey protein ความ ร้อนทำให้แข็งตัว	- มีคุณสมบัติทำให้ เกิดเจลได้ดี - ใช้สำหรับการ ห่อหุ้มเซลล์ จุลินทรีย์ โปรไบโอติก	De Castro- Cislaghi et al., 2012; Doherty et al., 2011; Hébrard et al., 2006; Livney 2010; Millqvist- Fureby et al., 2001
polyvinyl alcohol (PVA)		vinyl alcohol subunits	cross-linking using boric acid	- จุลินทรีย์ที่อยู่ใน เมทริกซ์ PVA อาจได้รับความ เสียหายอย่าง รุนแรงจากกรดบอ ริกในระหว่าง กระบวนการ เตรียม - ความเป็นพิษ สามารถลดลงได้ โดยการแทนที่กรด บอริกด้วยโซเดียม ซัลเฟตสำหรับ ปฏิกิริยาเชื่อมโยง พอลิเมอร์	Gao et al., 2004

ที่มา: Rathore et al., (2013)

2.8.2 วิธีการผลิตไมโครเอนแคปซูล

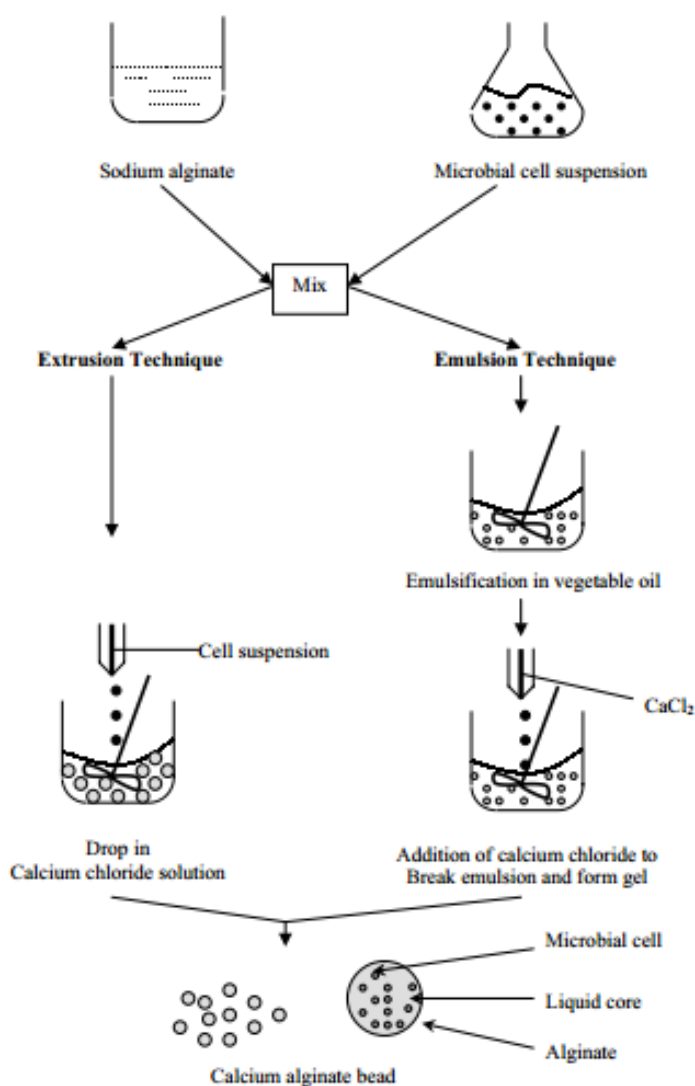
วิธีการผลิตไมโครเอนแคปซูลจะต้องมีวิธีดำเนินการที่ไม่ส่งผลเสียต่อเซลล์จุลินทรีย์และทำให้เซลล์มีความเสถียรภาพเพื่อสนับสนุนการเจริญและการเก็บรักษาความมีชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ได้ในระยะยาว ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการทดสอบเทคนิคต่าง ๆ ในการผลิตไมโครเอนแคปซูล ได้แก่ เอ็กซ์ทรูชัน (extrusion) โคอะเซอร์เวชัน (coacervation) อิมัลซิฟิเคชัน (emulsification) และการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) วิธีการผลิตไมโครเอนแคปซูลที่เลือกใช้จำเป็นต้องคำนึงถึงความเสียหายของเซลล์ให้น้อยที่สุดและการรอดชีวิตของเซลล์ รวมทั้งต้นทุนการผลิตที่สามารถยอมรับได้ (Rathore et al., 2013)

2.8.2.1 วิธีเอ็กซ์ทรูชัน (extrusion)

เป็นวิธีการทั่วไปสำหรับการผลิตไมโครเอนแคปซูลของเซลล์จุลินทรีย์ โดยผสมสารหล่อหุ้มที่เป็นโพลีเมอร์กับเชื้อจุลินทรีย์แล้วอัดผ่านรูเป็นหยดลงในสารละลายที่ตัวเชื่อมทำให้เกิดเม็ดเจล (ภาพที่ 3) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อขนาดของไมโครแคปซูลที่ผลิตด้วยวิธีนี้ได้แก่ เส้นผ่าศูนย์กลางของรูที่ปล่อยเชื้อ อัตราการไหลและความหนืดของสารละลายโพลีเมอร์ ความสูงหรือระยะห่างปล่อยเชื้อลงจากช่องไปยังสารละลายที่ทำให้เชื่อมกันเป็นเม็ดและความเข้มข้นและอุณหภูมิของสารละลายโพลีเมอร์ (Brun-Graepi et al., 2011) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีกระบวนการผลิตง่าย ต้นทุนต่ำ และยังเป็นวิธีที่มีผลกระทบต่ออายุรอดของจุลินทรีย์ (De Vos et al., 2010) แต่ยังเป็นวิธีที่มีข้อจำกัดในการผลิตไมโครแคปซูลที่มีขนาดน้อยกว่า 500 ไมโครเมตร (Reis et al., 2006) และสารละลายโพลีเมอร์ที่มีความหนืดปานกลางจึงต้องใช้หัวฉีดที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่กระบวนการผลิตช้า (Burgain et al., 2011)

2.8.2.2 วิธีการอิมัลซิฟิเคชัน (emulsification)

กระบวนการทางเคมีเกี่ยวกับการทำให้เซลล์จุลินทรีย์และสารละลายโพลีเมอร์ที่เป็นของเหลวแตกตัวแพร่กระจายในน้ำมัน ส่วนผสมจะถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกันอยู่ในรูปแบบน้ำในน้ำมัน (water-in-oil หรือ w/o) ด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิวและการผสมให้เข้ากัน เมื่อมีการสร้างอิมัลชันน้ำในน้ำมันส่วนวัสดุโพลีเมอร์ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้จะไม่เกิดการละลายแต่โพลีเมอร์จะเกิดอนุภาคเล็ก ๆ ในน้ำมัน (ภาพที่ 3) ขนาดของไมโครแคปซูลจะขึ้นอยู่กับจากความเร็วในการตีปั่นผสมให้เข้ากัน ชนิดของวัสดุโพลีเมอร์ อัตราการเติมสารละลายโพลีเมอร์ และความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์ ขนาดของอนุภาคจะน้อยกว่า 300 ไมโครเมตร สามารถช่วยให้จุลินทรีย์อยู่รอดได้ 80-95 เปอร์เซ็นต์ แต่เป็นวิธีที่ค่าใช้จ่ายสูง (Burgain et al., 2011; Krasaekoopt et al., 2003)



ภาพที่ 3 แผนผังกระบวนการทำไมโครเอนแคปซูลขึ้นด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชันและอิมัลชัน
 ที่มา: Krasaekoopt et al., (2003)

2.8.2.3 วิธีการโคอะเซเวชัน (coacervation)

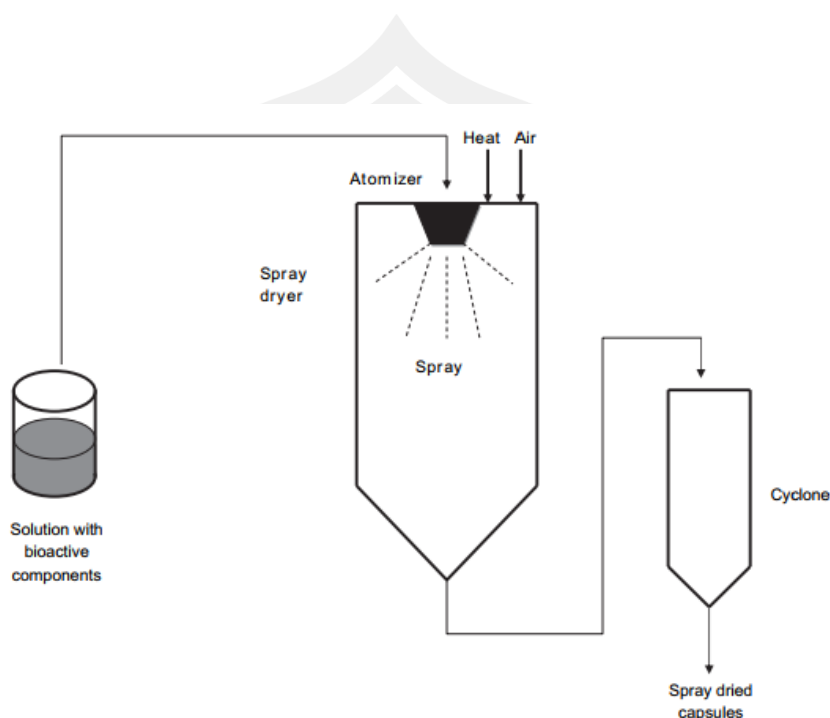
เทคนิคนี้จะใช้การแยกตัวจักรของโพลิเมอร์ที่มี 1 ภูมิภาคหรือมากกว่า 1 ภูมิภาค โดยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ หรือองค์ประกอบของสารละลาย นำไปสู่การแยกโพลิเมอร์ส่วนประกอบหลักและตัวทำละลาย เกิดการสะสมของการเกาะตัวของสารละลายพอลิเมอร์รอบวัสดุแกนกลางทำให้เกิดเป็นไมโครแคปซูล เทคนิคนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและสามารถควบคุมการปลดปล่อยของสารได้จากการอาศัยปัจจัยต่าง ๆ

เช่น อุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีการโคอะเซอเวชันยังมีค่าใช้จ่ายสูงและไม่เหมาะสำหรับการผลิตไมโครแคปซูลที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก (Freitas et al., 2005; John et al., 2011)

2.8.2.4 วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying)

เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยสามารถใช้ในการตรึงจุลินทรีย์ในสารละลาย โพลีเมอร์ด้วยการพ่นส่วนผสมรูปแบบของเหลวและการระเหยน้ำอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยลมร้อนด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมทำให้ได้ไมโครแคปซูลของจุลินทรีย์ในรูปแบบผงแห้ง ซึ่งมีปัจจัยในการปรับสภาวะการทำแห้งแบบพ่นฝอย ได้แก่ อัตราความเร็วในการฉีดพ่น แรงดันอากาศ อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าและอุณหภูมิลมร้อนออก ความหนืดและชนิดสารที่ถูกพ่น เป็นต้น เพื่อให้เกิดไมโครแคปซูลในรูปแบบสมบูรณ์ การปรับอุณหภูมิของอากาศขาเข้าที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากหากอุณหภูมิต่ำจะทำให้อัตราการระเหยน้ำลดลง ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดไมโครแคปซูลที่มีผนังหนาและมีคุณสมบัติการไหลในระหว่างการผลิตไม่ดี แต่หากใช้อุณหภูมิสูงเกินการระเหยของความชื้นเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้เกิดรอยร้าวที่ผนังของไมโครแคปซูลและอาจส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ได้ (Brun-Graeppe et al., 2011; Gouin, 2004; Ma et al., 2015; Rodríguez-Huezo et al., 2007)

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มที่ดี สามารถผลิตไมโครแคปซูลได้ในระดับอุตสาหกรรม และมีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่วิธีการนี้จะมีข้อจำกัดต่อผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อความร้อนที่ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ระเหยหรือสลายไปได้ ในการตรึงจุลินทรีย์ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยจึงมักพบในแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Ma et al., 2015; Meng et al., 2015) นอกจากนี้วิธีนี้จะถูกใช้กับการตรึงจุลินทรีย์แล้วยังมีการนำไปใช้ในการห่อหุ้มวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรส ไขมัน น้ำมันหอมระเหย และรงควัตถุ เป็นต้น (Lucas et al., 2020; Obón et al., 2009; Rodea-González et al., 2012)



ภาพที่ 4 แผนผังกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ที่มา: (De Vos et al., 2010)

2.9 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

เชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ถูกศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1872 โดย Cohn (Castillo et al., 2013) สามารถจัดจำแนกอันดับอนุกรมวิธานได้ ดังนี้

Domain Bacteria

Phylum Firmicutes

Order Bacillales

Family Bacillaceae

Genus *Bacillus*

สกุล *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายและมีการนำไปใช้ในเชิงการค้าเป็นอย่างมาก ซึ่งมี 146 สายพันธุ์ที่ระบุไว้ใน 5th edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology กลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถพบได้อย่างแพร่หลายในระบบนิเวศน์ ได้แก่ ดิน น้ำ อากาศ

บนพื้นผิวและบริเวณรอบรากของพืช ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และนอกจากนี้ยังสามารถพบในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง แบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีคุณสมบัติที่หลากหลาย ได้แก่ ตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixing bacteria) การเปลี่ยนสารประกอบไนเตรต (NO_3^-) เป็นสารประกอบไนไตรต์ (NO_2^-) และไดไนโตรเจนมอนอกไซด์ (N_2O) แล้วกลายเป็นไนโตรเจนในบรรยากาศ (denitrifying bacteria) (Castillo *et al.*, 2013) ในจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรีย *Bacillus* มี 5-8 เปอร์เซ็นต์ ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งจะมีโครงสร้างแตกต่างกันออกไป สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* เช่นกลุ่ม peptides, lipopeptides, polyketide compounds, bacteriocins และ siderophores (Stein, 2005) แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* FZB42 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิหลายชนิด ซึ่งสารเมแทบอไลต์บางชนิดสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Chen *et al.*, 2008) บางสายพันธุ์ก่อโรคในแมลง เช่น *B. thuringiensis* จึงมีการนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงเพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืช (Teera-arunsiri *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2016) แบคทีเรียสกุลนี้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น การผลิตผลิตภัณฑ์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารและยา เอนไซม์ที่ช่วยเพิ่มรสชาติและอาหารเสริม และมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Abdhal *et al.*, 2015; Kloepper *et al.*, 2004)

2.9.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี และลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

แบคทีเรีย *Bacillus* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มใหญ่ ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ หรือสภาพบรรยากาศที่ใช้บ่มเชื้อ ยกเว้นบางสายพันธุ์ที่มีโคโลนีขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีขึ้นอยู่กับจำนวนโคโลนีที่สร้างขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของสารอาหารหรือปริมาณอาหารในจานเพาะเชื้อ แบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. pumilus* มักจะแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาที่แปรปรวนสูง โคโลนีมีทั้งแบบโปร่งแสงและทึบแสง ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างท่อน มีขนาดประมาณ $0.5\text{-}1.2 \times 2.5\text{-}10$ ไมโครเมตร ซึ่งเซลล์อาจอยู่เป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย มีการสร้างเอนโดสปอร์จึงทำให้ทนร้อนและทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ ในแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอนโดสปอร์ทั้งขนาดและตำแหน่งการสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์แตกต่างกัน สามารถแบ่งกลุ่ม *Bacillus* โดยขึ้นอยู่กับลักษณะของเอนโดสปอร์ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 แกรมบวก เซลล์รูปร่างท่อน สปอร์รูปร่างกลมรีหรือรูปร่างทรงกระบอก ตำแหน่งของสปอร์อยู่ตรงกลางหรือตรงปลายเซลล์ ซึ่งมีกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ มีความกว้างมากกว่า 1 ไมโครเมตร

ภายในพบ poly-beta-hydroxybutyrate ใน protoplasm ได้แก่ *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. megaterium* และ *B. thuringiensis* และกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก มีความกว้างน้อยกว่า 1 ไมโครเมตร ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* กลุ่มที่ 2 เซลล์โปร่งสามารถย้อมติดสีแกรมได้ทั้งสองสี (gram-variable) สปอร์รูปร่างกลมรี ตำแหน่งของสปอร์อยู่ตรงกลางหรือตรงปลายเซลล์ ได้แก่ *B. alvei*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. popillae* และ *B. stearothermophilus* กลุ่มที่ 3 สามารถย้อมติดสีแกรมได้ทั้งสองสี (gram-variable) สปอร์รูปร่างกลม ตำแหน่งของสปอร์อยู่ตรงค่อนข้างปลายหรือตรงปลายเซลล์ ได้แก่ *B. sphaericus* เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาแบบเพอริทริคัส (peritrichous flagella) มีลักษณะแฟลกเจลลาอยู่รอบเซลล์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส บางสปีชีส์สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะกรดและด่างอยู่ในช่วงพีเอช 2-10 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นวิธีดั้งเดิมในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ ความหลากหลายของการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์จะมีคุณสมบัติทางชีวเคมีแตกต่างกัน (Castillo et al., 2013) (ตารางที่ 4)



ตารางที่ 4 คุณสมบัติที่แตกต่างของแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

คุณสมบัติ	Ba1	Bp	Bs	Bl1	Bc	Bt	Bm1	Bf1	Bf2	Bl2	Bm2	Bb	Ba2
cell diameter > 1.0 μm	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
parasporal crystals	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobic	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Voges Proskauer	+	-	+	+	d	+	+	NG	-	-	-	-	+
egg yolk lecithin's	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
growth in lysozyme	-	d	d	d	+	+	+	ND	-	-	-	-	+
d-glucose	+	+	+	+	+	+	+	NG	+	+	+	-	+
l- arabinose	d	+	+	+	-	-	-	NG	-	+	d	-	-
d-xylose D	d	+	+	+	-	-	-	NG	-	+	d	-	-
d-mannitol	+	+	+	+	-	-	-	NG	+	+	d	-	-
Starch	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Casein	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+
nitrate reduction	+	-	+	+	+	+	-	-	d	d	d	-	+
degradation of tyrosine	-	-	-	-	-	ND	ND	-	d	-	d	+	d
Growth in 7% NaCl	+	+	+	+	+	d	d	-	+	d	d	ND	+
growth 10°C	ND	+	d	-	d	d	d	+	d	ND	+	-	-
growth 50°C	d	d	d	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
growth 55°C	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
citrate	d	+	+	+	+	+	d	-	-	-	+	-	d
propionate	ND	-	-	+	ND	ND	ND	-	-	-	ND	-	ND

หมายเหตุ Ba1= *B. amyloliquefaciens*, Bp= *B. pumilus*, Bs= *B. subtilis*, Bl1= *B. licheniformis*,
Bc= *B. cereus*, Bt= *B. thuringiensis*, Bm1= *B. mycoides*, Bf1= *B. fastidiosus*, Bf2= *B. firmus*,
Bl2= *B. lentus*, Bm2= *B. megaterium*, Bb= *B. bodius* และ Ba2= *B. anthracis*
d= substantial proportion of specie differ; ND= Not done; NG= no growth

ที่มา: Castillo et al., (2013)

2.9.2 ความสำคัญของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืช

เชื้อโรคพืชเป็นปัญหาสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร ปัจจุบันได้มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรในการควบคุมเชื้อโรคพืช ถึงแม้ว่าการใช้สารเคมีทางการเกษตรจะมีประสิทธิภาพสูงและใช้งานได้ง่าย แต่ส่งผลเสียอย่างมากต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ดังนั้นจึงมีการใช้สารชีวภัณฑ์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการจัดการโรคพืชซึ่งเป็นวิธีที่ปลอดภัยแบบที่เรียสกุล *Bacillus* มีความสำคัญและถูกนำไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืชมากที่สุด เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและมีการสร้างสปอร์ที่ช่วยให้ทนต่อสภาพแวดล้อมรุนแรง เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาชีวภัณฑ์ที่สามารถเก็บไว้ได้ อีกทั้งยังมีความสามารถในการควบคุมได้อย่างกว้างขวาง (Fan et al., 2018) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สกุล *Bacillus* หลายชนิดพบว่า มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อโรคพืชด้วยกลไกต่าง ๆ ได้แก่ การแข่งขันเพื่อปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ มีการสร้างเอนไซม์ขึ้นภายในเซลล์ (Akhtar et al., 2010) แบบที่เรียสกุล *Bacillus* ในกลุ่มของไรโซแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือพีจีพีอาร์ (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะมีการสร้างสารต้านจุลชีพหลากหลายที่ช่วยปกป้องพืชโดยควบคุมศัตรูพืชได้ หลายชนิดและมีการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหารของพืชและช่วยให้พืชสามารถป้องกันความเครียดที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิต นอกจากนี้ยังมีสร้างสารที่ทำให้กระตุ้นการชักนำการต้านทานในพืช (Shafi et al., 2017)

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* แต่ละชนิดจะมีกลไกการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแตกต่างกันดังเช่นงานวิจัยของ Chowdappa และคณะ (2013) ศึกษาแบคทีเรีย *B. subtilis* OTPB1 มาปลูกเชื้อร่วมกับการปลูกมะเขือเทศเพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Alternaria solani* และ *Phytophthora infestans* และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้งสองได้และมีการเจริญเติบโตทั้งยอด ราก ความแข็งแรงของต้นกล้า และใบของมะเขือเทศเพิ่มขึ้น ตรวจสอบพบระดับฮอร์โมนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ gibberellin A3 (GA3) และ indole-3-acetic acid (IAA) เพิ่มขึ้น และยังพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเอง ได้แก่ peroxidase (PO), polyphenol oxidase (PPO) และ superoxide dismutase เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* มีฤทธิ์สูงในการต้านทานเชื้อราก่อโรค ซึ่งทางองค์การอาหารและยาในประเทศสหรัฐอเมริกาอ้างถือว่า *B. subtilis* เป็นสิ่งมีชีวิตที่ปลอดภัยสามารถใช้ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Shafi et al., 2017)

Ashwini และ Srividya (2014) ได้ศึกษาแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบ ๆ รากของต้นพริก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโรคแอนแทรกโนสในพริกสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1 โดยตรวจสอบกลไกของ *B. subtilis*

พบว่าสามารถผลิต mycolytic enzymes ได้แก่ chitinase, glucanase, cellulase และ carboxymethylcellulose ส่งผลให้เส้นใยและผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคถูกทำลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Fan และคณะ (2017) ได้ศึกษาแบคทีเรีย *B. subtilis* 9407 ในการควบคุมโรค ring rot ในแอปเปิ้ล พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสาร fengycin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม lipopeptide สามารถยับยั้งโรค ring rot ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Botryosphaeria dothidea* ได้ กลไกการทำลายเชื้อราของสารชนิดนี้เกิดขึ้นโดยโครงสร้างเซลล์เปลี่ยนแปลงและผนังเซลล์ของเชื้อรา มีรูรั่วเกิดขึ้น ซึ่งสาร fengycin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชอื่น ๆ ได้ดี

Ben Abdallah และคณะ (2018) ศึกษาแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 32a ที่ปรับตัวอาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืชได้เป็นอย่างดี มีความสามารถควบคุมโรค crown gall มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ทำให้พืชเกิดการเจริญผิดปกติโดยแบ่งเซลล์จนเกิดปมจำนวนมากและสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ siderophore, hydrolytic enzymes, IAA และสามารถละลายฟอสเฟตได้ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่ bacilysin, macrolactin, bacillaene และ diffidin

แบคทีเรีย *B. thuringiensis* ที่มีความสามารถก่อโรคในแมลง ได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชทดแทนสารเคมีทางการเกษตร ซึ่งปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ กิจกรรมทางชีวภาพของแบคทีเรีย *B. thuringiensis* มีความหลากหลายที่เป็นพิษต่อแมลง ได้แก่ cytotoxin vegetative, insecticidal protein, secreted insecticidal protein, thuringiensin และอื่น (Bravo et al., 2011) Dos Santos และคณะ (2009) ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ที่สามารถทำลายหนอน หนอนกระทู้ชนิดต่าง ๆ (*Spodoptera*) ได้แก่ *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides* และ *Spodoptera frugiperda* ซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของฝ้ายและถั่วเหลืองในประเทศบราซิล พบว่ามีแบคทีเรีย 7 ไอโซเลต ที่มีความเป็นพิษในการต่อต้านหนอนกระทู้ทั้งสามชนิดนั้นมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประเมินได้จากค่าความเข้มข้นของ spore crystal protein mixture ที่ทำให้แมลงตายเป็นครึ่งหนึ่งของกลุ่มแมลงที่ทำการทดลอง

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* ที่มีประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชเหล่านี้จึงได้รับความสนใจในการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* ทางการค้าเพื่อให้เกษตรกรสะดวกต่อการนำจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมศัตรูพืช ในปัจจุบันจึงมีชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* ทางการค้าหลายชนิดดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สารชีวภัณฑ์ทางการค้าจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

ชื่อการค้า	แบคทีเรียปฏิปักษ์	บริษัทผู้ผลิต
Avogreen®	<i>B. subtilis</i>	Ocean Agriculture, South Africa
Ballad®		AgraQuest Inc., USA
Bio safe®		Lab. Biocontrole Farroupilha, Brazil
Biosubtilin		Biotech International Ltd., India
Cease®		BioWorks Inc., USA
Companion®		Growth Products Ltd., USA
Ecoshot		Kumiai Chemical Industry, Japan
FZB 24®WG		ABiTEP GmbH, Germany
HiStick N/T® /		Becker Underwood, USA and
Subtilex® / Pro-Mix®		Premier Horticulture Inc., Canada
Kodiak®		Gustafson Inc., USA
Rhapsody®		AgraQuest Inc., USA
Rhizo Plus®		ABiTEP GmbH, Germany
Serenade®		AgraQuest Inc., USA
Ballad Plus i Sonata®	<i>B. pumilus</i>	Bayer CropScience, USA
Yield Shield®		
RhizoVital® 42	<i>B. amyloliquefaciens</i>	ABiTEP GmbH, Germany
RhizoVital® 42 TB		
EcoGuard TM	<i>B. licheniformis</i>	Novozymes A/S, Denmark and
Biofungicide		Novozymes Biologicals, USA
Botrybel	<i>B. velezensis</i>	Agricaldes, Spain

ที่มา: Fira et al., (2018)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

เตรียมพืชทดสอบต้นข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยปักดำในกระถางพลาสติกรูปปิด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ที่มีดินปลูก กระถางละ 3 ต้น ปลูกให้ข้าวมีอายุ 21 และ 28 วัน ก่อนทำการทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ และเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Xoo* แบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และถูกเก็บรักษาในกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar (NGA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นหนึ่ง ซ้ำแล้วเชื้อโดยวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600nm}) ให้มีค่าเท่ากับ 1 หรือความหนาแน่นเซลล์ 10^8 CFU/มิลลิเมตร

ปลูกเชื้อ *Xoo* ด้วยวิธีตัดใบ (clipping method) (Kauffman et al., 1973) โดยใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จุ่มเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *Xoo* ที่เตรียมไว้ดังกล่าวข้างต้น นำมาตัดใบข้าวให้ห่างจากปลายใบ 3-5 เซนติเมตร จากนั้นคลุมถุงทั้งต้นเพื่อกักเก็บความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ สังเกตลักษณะอาการของโรคเป็นเวลา 14 วัน ให้ระดับคะแนนจากพื้นที่ใบข้าวที่ถูกทำลาย (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ระดับอาการการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าว (Hastuti et al., 2012)

ระดับอาการ	ลักษณะอาการ
0	ไม่เกิดแผล
1	เกิดแผล 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบข้าว
3	เกิดแผล 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบข้าว
5	เกิดแผล 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบข้าว
7	เกิดแผล 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบข้าว
9	เกิดแผล 50-100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบข้าวและมีใบแห้งตายทั้งใบ

ประเมินร้อยละการเกิดโรค (percent disease incidence) และดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (disease severity index) โดยมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรคขอบใบแห้งของ}}{\text{จำนวนต้นข้าวทั้งหมด}} \times 100$$

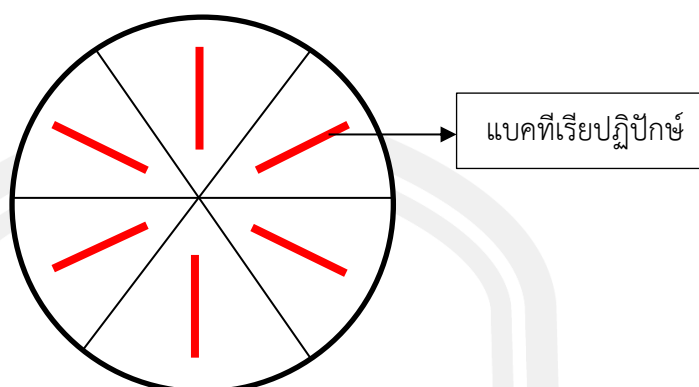
$$\text{ดัชนีความรุนแรงของโรค} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนใบที่แสดงอาการ} \times \text{ระดับอาการ)}}{(\text{จำนวนใบทั้งหมด} \times \text{ระดับคะแนนอาการสูงสุด})} \times 100$$

3.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

3.2.1 การทดสอบด้วยวิธี agar plate inhibition assay

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (วว.) จำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ BR/KHI2, P23L1, IKM1, FDKF5, 1.9, N1, N2, 4.3/6, 4.4/10, 2.3/3, LK2.1, LK2.2, CR607, CR2/5 และ N001-2 ซึ่งถูกเก็บรักษาในกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบ

เตรียมจานอาหารผสมเชื้อ *Xoo* ด้วยเทคนิค pour plate โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *Xoo* ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความหนาแน่นเซลล์ 10^9 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *Xoo* ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อและอยู่ในขณะที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส อัตราส่วน 1:10 เทลงบนจานอาหารปลอดเชื้อปริมาตรจานละ 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นจึงขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะลงบนจานอาหารเป็นลักษณะเส้นตรงยาวประมาณ 2 เซนติเมตร โดยขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 6 ไอโซเลตต่อจานจำนวน 3 ซ้ำ (ภาพที่ 3.1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดบริเวณยับยั้งเป็นหน่วยเซนติเมตร



ภาพที่ 5 แผนภาพจำลองการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของจุลินทรีย์ปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี agar plate inhibition assay

3.2.2 การทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *Xoo* ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อให้มีความหนาแน่นเซลล์ 10^9 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นเกลี่ยเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar (NGA) ด้วยเทคนิค swab plate ที่ไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง และเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลต N1 โดยเฉพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง แล้วมาเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อให้มีความหนาแน่นเซลล์ 10^9 CFU/มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เตรียมไว้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอจนกว่าเซลล์แขวนลอยจะซึมทั่ว paper disc จากนั้นนำไปวางตรงกลางบนจานอาหารที่ได้ปลูกเชื้อ *Xoo* ที่เตรียมไว้ตั้งข้างต้น ทำการทดลองเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมทางลบ (negative control) ได้แก่ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ กรรมวิธีควบคุมทางบวก (positive control) ได้แก่ เชื้อวัณโรคแบคทีเรีย *B. subtilis* DOA24 (กรมวิชาการเกษตร) อัตราการใช้ 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และซิงค์ไทอะโซล อัตราการใช้ 600 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ซึ่งเป็นสารเคมีทางการเกษตรแนะนำในการป้องกันและกำจัดโรคข้าวที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย ปมที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตและตรวจสอบผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเป็นหน่วยเซนติเมตร

3.3 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 ด้วยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ ตรวจสอบลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) การติดสีแกรม ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเอนโดสปอร์ และเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ใช้ไพรเมอร์ 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) และ 1541R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) โดยนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อายุ 24 ชั่วโมง มาเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ องค์ประกอบปฏิกิริยา PCR ซึ่งใช้ PCR master mix (Vivantis, Malaysia) 25 ไมโครลิตร (Taq DNA Polymerase (1.25 unit), ViBuffer A (1X), dNTPs (0.2mM) และ MgCl₂ (1.5mM)) ไพรเมอร์ 27F 1 ไมโครลิตร (10 μmol), ไพรเมอร์ 1541R 1 ไมโครลิตร (10 μmol), DNA template 2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วย nuclease free water ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง thermal cycle สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ดังตารางที่ 7 แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยนำ PCR product ที่ได้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 3 ไมโครลิตร นำมาแยกขนาดบน 1 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรส (agarose gel) ที่มีส่วนประกอบ DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, US) 1 ไมโครลิตร เทียบกับ DNA ladder 1Kb (Vivantis, Malaysia) ภายใต้สภาวะ 1X TAE buffer กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปตรวจภายใต้ UV transillumination และส่ง PCR product เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ แล้วนำมาเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล EzBioCloud จากนั้นทำ multiple alignment และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) วิเคราะห์ผลด้วยวิธี neighbor-joining กำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1000 โดยใช้โปรแกรม MEGA11

ตารางที่ 7 สภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal cycle

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
initial denaturing	94	5.00	1
denaturing	94	0.30	} 30
annealing	52	0.30	
extension	72	0.45	
final extension	72	5.00	1

3.4 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ให้ได้ความหนาแน่นเซลล์ 10^8 CFU/มิลลิลิตร แล้วเกลี่ยเชื้อลงบนจานอาหาร NA และเตรียมสารเคมีทางการเกษตรที่ใช้ในการทดสอบ 9 ชนิด ได้แก่ กลุ่มกำจัดโรคพืช กลุ่มกำจัดวัชพืช และกลุ่มกำจัดแมลงในอัตราที่แนะนำ (ตารางที่ 8) หยดสารเคมีแต่ละชนิดลงบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาด 1×7 เซนติเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปล่อยให้สารเคมีซึมและแห้งหมดทั่วแผ่น จากนั้นนำไปวางลงบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ตั้งข้างต้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นบนจานอาหารทดสอบ

ตารางที่ 8 สารเคมีทางการเกษตรและอัตราแนะนำที่ใช้ในการทดสอบ

ประเภทสารเคมี ทางการเกษตร	ชื่อทางการค้า	ชื่อสามัญ/สารสำคัญ	อัตราการใช้	
กลุ่มกำจัดโรคพืช	อะมิโก้ (amigo)	ฟอสฟิไทลอะลูมิเนียม (fosetyl-aluminium)	50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	
	ไทแบค (thibac)	ซิงค์ไทอะโซล (zincthaizole)	600 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	
	บีม 75WP (beam 75WP)	ไตรไซคลาโซล (tricyclazole)	15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	
	โอมัยซิน (omycin)	วาเลดามัยซิน (validamycin)	40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	
	กรีนไดฟ์ 500EC (greendive 500EC)	ไดฟีโนโคนาโซล (difenoconazole) และ โพรพิโคนาโซล (propiconazole)	10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	
	กลุ่มกำจัดวัชพืช	เลวินเอฟ (levin-f)	คาร์เบนดาซิม (carbendazim)	10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
		พาราควอต (paraquat)	พาราควอต ไดคลอไรด์ (paraquat dichloride)	600 มิลลิลิตรต่อน้ำ 60 ลิตร
คลอแร็ค (clorac)		ควินคลอแรก (quinclorac)	50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	

ตารางที่ 8 สารเคมีทางการเกษตรและอัตราแนะนำที่ใช้ในการทดสอบ (ต่อ)

ประเภทสารเคมี ทางการเกษตร	ชื่อทางการค้า	ชื่อสามัญ/สารสำคัญ	อัตราการใช้
กลุ่มกำจัดแมลง	โปรวาโด (provado)	อิมิดาโคลพริด (imidacloprid)	1.5 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. รูปแบบเชื้อสดในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ

เตรียมพืชทดสอบโดยใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 21 วัน และปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xoo* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 แล้วคลุมถุงตั้งต้นเพื่อกักเก็บความชื้นก่อนทำการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose broth (NGB) เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความหนาแน่นเซลล์ให้ได้ 10^8 CFU/มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ ทดสอบโดยวิธีการฉีดพ่นหลังจากพืชทดสอบทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 24 ชั่วโมง ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสด

ความหนาแน่นเซลล์ 10^8 CFU/มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล

อัตราการใช้ 600 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร (positive control)

กรรมวิธีที่ 3 น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (negative control)

สังเกตอาการโรคทุกวันและหลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 14 วัน จึงประเมินร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรคเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 และประเมินดัชนีการยับยั้งโรค (disease reduction index) โดยมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{ดัชนีการยับยั้งโรค} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

เมื่อ A = ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรคในชุดควบคุม (*Xoo*)

B = ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรคในชุดทดลอง

3.6 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

3.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 บนจานอาหาร NGA ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อลงอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเฉพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความหนาแน่นเซลล์ให้มีค่า OD_{600nm} เท่ากับ 2

3.6.2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ซึ่งประกอบด้วย beef extract 1.5 กรัมต่อลิตร yeast extract 1.5 กรัมต่อลิตร bacteriological peptone 5 กรัมต่อลิตร และ NaCl 5 กรัมต่อลิตร โดยเพิ่มแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส (glucose) หรือซูโครส (sucrose) ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (TOMY ES-315, Japan) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเหลวปริมาณ 500 มิลลิลิตร ในฟาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ใช้กล้าเชื้อที่เตรียมดังข้อ 3.6.1 ปริมาตร 10% (v/v) เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง ทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยหาปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง โดยปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge (Rotina 380, Germany) ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 รอบ ปั่นเหวี่ยง ตกตะกอนเซลล์อีกครั้งก่อนอบในตู้อบลมร้อน (Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้องและชั่งหาน้ำหนักเซลล์โดยบันทึกในหน่วย กรัมต่อลิตร

3.6.3 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ซึ่งประกอบด้วยส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ NB, minerals solution และซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และส่วนของ minerals solution ประกอบด้วย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัมต่อลิตร, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.045 กรัมต่อลิตร, KCl 1 กรัมต่อลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ MnCl_2 0.03 กรัมต่อลิตร ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.22 ไมครอน โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาณ 500 มิลลิลิตร ในฟาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรีย (vegetative cell) และเอนโดสปอร์ ด้วยวิธี dilution plate count ซึ่งการตรวจสอบจำนวนเอนโดสปอร์ต้องกำจัดแบคทีเรีย (vegetative cell) ด้วยวิธีการ heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที บันทึกจำนวนแบคทีเรีย (vegetative cell) ในหน่วย CFU/มิลลิลิตร และเอนโดสปอร์ในหน่วยสปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังนี้

$$\text{CFU/มิลลิลิตร หรือสปอร์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีบนจานอาหาร}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้เพาะเชื้อ} \times \text{dilution}} \times 100$$

ตารางที่ 9 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	องค์ประกอบ
1	NB + minerals solution + ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร
2	NB + minerals solution + ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร
3	NB + minerals solution + ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร
4	NB + minerals solution + ซูโครส 40 กรัมต่อลิตร

3.7 การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของใบแห้งของข้าวด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน

3.7.1 การคัดเลือกองค์ประกอบสารพาที่เหมาะสมต่อการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบั๊กซ์

คัดเลือกองค์ประกอบสารพาที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 โดยเตรียมสารพาแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ ได้แก่ skim milk, maltodextrin, แป้งข้าวโพด (corn starch), แป้งมันสำปะหลัง (tapioca starch) และ sodium alginate ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ตารางที่ 10) ซึ่งสารพาแต่ละชนิดจะเตรียมแยกกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารพา ได้แก่ maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น skim milk นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ใช้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ไอโซเลต N1 ความหนาแน่นเซลล์ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีการ dilution plate count

ตารางที่ 10 องค์ประกอบและอัตราส่วนของสารพาแต่ละชนิด

กรรมวิธี	สารพาและอัตราส่วน
1	skim milk 10 เปอร์เซ็นต์
2	maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์
3	แป้งข้าวโพด 10 เปอร์เซ็นต์
4	แป้งข้าวโพด 20 เปอร์เซ็นต์
5	แป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์
6	แป้งมันสำปะหลัง 20 เปอร์เซ็นต์
7	sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์

3.7.2 การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบั๊กซ์โดยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

พัฒนาสูตรชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 โดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยจำนวน 3 สูตร (ตารางที่ 11) เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่ได้จากการทดลองที่ 3.6.3 แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง ultracentrifuge (Sigma 6-16K, UK) ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 รอบ ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์

อีกครั้ง แล้วจึงนำมาปรับความหนาแน่นเซลล์ให้ได้ 10^9 CFU/มิลลิลิตร เตรียมชีวภัณฑ์ในรูปแบบของเหลวโดยผสมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เตรียมไว้ตั้งข้างต้นกับองค์ประกอบสารพาในแต่ละสูตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบสารพา ได้แก่ maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง สามารถฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น skim milk ที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำชีวภัณฑ์ในรูปแบบของเหลวผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยเครื่อง spray dryer (Buchi mini spray dryer B-290, Switzerland) ใช้อุณหภูมิลมร้อนขาเข้า (air inlet) 145 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขาออก (air outlet) อยู่ระหว่าง 90 ถึง 105 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งน้ำหนักและบรรจุผงชีวภัณฑ์ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยมีการตรวจสอบปริมาณผงชีวภัณฑ์ที่ได้กลับจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย (powder recovery) ซึ่งเทียบจากน้ำหนักผงชีวภัณฑ์ที่ได้และน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในองค์ประกอบชีวภัณฑ์และหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (moisture content) โดยใส่ชีวภัณฑ์ในถ้วยอลูมิเนียมฟอยล์ 1 กรัม แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงชั่งน้ำหนัก โดยมีสูตรคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังนี้

$$\text{ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W_2 - W_1) - (W_3 - W_1)}{W_2 - W_1} \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมฟอยล์ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักชีวภัณฑ์ก่อนอบใน ถ้วยอลูมิเนียมฟอยล์(กรัม)

W_3 = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมฟอยล์+ชีวภัณฑ์หลังอบ (กรัม)

ตารางที่ 11 องค์ประกอบและอัตราส่วนในสูตรชีวภัณฑ์

สูตรชีวภัณฑ์	องค์ประกอบ	อัตราส่วน (เปอร์เซ็นต์)
1	skim milk, maltodextrin และ sodium alginate	10 : 20 : 0.06
2	skim milk, maltodextrin, sodium alginate และแป้งข้าวโพด	10 : 20 : 0.06 : 5
3	skim milk, maltodextrin, sodium alginate และแป้งมันสำปะหลัง	10 : 20 : 0.06 : 5

3.7.3 การประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์

ประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ที่ได้จากการทดลองที่ 3.7.2 ทั้ง 3 สูตร โดยผงชีวภัณฑ์จะถูกบรรจุในถุงอลูมิเนียมพอยล์เก็บที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ของชีวภัณฑ์ตั้งแต่หลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยและชีวภัณฑ์ที่อายุการเก็บทุกเดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน ด้วยวิธีการ dilution plate count คำนวณจำนวนแบคทีเรียโดยใช้สูตรเดียวกันกับการทดลองที่ 3.6.2

3.7.4 ศึกษาลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์

ศึกษาลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ทั้ง 3 สูตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) (Jeol 6480LV, Japan) โดยเตรียมตัวอย่างบนสตัปทองเหลือง (brass stub) ที่ติดคาร์บอนเทปบนผิวหน้า จากนั้นนำไปเคลือบพื้นผิวของตัวอย่างด้วยทองในเครื่อง coating ก่อนนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ความต่างศักย์ไฟฟ้า 20 kV

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ

เตรียมข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 21 วันและปลูกเชื้อ *Xoo* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 แล้วคลุมถุงทั้งต้นเพื่อกักเก็บความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สูตร โดยมีอัตราการใช้ 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ ทดสอบโดยวิธีการฉีดพ่นปริมาตรกระถางละ 20 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 6 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 เปอร์เซ็นต์)

กรรมวิธีที่ 2 ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์)

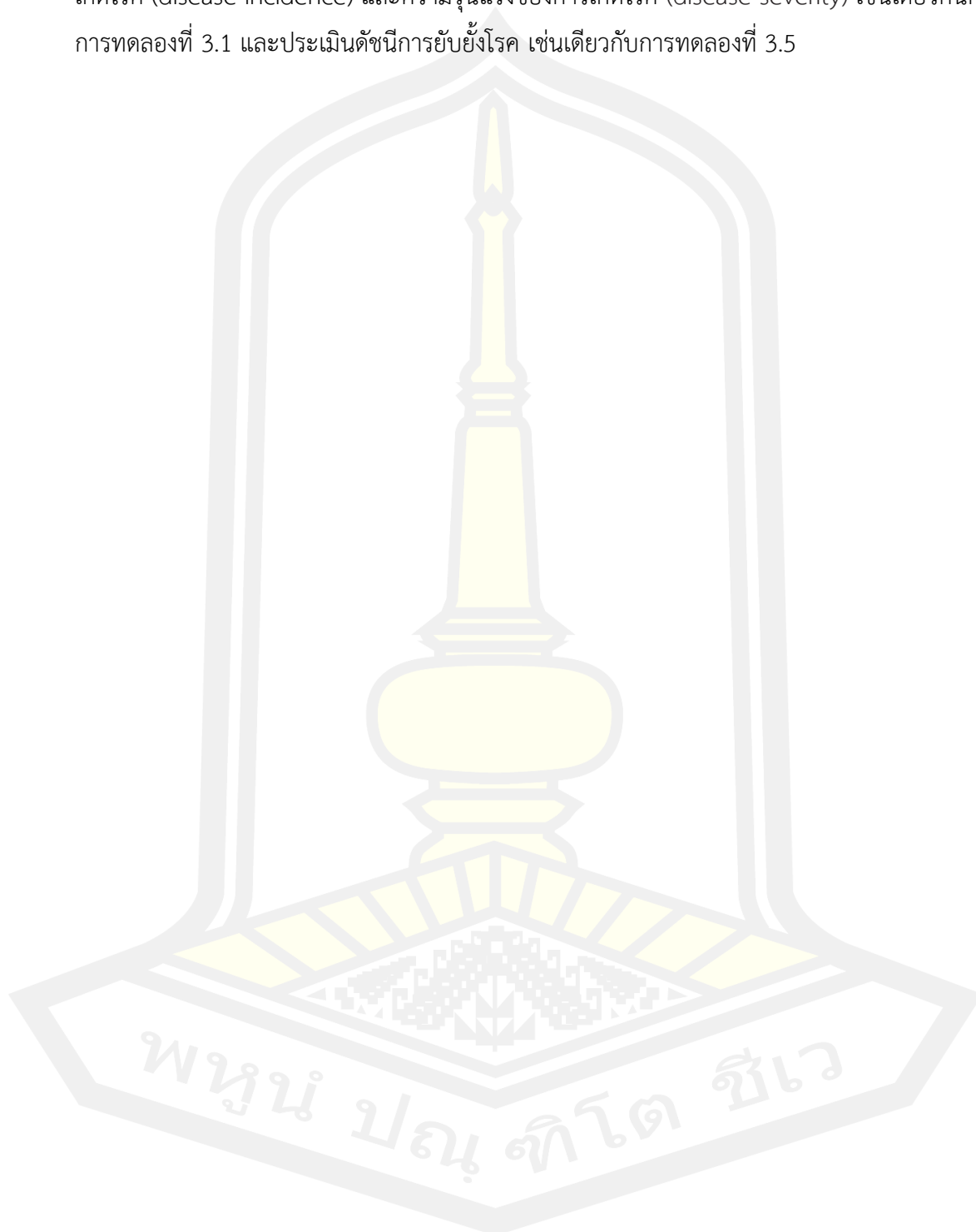
กรรมวิธีที่ 3 ชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์)

กรรมวิธีที่ 4 แบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบเชื้อสด 10^8 CFU/มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 5 สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล อัตรา 600 ลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว

สังเกตอาการโรคทุกวันและหลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 14 วัน แล้วจึงประเมินร้อยละเกิดโรค (disease incidence) และความรุนแรงของการเกิดโรค (disease severity) เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.1 และประเมินดัชนีการยับยั้งโรค เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว โดยทดสอบกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 21 และ 28 วัน ปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีการตัดใบ จากนั้นคลุมถุงตั้งต้นเพื่อกักเก็บความชื้น หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง พบว่าใบข้าวเริ่มมีอาการช้ำน้ำบริเวณปลายใบและเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งรอยโรคสีเหลืองจะพัฒนาไปตามทางยาวของใบโดยเฉพาะบริเวณขอบใบจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือเทา ต้นที่เกิดอาการรุนแรงจะมีอาการเหี่ยวแห้งตายทั้งใบ เมื่อประเมินร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าวเป็นเวลา 14 วัน พบว่าร้อยละการเกิดโรคในข้าวอายุ 21 วัน สูงกว่าข้าวอายุ 28 วัน ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยร้อยละการเกิดโรคในข้าวอายุ 21 และ 28 วัน เท่ากับ 80.95 ± 11.50 และ 76.19 ± 8.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และดัชนีความรุนแรงของโรคในข้าวอายุ 21 วัน สูงกว่าข้าวอายุ 28 วัน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีดัชนีความรุนแรงของโรคในข้าวอายุ 21 และ 28 วัน เท่ากับ 72.75 ± 18.48 และ 36.35 ± 12.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวเมื่อทดสอบกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 21 และ 28 วัน

กรรมวิธี	ร้อยละการเกิดโรค (เปอร์เซ็นต์) ^{1/}	ดัชนีความรุนแรงของโรค (เปอร์เซ็นต์) ^{1/}
ข้าวอายุ 21 วัน	$80.95 \pm 11.50a$	$72.75 \pm 18.48a$
ข้าวอายุ 28 วัน	$76.19 \pm 8.91a$	$36.35 \pm 12.92b$
น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	$0.00 \pm 0.00b$	$0.00 \pm 0.00c$

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $P \leq 0.05$

4.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

4.2.1 การทดสอบด้วยวิธี agar plate inhibition assay

จากการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี agar plate inhibition assay โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบมีจำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ BR/KHI2, P23L1, IKM1, FDKF5, 1.9, N1, N2, 4.3/6, 4.4/10, 2.3/3, LK2.1, LK2.2, CR607, CR2/5 และ N001-2 พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 5 ไอโซเลต สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ โดยบริเวณยับยั้งจะสามารถสังเกตเห็นส่วนใสอยู่รอบโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้สูงสุด มีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.73 ± 0.15 เซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลตอื่น ๆ รองลงมา ได้แก่ แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N2, LK2.2, LK2.1 และ 1.9 มีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.40 ± 0.00 , 0.80 ± 0.10 , 0.77 ± 0.06 และ 0.67 ± 0.15 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13 และ ภาพที่ 6) จากการทดลองการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 นำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวต่อไป



ภาพที่ 6 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวที่ทดสอบด้วยวิธี agar plate inhibition assay โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลต ได้แก่ (1) BR/KHI2, (2) P23L1, (3) IKM1, (4) FDKF5, (5) 1.9, (6) N1, (7) N2, (8) 4.3/6, (9) 4.4/10, (10) 2.3/3, (11) LK2.1, (12) LK2.2, (13) CR607, (14) CR2/5, (15) N001-2

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธี agar plate inhibition assay

ไอโซเลต	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) ^{1/}
1.9	0.67±0.15c
2.313	0.00±0.00d
4.3/6	0.00±0.00d
4.4/10	0.00±0.00d
CR2/5	0.00±0.00d
CR607	0.00±0.00d
BR/KHI2	0.00±0.00d
FDKF5	0.00±0.00d
IKM1	0.00±0.00d
LK2.1	0.77±0.06c
LK2.2	0.80±0.10c
N001-2	0.00±0.00d
N1	1.73±0.15a
N2	1.40±0.00b
P23L1	0.00±0.00d

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) P<0.05

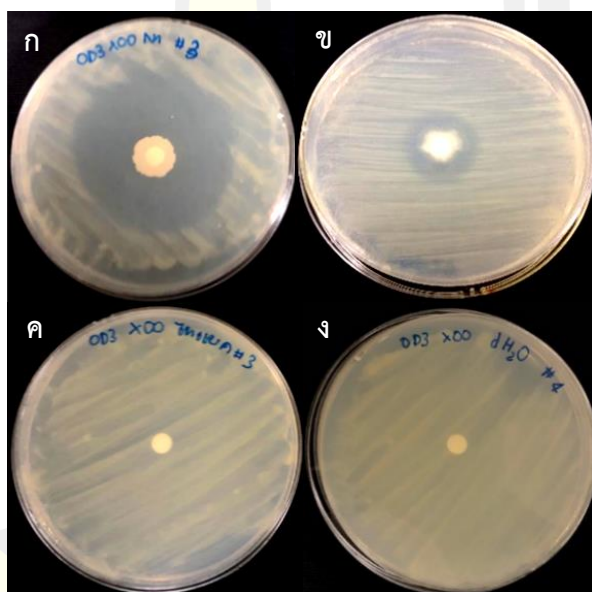
4.2.2 การทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion

จากการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต N1 ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยเทคนิค paper disc diffusion หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต N1 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวสูงสุด สามารถสังเกตเห็นบริเวณใสรอบ paper disc ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 4.76±1.53 เซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของการควบคุมทางบวก (positive control) ได้แก่ เชื้อก้นท์แบคทีเรีย *B. subtilis* DOA24 (กรมวิชาการเกษตร) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 2.06±1.15 เซนติเมตร ส่วนสารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซลไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion

กรรมวิธี	เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) ^{1/}
แบคทีเรียปฏิบั้กซ์ไอโซเลต N1	4.76±1.53a
ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบั้กซ์ <i>B. subtilis</i> DOA24	2.06±1.15b
สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล	0.00±0.00c
น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	0.00±0.00c

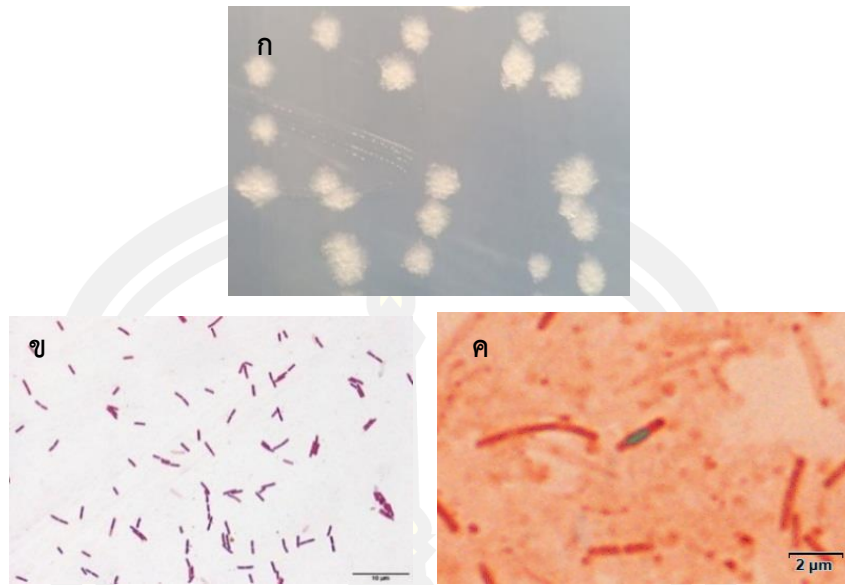
^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $P \leq 0.05$



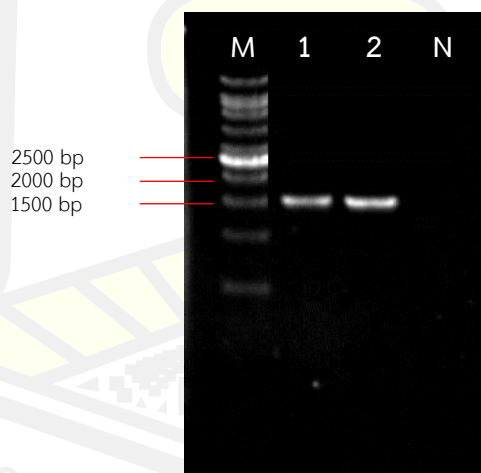
ภาพที่ 7 บริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion (ก) แบคทีเรียปฏิบั้กซ์ไอโซเลต N1 (ข) ชิวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบั้กซ์ DOA24 (กรรมวิชาการเกษตร) (ค) สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล (ง) น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

4.3 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

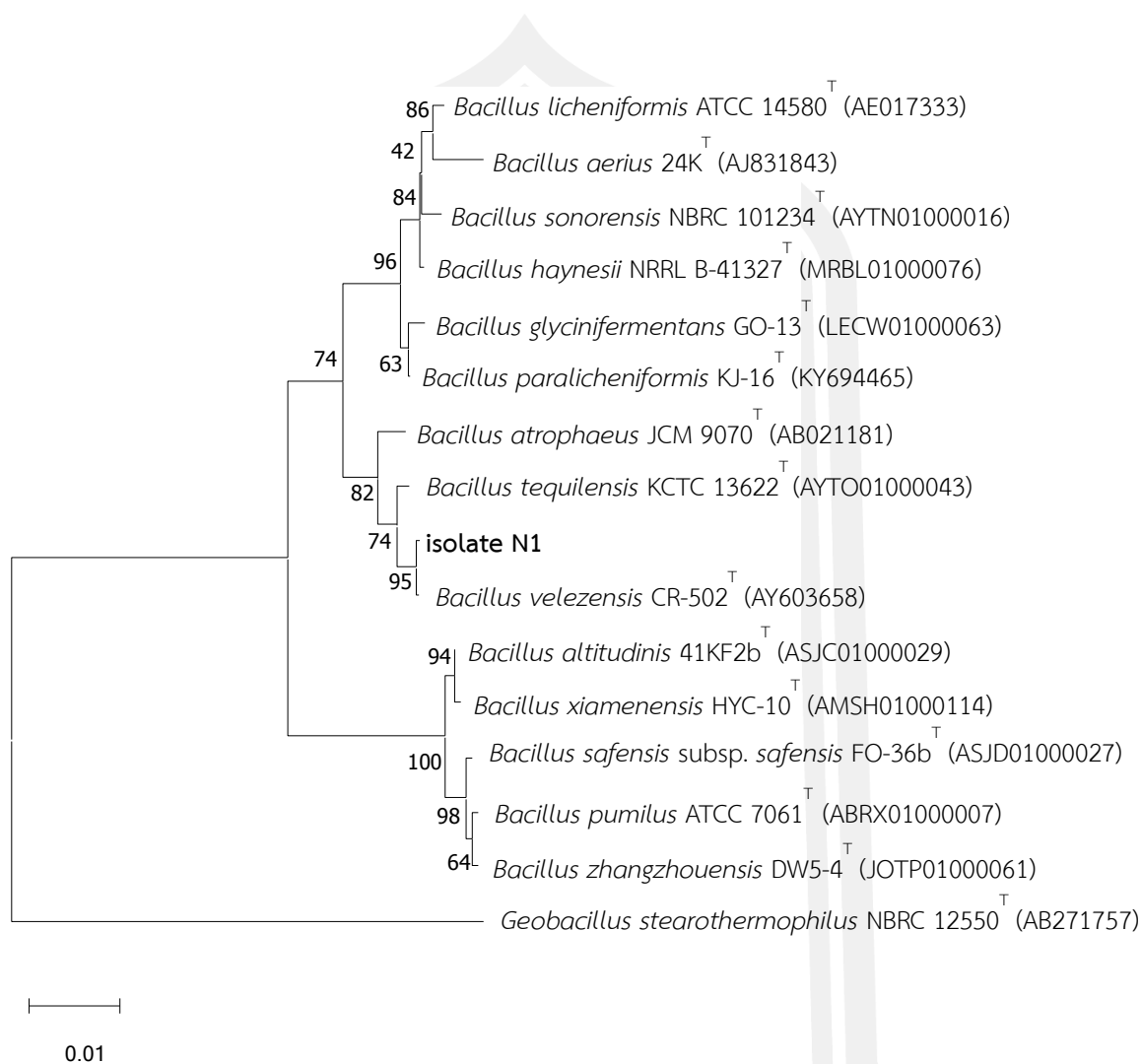
จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 บนจานอาหาร nutrient agar (NA) อายุ 24 ชั่วโมง มีโคโลนีสีขาวขุ่น ไม่โปร่งแสง รูปร่างไม่แน่นอน ขอบโค้งเว้าเล็กน้อย ผิวขรุขระ ราบแบนติดกับอาหาร (ภาพที่ 8ก) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์เป็นรูปท่อน พบทั้งเซลล์เดี่ยวและต่อกัน เป็นสายยาว มีขนาดเซลล์ 1.33 ± 0.3 ไมโครเมตร (ภาพที่ 8ข) มีการสร้างเอนโดสปอร์รูปร่างรี อยู่ตำแหน่งค่อนข้างปลายของเซลล์ (ภาพที่ 8ค) และตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R พบว่ามีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 1,500 คู่เบส เมื่อเทียบขนาดดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 9) เมื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16s rRNA เพื่อจำแนกชนิดระดับสปีชีส์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus velezensis* มีค่าความเหมือน (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงผลในรูปแบบแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1000 (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ข) ลักษณะเซลล์ และ (ค) ลักษณะของเอนโดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,000 เท่า)



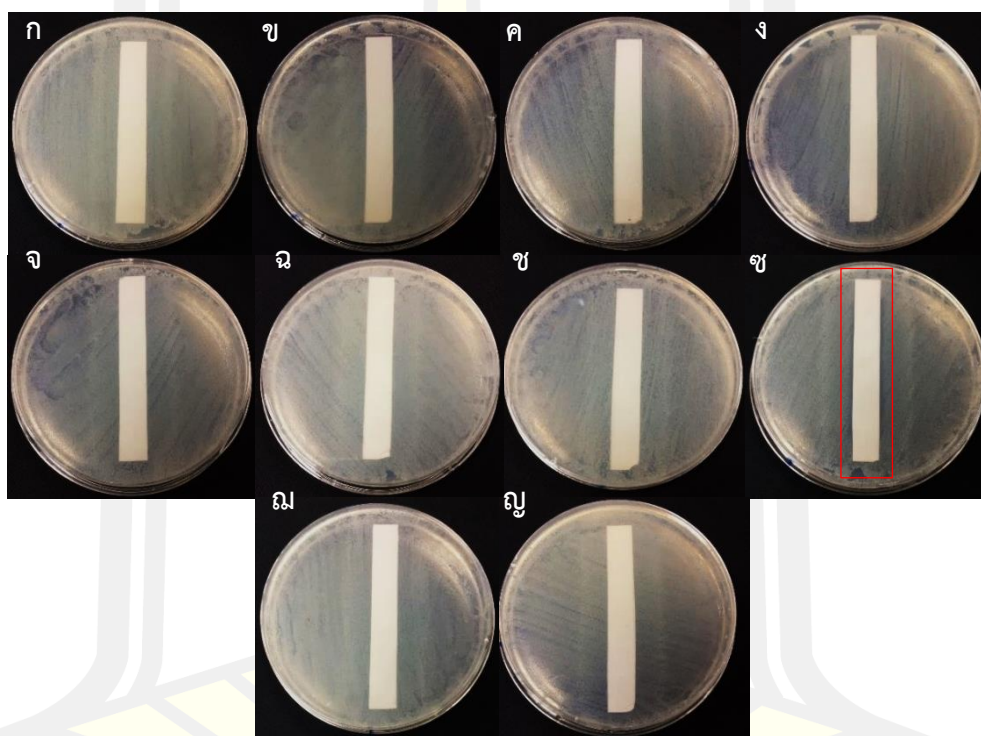
ภาพที่ 9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต N1 ในส่วน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ช่อง M: DNA marker 1kb, ช่อง 1-2: แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต N1 และช่อง N: negative control



ภาพที่ 10 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี neighbor-joining โดยโปรแกรม MEGA11

4.4 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

จากการทดสอบความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 ซึ่งในการทดสอบใช้สารเคมีหลายประเภทที่ใช้ในนาข้าว พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 สามารถทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรที่นำมาทดสอบในอัตราแนะนำ ประเภทกลุ่มกำจัดวัชพืช ได้แก่ อะมิโก้ (amigo) บีม75WP (beam WP75) กรีนไคฟ์ 500EC (greendive 500EC) โอเมย์ซิน (omycin) และไทแบค (thibac) กลุ่มกำจัดวัชพืช ได้แก่ คลอแรค (clorac) เลวินเอฟ (levin F) กลุ่มกำจัดแมลง ได้แก่ โพรวาโด (provado) ยกเว้นสารเคมีกำจัดวัชพืชพาราควอต (paraquat) ที่ไม่สามารถทนทานได้ ซึ่งสามารถสังเกตบริเวณยับยั้งหรือส่วนในระอบกระดาศที่มีพาราควอต (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ความทนทานของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 ต่อสารเคมีทางการเกษตร (ก) อะมิโก้ (ข) บีม75WP (ค) กรีนไคฟ์ 500EC (ง) โอเมย์ซิน (จ) ไทแบค (ฉ) คลอแรค (ช) เลวินเอฟ (ซ) พาราควอต (ฌ) โพรวาโด (ญ) น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus spp.* รูปแบบเชื้อสดในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะรูปแบบเชื้อสดในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว โดยใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 21 วัน ปลูกเชื้อด้วยวิธีการตัดใบประกอบด้วย 4 กรรมวิธี หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 14 วัน พบว่ากรรมวิธีที่ 1 แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุด มีร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 47.62 ± 40.17 และ 23.28 ± 20.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีดัชนีการยับยั้งโรคสูงสุดเท่ากับ 65.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล (positive control) มีร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรค 92.86 ± 8.91 และ 46.82 ± 17.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีดัชนีการยับยั้งโรคเท่ากับ 29.76 เปอร์เซ็นต์ และการใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว (negative control) มีการแสดงอาการโรคมามากสุด ซึ่งมีร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 97.62 ± 6.30 และ 66.66 ± 19.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสดและกรรมวิธีต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

กรรมวิธี ^{1/}	ร้อยละการเกิดโรค (เปอร์เซ็นต์) ^{2/}	ดัชนีความรุนแรงของโรค (เปอร์เซ็นต์) ^{2/}	ดัชนีการยับยั้งโรค (เปอร์เซ็นต์)
แบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลต N1	$47.62 \pm 40.17b$	$23.28 \pm 20.50b$	65.08
ซิงค์ไทอะโซล	$92.86 \pm 8.91a$	$46.82 \pm 17.03a$	29.76
น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	$97.62 \pm 6.30a$	$66.66 \pm 19.48a$	0.00

^{1/} กรรมวิธีที่ 1 แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสดความหนาแน่นเซลล์ 10^8 CFU/มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 2 สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล อัตราการใช้ 600 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร (positive control)
กรรมวิธีที่ 3 เชื้อ Xoo เพียงอย่างเดียว (negative control)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $P \leq 0.05$

4.6 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

4.6.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 เปรียบเทียบการเจริญโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และซูโครส 10 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB + กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงใน NB + ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB + กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และ NB + ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งเท่ากับ 1.06 และ 1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 16)

ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสสูงกว่าการใช้ซูโครสเพียงเล็กน้อยและจำนวนแบคทีเรีย (vegetative cell) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ประกอบด้วยซูโครสมีปริมาณสูงกว่า จึงเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป นอกจากนี้ซูโครสยังมีราคาถูกและหาซื้อได้ง่ายเพื่อการลดต้นทุนการผลิต

ตารางที่ 16 ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ^{1/}	
	NB+กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร	NB+ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร
0	0.31c	0.31c
24	1.07a	1.00a
48	0.93a	0.56b
72	0.93a	0.70b

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $P \leq 0.05$

4.6.2 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth 4 สูตร ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1: NB + minerals solution + ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2: NB + minerals solution + ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3: NB + minerals solution + ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4: NB + minerals solution + ซูโครส 40 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.36 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง รองลงมา ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4, 3 และ 1 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.16, 2.11 และ 1.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 16) จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการตรวจสอบจำนวนเซลล์และเอนโดสปอร์ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 มีจำนวนเซลล์และเอนโดสปอร์สูงสุดเท่ากับ 1.32×10^9 CFU/มิลลิลิตร และ 3.09×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 มีจำนวนเซลล์ 9.88×10^8 CFU/มิลลิลิตร และจำนวนเอนโดสปอร์ 3.80×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 มีจำนวนเซลล์ 7.46×10^8 CFU/มิลลิลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และจำนวนเอนโดสปอร์ 9.95×10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 มีจำนวนเซลล์ 7.47×10^8 CFU/มิลลิลิตร และจำนวนเอนโดสปอร์ 4.33×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 17 และ 18)

เมื่อพิจารณาการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่เหมาะสมต่อการเจริญและเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth 4 สูตร พบว่าอาหารสูตรที่ 2: NB + minerals solution + ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง จำนวนเซลล์และจำนวนเอนโดสปอร์ได้สูงสุด จึงเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ในการทดลองเพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อไป

ตารางที่ 16 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth จำนวน 4 สูตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ^{2/}			
	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 1 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 2 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 3 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 4 ^{1/}
0	0.47h	0.42h	0.40h	0.40h
24	1.23f	1.62e	2.05bc	2.16b
48	1.03gn	1.90cd	2.11b	2.07bc
72	1.13fg	2.31a	1.78d	2.02bc
96	1.52e	2.36a	2.05bc	1.90cd

^{1/}อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (NB + minerals solution + ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 (NB + minerals solution + ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (NB + minerals solution + ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 (NB + minerals solution + ซูโครส 40 กรัมต่อลิตร)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $P \leq 0.05$

ตารางที่ 17 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth จำนวน 4 สูตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ (CFU/มิลลิลิตร)			
	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 1 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 2 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 3 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 4 ^{1/}
0	6.05×10^7	2.28×10^7	7.77×10^7	1.14×10^6
24	1.60×10^8	1.79×10^8	9.67×10^7	2.95×10^7
48	6.62×10^8	1.17×10^9	7.20×10^7	1.54×10^8
72	1.82×10^8	8.40×10^8	1.04×10^8	6.15×10^8
96	7.47×10^8	1.32×10^9	9.88×10^8	7.46×10^8

^{1/}อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (NB + minerals solution + ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 (NB + minerals solution + ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (NB + minerals solution + ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 (NB + minerals solution + ซูโครส 40 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 18 จำนวนเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth 4 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)			
	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 1 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 2 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 3 ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 4 ^{1/}
48	2.65×10^4	4.98×10^5	2.70×10^5	9.95×10^3
72	3.40×10^3	5.41×10^5	6.13×10^4	4.17×10^3
96	4.33×10^4	3.09×10^6	3.80×10^5	2.27×10^3

^{1/}อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (NB + minerals solution + ชูโครส 10 กรัมต่อลิตร) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 (NB + minerals solution + ชูโครส 20 กรัมต่อลิตร) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (NB + minerals solution + ชูโครส 30 กรัมต่อลิตร) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 (NB + minerals solution + ชูโครส 40 กรัมต่อลิตร)

4.7 การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน

4.7.1 การคัดเลือกองค์ประกอบสารพาที่เหมาะสมต่อการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการคัดเลือกองค์ประกอบสารพาที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งทดสอบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ร่วมกันกับองค์ประกอบสารพาแต่ละชนิด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วจึงตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธีการ dilution plate count พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 สามารถเจริญได้ในสารพาแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ ได้แก่ skim milk, maltodextrin, แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง และ sodium alginate โดยแป้งมันสำปะหลัง 20 เปอร์เซ็นต์ และ skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแบคทีเรียสูงสุดเท่ากับ 3.06×10^7 และ 9.05×10^6 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารพาชนิดอื่น ๆ และอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth เพียงอย่างเดียว รองลงมาคือ แป้งข้าวโพด 20 เปอร์เซ็นต์ แป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์ maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์ แป้งข้าวโพด 10 เปอร์เซ็นต์ sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์ อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 4.55×10^6 , 3.55×10^6 , 1.95×10^6 , 1.15×10^6 , 1.05×10^6 และ 1.00×10^6 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 จำนวนแบคทีเรียปฏิชีวนะในการคัดเลือกองค์ประกอบสารพาแต่ละชนิด

สารพาและอัตราส่วน	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร) ^{1/}
skim milk 10 เปอร์เซ็นต์	9.05 x 10 ⁶ ab
maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์	1.95 x 10 ⁶ c
แป้งข้าวโพด 10 เปอร์เซ็นต์	1.15 x 10 ⁶ c
แป้งข้าวโพด 20 เปอร์เซ็นต์	4.55 x 10 ⁶ bc
แป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์	3.55 x 10 ⁶ bc
แป้งมันสำปะหลัง 20 เปอร์เซ็นต์	3.06 x 10 ⁷ a
sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์	1.05 x 10 ⁶ c
nutrient broth	1.00 x 10 ⁶ c

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) P<0.05

4.7.2 การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะโดยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

จากการเตรียมแบคทีเรียปฏิชีวนะในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ดังผลการทดลองที่ 4.6.2 เพื่อนำมาพัฒนาชีวภัณฑ์จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 ประกอบด้วย skim milk 10 เปอร์เซ็นต์, maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์ และ sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 2 ประกอบด้วย skim milk 10 เปอร์เซ็นต์, maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์, sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์ และแป้งข้าวโพด 5 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่ 3 ประกอบด้วย skim milk 10 เปอร์เซ็นต์, maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์, sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์ และแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบสารพา พัฒนาชีวภัณฑ์โดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยและบรรจุลงในถุงอลูมิเนียมพอยล์แล้วจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเตรียมส่วนประกอบชีวภัณฑ์ 1 ลิตรแล้วผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตรมีลักษณะผงคล้ายกันโดยเป็นผงแห้งสีขาว ละเอียด (ภาพที่ 12) จากการตรวจสอบปริมาณผงชีวภัณฑ์ที่ได้กลับจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 มีร้อยละผงแห้งได้กลับสูงสุดเท่ากับ 11.53 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 และ 1 ซึ่งมีร้อยละผงแห้งได้กลับเท่ากับ 9.62 และ 8.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชีวภัณฑ์สูตรที่ 1, 2 และ 3 มีเปอร์เซ็นต์ความชื้น 3.65, 0.47 และ 1.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 20)



ภาพที่ 12 ลักษณะผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัักษณ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 3 สูตร ได้แก่ (ก) สูตรที่ 1 (ข) สูตรที่ 2 และ (ค) สูตรที่ 3

ตารางที่ 20 ปริมาณชีวภัณฑ์และเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัักษณ์ *Bacillus* spp. โดยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

สูตรชีวภัณฑ์ ^{1/}	ร้อยละผงแห้งได้กลับ (เปอร์เซ็นต์)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)
1	8.17	3.65
2	9.62	0.45
3	11.53	1.50

^{1/} ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 เปอร์เซ็นต์)
 ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 (skim milk , maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์) และชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์)

4.7.3 การประเมินความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ

จากการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยจำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 เปอร์เซ็นต์) สูตรที่ 2 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์) และสูตรที่ 3 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์) โดยผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะถูกบรรจุในถุงอะลูมิเนียมพอยล์แล้วปิดผนึกให้สนิทเก็บที่อุณหภูมิห้อง เมื่อประเมินจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะในชีวภัณฑ์ด้วยวิธีการ dilution plate count หลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าสูตรที่ 3 มีจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะหลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยสูงสุดเท่ากับ 1.24×10^7 CFU/กรัม รองลงมา ได้แก่ สูตรที่ 2 และ 1 ซึ่งมีจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะหลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยเท่ากับ 5.90×10^6 และ 1.50×10^6 CFU/กรัม ส่วนในชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีอายุการจัดเก็บระยะเวลา 3 เดือน พบว่าสูตรที่ 1 มีอายุจัดเก็บเดือนที่ 1, 2 และ 3 มีจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะเท่ากับ 5.75×10^5 , 7.65×10^4 และ 4.55×10^4 CFU/กรัม ตามลำดับ สูตรที่ 2 มีจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะหลังจากมีอายุจัดเก็บเดือนที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 5.00×10^6 , 1.68×10^6 และ 1.45×10^6 CFU/กรัม ตามลำดับ และสูตรที่ 3 มีจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะหลังจากมีอายุจัดเก็บเดือนที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 4.95×10^6 , 1.07×10^6 และ 9.05×10^5 CFU/กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 21)

เมื่อเปรียบเทียบความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะในชีวภัณฑ์แต่ละสูตร โดยความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะหลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยสูงสุดคือชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะสูตรที่ 3 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียปฏิชีวนะลดลง $1.68 \text{ Log CFU/กรัม}$ รองลงมา ได้แก่ ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะสูตรที่ 2 และ 1 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียปฏิชีวนะลดลง 2.01 และ $2.60 \text{ Log CFU/กรัม}$ ตามลำดับ และ ความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีอายุจัดเก็บเป็นระยะเวลา 3 เดือน สูงที่สุดคือชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะสูตรที่ 2 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียปฏิชีวนะลดลง $0.61 \text{ Log CFU/กรัม}$ รองลงมา ได้แก่ ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะสูตรที่ 3 และ 1 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียปฏิชีวนะลดลง 1.14 และ $1.52 \text{ Log CFU/กรัม}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 21 ความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในชีวภัณฑ์ 3 สูตร

สูตรชีวภัณฑ์ ^{1/}	จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ (CFU/กรัม)			
	เดือนที่ 0	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3
1	1.50×10^6	5.75×10^5	7.65×10^4	4.55×10^4
2	5.90×10^6	5.00×10^6	1.68×10^6	1.44×10^6
3	1.24×10^7	4.95×10^6	1.07×10^6	9.05×10^5

^{1/} ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 เปอร์เซนต์) ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซนต์) และชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซนต์)

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียลดลงในชีวภัณฑ์แต่ละสูตรหลังผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและมีอายุจัดเก็บเป็นเวลา 3 เดือน

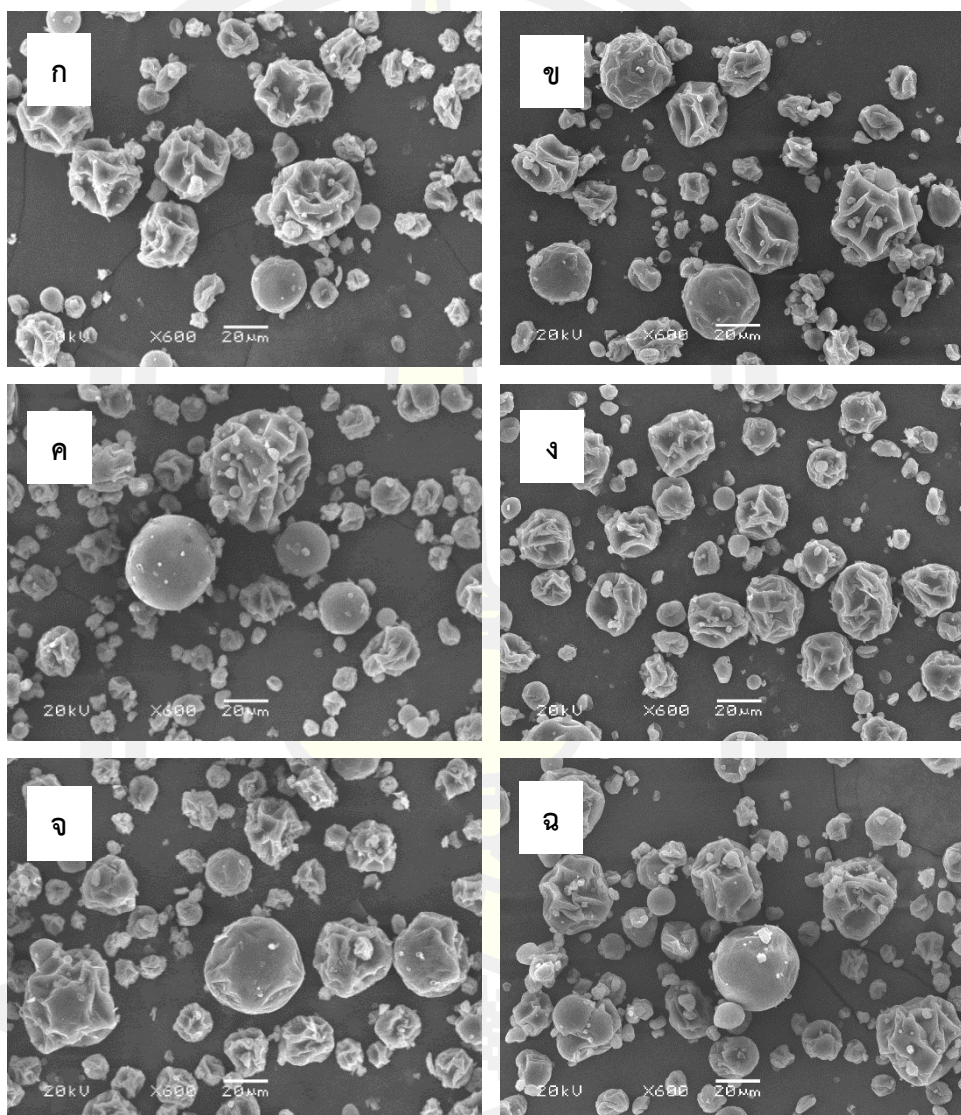
สูตรชีวภัณฑ์ ^{1/}	จำนวนแบคทีเรียลดลง (Log CFU/กรัม)	
	หลังผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย	อายุจัดเก็บเป็นเวลา 3 เดือน
1	2.60	1.52
2	2.01	0.61
3	1.68	1.14

^{1/} ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 เปอร์เซนต์) ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซนต์) และชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซนต์)

4.7.4 ศึกษาลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. โดยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยจำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 (skim milk 10 เปอร์เซนต์ maltodextrin 20 เปอร์เซนต์ และ sodium alginate 0.06 เปอร์เซนต์) สูตรที่ 2 (skim milk 10 เปอร์เซนต์, maltodextrin 20 เปอร์เซนต์ sodium alginate 0.06 เปอร์เซนต์ และแป้งข้าวโพด 5 เปอร์เซนต์) และสูตรที่ 3 (skim milk 10 เปอร์เซนต์ maltodextrin 20 เปอร์เซนต์, sodium alginate 0.06 เปอร์เซนต์ และแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซนต์) จึงมีการศึกษาลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ความต่างศักย์ไฟฟ้า 20 kV พบว่าชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคเท่ากับ 24.06, 21.35 และ 24.51 ไมโครเมตร ตามลำดับ โดยอนุภาคของชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตรมีลักษณะกลมโดยมีทั้งแบบผิวเรียบและเหี่ยวย่นผิวขรุขระและมีเศษวัสดุอื่น ๆ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับชีวภัณฑ์ที่ไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแต่ละสูตร (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 จำนวน 3 สูตรเทียบกับอนุภาคของชีวภัณฑ์ที่ไม่มีแบคทีเรีย (control) ได้แก่ (ก) สูตรที่ 1 (ข) สูตรที่ 1 (control) (ค) สูตรที่ 2 (ง) สูตรที่ 2 (control) (จ) สูตรที่ 3 (ฉ) สูตรที่ 3 (control) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ความต่างศักย์ไฟฟ้า 20V กำลังขยาย 600X

4.8 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณช์ *Bacillus spp.* ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ

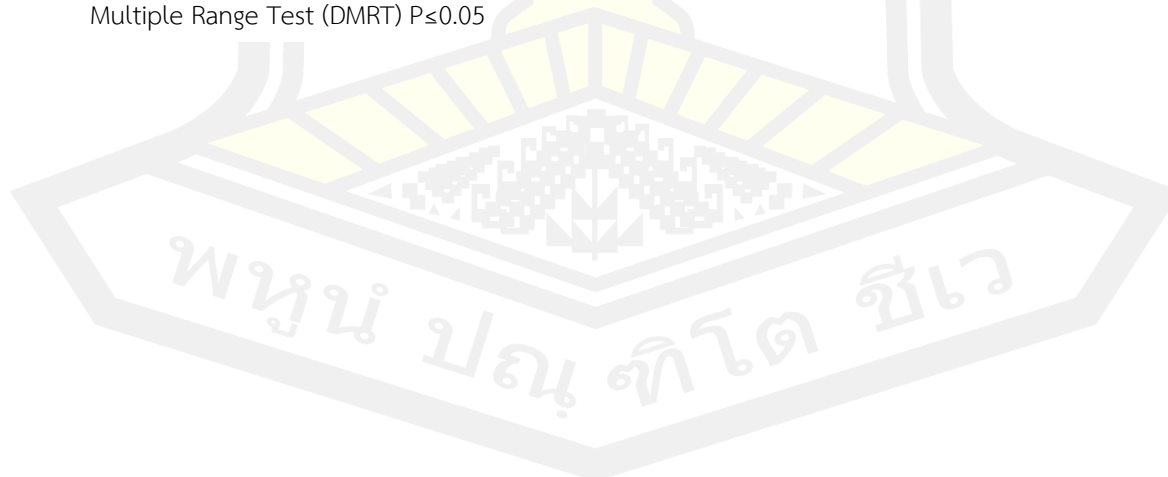
จากการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณช์ *Bacillus spp.* ไอโซเลต N1 ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 21 วัน ปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีตัดใบและคลุมถุงให้ความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฉีดพ่นด้วย 6 กรรมวิธี พบว่าลักษณะอาการของโรคขอบใบแห้งของข้าวเริ่มแสดงอาการภายในระยะเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมงหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค บริเวณรอยตัดใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขยายไปตามทางเนว ยาวของใบโดยเฉพาะขอบใบจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบางส่วนหรือขยายไปทั้งใบและพบอาการ รุนแรงเหี่ยวแห้งตายทั้งต้น หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 14 วันพบว่ากรรมวิธีการใช้ชีวภัณฑ์ สูตรที่ 2 สามารถควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุด มีดัชนีการยับยั้งโรคสูงสุดเท่ากับ 45.87 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 91.67 ± 14.16 และ 50.93 ± 21.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ โดยกรรมวิธีที่สามารถควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวรองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีการใช้ชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 มีดัชนีการยับยั้งโรคเท่ากับ 36.42 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 86.67 ± 26.99 และ 59.81 ± 27.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กรรมวิธีการใช้แบคทีเรียปฏิบัณช์ *Bacillus spp.* ไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสด มีดัชนีการยับยั้งโรคเท่ากับ 23.43 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 98.33 ± 5.27 และ 72.04 ± 19.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกรรมวิธีการใช้ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 มีดัชนีการยับยั้งโรคเท่ากับ 22.83 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 96.67 ± 7.03 และ 72.59 ± 18.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล ซึ่งมีดัชนีการยับยั้งโรคเท่ากับ 11.42 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 98.33 ± 5.27 และ 83.33 ± 18.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกรรมวิธีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ มีร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคสูงสุดเท่ากับ 100 ± 00.00 และ 94.07 ± 11.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยในแต่ละกรรมวิธีร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรค ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 23 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 และกรรมวิธีต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

กรรมวิธี ^{1/}	ร้อยละการเกิดโรค (เปอร์เซ็นต์) ^{2/}	ดัชนีความรุนแรงของโรค (เปอร์เซ็นต์) ^{2/}	ดัชนีการยับยั้งโรค (เปอร์เซ็นต์) ^{2/}
ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1	96.67±7.03b	72.59±18.92bc	22.83
ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2	91.67±14.16ab	50.93±21.01a	45.87
ชีวภัณฑ์สูตรที่ 3	86.67±26.99a	59.81±27.32ab	36.42
<i>Bacillus</i> spp.			
ไอโซเลต N1	98.33±5.27ab	72.04±19.97bc	23.43
รูปแบบเชื้อสด			
ซิงค์ไทอะโซล	98.33±5.27ab	83.33±18.48cd	11.42
น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	100±00.00b	94.07±11.34d	-

^{1/}กรรมวิธีที่ 1 ชิวภัณฑ์สูตรที่ 1 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 เปอร์เซ็นต์) กรรมวิธีที่ 2 ชิวภัณฑ์สูตรที่ 2 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์) กรรมวิธีที่ 3 ชิวภัณฑ์สูตรที่ 3 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์) กรรมวิธีที่ 4 แบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสดความหนาแน่นเซลล์ 10^8 CFU/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 5 สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (positive control) กรรมวิธีที่ 6 น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (negative control)

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $P \leq 0.05$



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคขอบใบแห้งของข้าว และนำไปพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบผงที่สามารถควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในองค์ประกอบสารพาหะหรือวัสดุห่อหุ้มที่ช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ทำให้ชีวภัณฑ์คงความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากผ่านกระบวนการผลิตโดยการทำแห้งแบบพ่นฝอย สามารถยืดอายุการเก็บรักษา และง่ายต่อการนำไปใช้งานสำหรับเกษตรกร

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากจากสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ทดสอบปลูกเชื้อสาเหตุโรคในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง โดยใช้ต้นข้าวอายุ 21 และ 28 วัน ปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีการตัดใบ แล้วคลุมถุงครอบทั้งกระถางเพื่อกักเก็บความชื้นเอาไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถสังเกตเห็นหยดน้ำเกาะที่บริเวณใบ หลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง จึงเริ่มแสดงอาการปลายใบช้ำน้ำและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นรอยโรคจะพัฒนาไปตามทางยาวของใบข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณขอบใบ ซึ่งมีลักษณะอาการสอดคล้องกับการรายงานของ Jonit และคณะ (2016) หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน พบว่าข้าวอายุ 21 วัน มีร้อยละการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคสูงกว่าข้าวอายุ 28 วัน ซึ่งข้าวอายุ 21 วัน จะมีขนาดพื้นที่ใบข้าวเล็ก และบางกว่าข้าวอายุ 28 วัน จึงอาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายได้ง่ายกว่า โดยปัจจัยในการเกิดโรคประกอบด้วยพีชอาศัยที่ไวต่อการเกิดโรคซึ่งเกี่ยวข้องทั้งสายพันธุ์และช่วงอายุการเจริญของพืช เชื้อสาเหตุโรคที่รุนแรงและมีปริมาณมาก และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และลม ที่สามารถทำให้พีชอาศัยลดความต้านทานในการเกิดโรคได้ (Agrios, 2005) มีรายงานในข้าวที่มีอายุน้อยกว่า 21 วัน จะมีความไวต่อการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าว และมักพบเกิดโรคในเขตพื้นที่ร้อนชื้นอุณหภูมิช่วง 25-34 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสูง ซึ่งสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคยิ่งจะส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของโรคได้มากขึ้น (Gnanamanicksam et al., 1999) จากการทดลองจึงเลือกใช้ข้าวอายุ 21 วัน ในการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธี agar plate inhibition assay พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ดีที่สุด ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์

ไอโซเลตอื่น ๆ จึงนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุม ได้แก่ กรรมวิธีการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* DOA24 (กรมวิชาการเกษตร) และสารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* โดยแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ได้รับความสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้เป็น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในด้านการเกษตร เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชและสามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ จึงเหมาะกับการนำไปพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ (Wu et al., 2015) แบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีกลไกการควบคุมด้วยวิธีทางชีวภาพหลากหลายวิธี เช่น การแก่งแย่งอาหาร และที่อยู่อาศัย การส่งเสริมสารอาหารและฮอร์โมนแก่พืช การชักนำการต้านทานโรค การสร้างไบโอฟิล์ม และการสร้างสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิหลากหลายที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Fira et al., 2018; Sha et al., 2016) โดยมีงานวิจัยศึกษาแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และเชื้อรา ได้แก่ *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporu m*, *F. verticillioides*, *Phytophthora nicotianae* และ *Ustilaginoidea virens* นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* (Calvo et al., 2020; Cao et al., 2018; Chen et al., 2018; Guo et al., 2020; Jiang et al., 2019; Myo et al., 2019; Wang et al., 2020) โดยมีรายงานการวิเคราะห์จีโนมิกส์ของ *B. velezensis* พบมีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิซึ่งมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช กลุ่ม cyclic lipopeptides ได้แก่ iturin, surfactin, bacillomycin-D, fengicin และ bacillibactin กลุ่ม antibacterial polyketide ได้แก่ macrolactin, bacillaene และ difficidin และ antibacterial dipeptide ได้แก่ bacilicin (Chen et al., 2007; Liu et al., 2020; Pandin et al., 2018; Rabbee et al., 2019) และมีการศึกษาคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์และสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ amylase, β -glucanase, cellulase, chitinase, indole-3-acetic acid (IAA) และ siderophore (Myo et al., 2019) ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้มีงานวิจัยศึกษาสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ difficidin และ bacilysin ที่ได้จากแบคทีเรีย *B. amyloliquefacien* FZB42 (reclassified *B. velezensis* FZB42) โดยสาร difficidin หรือ bacilysin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สร้างความเสียหายต่อผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถลดอาการรุนแรงของโรคโดยมีอัตราการควบคุมโรค 58.82 ถึง 72.31 เปอร์เซ็นต์ (Fan et al., 2018; Wu et al., 2015)

ปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่ยังมีการควบคุมศัตรูพืชโดยใช้สารเคมีทางการเกษตร ซึ่งการใช้สารเคมีในปริมาณมากและใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในพื้นที่การเกษตรส่งผลเสียต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จึงมีการควบคุมศัตรูพืชแบบผสมผสานซึ่งเป็นการรวมกันของวิธีทางชีวภาพและสารเคมีทางการเกษตรเพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรและควบคุมคุณภาพของผลผลิต (Barzman et al., 2015) ในงานวิจัยจึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 พบว่าสามารถทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรประเภทกลุ่มกำจัดวัชพืช ได้แก่ อะมิโก้ (amigo) ปีม 75WP (beam WP75) กรีนไดฟ์ 500EC (greendive 500EC) โอมายซิน (omycin) และไทแบค (thibac) กลุ่มกำจัดวัชพืช ได้แก่ คลอแรค (clorac) เลวินเอฟ (levin F) กลุ่มกำจัดแมลง ได้แก่ โพรวาโด (provado) ยกเว้นสารเคมีกำจัดวัชพืชพาราควอต (paraquat) ซึ่งพาราควอตมีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์จึงได้ถูกยกเลิกการใช้ในหลายประเทศ (Bromilow, 2004; Cha et al., 2015) มีงานวิจัยของ Basamma และ Kulkarni (2017) ได้ศึกษาการทนทานของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ต่อสารเคมีทางการเกษตรด้วยวิธี maximum tolerance concentration (MTC) และ maximum inhibition concentration (MIC) พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ทนต่อสารเคมีทางการเกษตร carbendazim (bavistin 50WP), difenconazole (score 25EC), hexaconazole (contaf 5EC) และ kresoxin-methyl (ergon 44.3SC) ดังนั้นการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างมีประสิทธิภาพจะต้องพิจารณาการใช้ร่วมกับสารเคมีทางการเกษตรได้บางชนิด

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสดในการยับยั้งเชื้อ *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ พบว่ากรรมวิธีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุด มีดัชนีการยับยั้งโรคสูงสุดเท่ากับ 65.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซลที่มีดัชนีการยับยั้งโรคเท่ากับ 29.76 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นที่ไม่สามารถควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของปริชาติ และคณะ (2555) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* TU-Orga1 ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยวิธีการคลุกเมล็ดรวมกับการฉีดพ่นใบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้ 75.6 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 มีศักยภาพในการยับยั้งโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบจึงพิจารณานำไปพัฒนาชีวภัณฑ์

การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 เพื่อคัดเลือกแหล่งคาร์บอนโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร

และซูโครส 10 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 หลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB + กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ NB + ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร สูงสุดเท่ากับ 1.06 และ 1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสสูงกว่าการใช้ซูโครสเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้การใช้กลูโคสมากกว่า 5 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดยับยั้งการสร้างเอนโดสปอร์ด้วย (Monteiro et al., 2005) จึงเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ อีกทั้งยังมีราคาถูกกว่าและหาซื้อได้ง่ายเพื่อลดต้นทุนการผลิต จากนั้นได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth จำนวน 4 สูตร โดยมีการเปรียบเทียบความเข้มข้นของซูโครส ได้แก่ 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีการเพิ่มส่วนของ minerals solution ได้แก่ CaCl_2 , FeSO_4 , KCl , MgSO_4 และ MnCl_2 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth สูตรที่ 2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.36 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์และเอนโดสปอร์สูงสุดเท่ากับ 1.32×10^9 CFU/มิลลิลิตร และ 3.09×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งในการผลิตชีวภัณฑ์มักจะใช้เชื้อรูปแบบเอนโดสปอร์ที่ทนต่อความร้อนได้สูงกว่าเชื้อรูปแบบเซลล์ ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า จากการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 จึงพิจารณาเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth สูตรที่ 2 (NB + minerals solution + ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร) ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง จำนวนเซลล์ และจำนวนเอนโดสปอร์ได้สูงสุดนำมาใช้เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 เพื่อการพัฒนาชีวภัณฑ์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Mn^{2+} , Mg^{2+} และ Ca^{2+} จะช่วยส่งเสริมการสร้างเอนโดสปอร์และทำให้เอนโดสปอร์ทนต่อความร้อนมากขึ้น (Atrih and Foster, 2001) เช่นเดียวกับในงานวิจัยของ Posada-Urbe และคณะ (2015) ได้ศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* EA-CB0575 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified sporulation medium ที่มีส่วนประกอบของแร่ธาตุ ได้แก่ MgSO_4 , KH_2PO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 และ MnCl_2 เพาะเลี้ยงทั้งภายใต้สภาวะเขย่าและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 14 ลิตร สามารถผลิตเอนโดสปอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 1.37×10^9 และ 8.78×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และงานวิจัยของ Monteiro และคณะ (2005) ได้ศึกษาการเพิ่มจำนวนเอนโดสปอร์ F เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* MB24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

difco sporulation ที่มีส่วนประกอบของแร่ธาตุ ได้แก่ KCl, MgSO₄, MnCl₂ และ FeSO₄ เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.2×10^{10} CFU/มิลลิลิตร และมีจำนวนเอนโดสปอร์สูงสุดเท่ากับ 5.6×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเติมกะมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.6×10^{10} CFU/มิลลิลิตร และมีจำนวนเอนโดสปอร์สูงสุดเท่ากับ 7.4×10^9 สปอร์/มิลลิลิตร โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะเซลล์จะใช้สารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นครั้งเดียวและการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะจะมีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงทำให้สามารถควบคุมรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียได้จึงสามารถเพิ่มจำนวนเอนโดสปอร์ได้ (Monteiro et al., 2005)

ในการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 เพื่อควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของชีวภัณฑ์อย่างเหมาะสม ควรเลือกใช้สารพาหุหรือวัสดุที่ไม่ทำลายแบคทีเรียปฏิปักษ์ จึงมีการคัดเลือกองค์ประกอบสารพาหุที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ซึ่งทดสอบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ร่วมกันกับองค์ประกอบสารพาหุแต่ละชนิด ได้แก่ skim milk, maltodextrin, sodium alginate แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง พบว่าองค์ประกอบสารพาหุแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบไม่มีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต N1 จึงนำองค์ประกอบแต่ละชนิดมาประกอบสูตรเพื่อนำมาพัฒนาชีวภัณฑ์จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 เปอร์เซ็นต์) สูตรที่ 2 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งข้าวโพด อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่ 3 (skim milk, maltodextrin, sodium alginate, แป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วน 10 : 20 : 0.06 : 5 เปอร์เซ็นต์) พัฒนาชีวภัณฑ์ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันโดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย ใช้อุณหภูมิลมร้อนขาเข้า (air inlet) 145 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิลมร้อนขาออก (air outlet) อยู่ระหว่าง 90-105 องศาเซลเซียส พบว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 มีปริมาณผงชีวภัณฑ์ที่ได้กลับจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยสูงสุดเท่ากับ 11.53 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณผงชีวภัณฑ์บางส่วนจะสูญเสียไปภายในแชมเบอร์ (chamber) ของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยในระหว่างกระบวนการผลิต ความชื้นของชีวภัณฑ์สูตรที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 3.65, 0.47 และ 1.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 และ 3 ที่มีองค์ประกอบของแป้งจากพืชซึ่งเป็นโพลีเมอร์จากธรรมชาติจะมีความชื้นน้อยกว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ไม่มีแป้ง แป้งข้าวโพดมีองค์ประกอบของไขมันมากกว่าแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งไขมันจะช่วยลดความสามารถในการดูดน้ำของแป้ง (Swinkels, 1985) อาจมีผลในการดูดซับความชื้นได้น้อยจึงทำให้ชีวภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของ

แป้งข้าวโพดมีความชื้นน้อยที่สุด ความชื้นมีผลต่อความมีชีวิตของแบคทีเรียจึงมีการกำหนดชีวภัณฑ์ที่มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษาจะต้องมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นน้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการผลิตจึงต้องลดปริมาณความชื้นในผงชีวภัณฑ์โดยใช้อุณหภูมิในกระบวนการทำแห้งสูงแต่ต้องคำนึงถึงอุณหภูมิที่มีผลต่อความมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย (Anantal et al., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ma และคณะ (2015) ได้ศึกษาการใช้สภาวะอุณหภูมิร้อนขาเข้าในการทำแห้งแบบพ่นฝอยของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B99-2 ที่มีผลต่อความชื้นและความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยชีวภัณฑ์มีองค์ประกอบ ได้แก่ maltodextrin และ gum arabic พบว่าชีวภัณฑ์จากการใช้สภาวะอุณหภูมิร้อนขาเข้า 105, 125, 145, 165 และ 185 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 7.21, 5.13, 3.58, 3.59 และ 3.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการใช้สภาวะอุณหภูมิร้อนขาเข้า 145 องศาเซลเซียส มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงสุด 92.48 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อใช้อุณหภูมิร้อนขาเข้าสูงขึ้นยิ่งทำให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นลดลง

เมื่อประเมินความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ในชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธีการ dilution plate count โดยชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์จะถูกจัดเก็บในถุงอะลูมิเนียมพอยล์ที่ปิดผนึกสนิทและเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตรหลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีจำนวนตั้งแต่ 10^6 ถึง 10^7 CFU/กรัม ซึ่งชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรที่ 3 มีจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยสูงสุด เท่ากับ 1.24×10^7 CFU/กรัม ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลง 1.68 Log CFU/กรัม และความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตรหลังมีอายุการเก็บเป็นระยะเวลา 3 เดือน มีจำนวนตั้งแต่ 10^4 ถึง 10^6 CFU/กรัม ซึ่งชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ สูตรที่ 2 มีจำนวนความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังมีอายุการเก็บเป็นระยะเวลา 3 เดือน สูงสุด เท่ากับ 1.44×10^6 CFU/กรัม ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลง 0.61 Log CFU/กรัม ในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยอาจทำลายเซลล์แบคทีเรียจากการผ่านความร้อนเพื่อนำน้ำออกจากเซลล์กระทันหัน โดยความร้อนจากอุณหภูมิร้อนขาเข้าของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยจะมีผลกระทบต่อความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียน้อยกว่าอุณหภูมิร้อนขาออก แต่หากมีอุณหภูมิร้อนขาออกเกิน 100 องศาเซลเซียส เอนโดสปอร์อาจถูกทำลาย 3 เปอร์เซ็นต์ (Reyes et al., 2018; Teera-arunsiri et al., 2003) เพื่อลดผลกระทบดังกล่าวจึงต้องมีองค์ประกอบของชีวภัณฑ์ซึ่งเป็นวัสดุห่อหุ้มที่ช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์จากสภาวะที่ไม่เหมาะสมและเพิ่มประสิทธิภาพในการคงอยู่ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระหว่างกระบวนการผลิต

การจัดเก็บผลิตภัณฑ์ และในระหว่างนำไปใช้งาน วัสดุที่ถูกนำไปศึกษาในการผลิตชีวภัณฑ์ เช่น skim milk, maltodextrin, sodium alginate, polyvinyl pyrrolidone, gum arabic เป็นต้น (Chumthong et al., 2016; López-Cruz et al., 2020; Reyes et al., 2018) ในงานวิจัย องค์ประกอบหลักของชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร ได้แก่ skim milk, maltodextrin และ sodium alginate ซึ่งมีอยู่ในองค์ประกอบของชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 คุณสมบัติของ skim milk มีการนำไปใช้ในการเก็บรักษา สภาพเซลล์แบคทีเรียให้คงมีชีวิตได้ (Cody et al., 2008; Wu et al., 2019) maltodextrin ช่วยให้การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียหนาขึ้นเพื่อป้องกันเซลล์ได้รับความเสียหายและช่วยลดการดูดซับความชื้น จะทำให้ผงชีวภัณฑ์ไม่เหนียวติดกัน (Rokka and Rantamäki, 2010; Tang et al., 2020) และ sodium alginate มีคุณสมบัติเป็นโพลีเมอร์ที่สามารถก่อฟิล์มเคลือบไว้ได้ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย (Yonekura et al., 2014) โดยชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 และ 3 มีองค์ประกอบของ แป้งข้าวโพดและแป้งมันสำปะหลังจึงอาจมีส่วนช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียทำให้ความมีชีวิตรอดของ แบคทีเรียปฏิบัติสูงกว่าสูตรชีวภัณฑ์ที่ไม่มีองค์ประกอบของแป้ง นอกจากนี้แป้งยังมีต้นทุนต่ำจึง เหมาะสมในการนำมาใช้ในการพัฒนาชีวภัณฑ์ ในงานวิจัยของ Nunes และคณะ (2018) ได้ใช้แป้ง ข้าวโพดเป็นวัสดุห่อหุ้มเซลล์ในการผลิตแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* ผ่านกระบวนการ ทำแห้งแบบพ่นฝอย สภาวะอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าและลมร้อนขาออก 130 และ 76±5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อัตราการไหล 0.48 ลิตรต่อชั่วโมง แรงดันอากาศ 0.6 เมกะปาสคาล พบว่ามีความรอด ชีวิตของแบคทีเรียหลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยสูงถึง 94.26 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Teera-Arunsiiri และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. thuringiensis* องค์ประกอบ ของชีวภัณฑ์ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ซูโครส และน้ำมันรำข้าว และใช้เซลล์แขวนลอย ความหนาแน่นเซลล์ 5×10^{10} CFU/มิลลิลิตร สภาวะอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าและลมร้อนขาออก 120 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าสามารถคงความมีชีวิตของเอนโดสปอร์ได้สูงสุด 1.77×10^9 สปอร์ต่อกรัม นอกจากนี้ความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียหลังผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย และในระหว่างการเก็บรักษาขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บรักษา โดยมีรายงานการเก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนแบคทีเรียจะลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการเก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งมีแบคทีเรียลดลงมากที่สุดถึง 3 log CFU/กรัม (Tang et al., 2020) แต่การเก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิตจึงไม่เหมาะสมกับการ นำมาเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่จะนำไปใช้ทางด้านการเกษตร

การศึกษาลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ความต่างศักย์ไฟฟ้า 20 kV พบว่าลักษณะอนุภาคของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สูตร มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 20 ไมโครเมตร ลักษณะกลมโดยมีทั้งแบบผิวเรียบและเหี่ยวย่น ผิวขรุขระ และมีเศษวัสดุอื่น ๆ เกาะบนอนุภาคของชีวภัณฑ์ โดยลักษณะการเหี่ยวย่นเกิดจากการระเหยอย่างรวดเร็วของของเหลวที่ถูกทำให้เป็นละอองหยดระหว่างการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย เกิดขึ้นได้ในสภาวะอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าที่ใช้สูงถึง 155 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจทำให้เกิดรอยร้าวบนอนุภาคที่ออกซิเจนสามารถแพร่เข้าไปและเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้มีผลต่อความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ หากใช้อุณหภูมิขาเข้าปานกลางประมาณ 140 องศาเซลเซียส อนุภาคจะมีลักษณะเป็นรอยเว้าลงไปซึ่งเป็นกลไกที่ป้องกันการแตกหักของพื้นผิวอนุภาค (Dura, 2007) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติวัสดุที่นำมาห่อหุ้มเซลล์ไว้มีผลต่อลักษณะของอนุภาค เนื่องจากวัสดุแต่ละชนิดมีค่าการนำความร้อนและการกระจายความร้อนแตกต่างกัน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ทั้ง 3 สูตร ในการยับยั้งเชื้อ *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในพืชทดสอบ พบว่ากรรมวิธีการฉีดพ่นน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว เกิดลักษณะอาการโรคอย่างรุนแรง เหี่ยวแห้งตายทั้งกระถาง มีร้อยละการเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ และมีดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค 94.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถควบคุมการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ โดยกรรมวิธีการใช้ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 สามารถควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุด มีดัชนีการยับยั้งโรคสูงสุดเท่ากับ 45.87 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีการใช้ชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 กรรมวิธีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp ไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสด กรรมวิธีการใช้ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 และกรรมวิธีการใช้สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล มีดัชนีการยับยั้งโรคเท่ากับ 36.42, 23.43, 22.83 และ 11.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีของการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์และสารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล พบว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 และ 3 มีดัชนียับยั้งเชื้อสาเหตุโรคสูงกว่าการใช้สารเคมีทางการเกษตรซิงค์ไทอะโซล ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีของการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์และแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 รูปแบบเชื้อสด พบว่าการใช้ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 และ 3 ที่มีองค์ประกอบของแบคทีเรียในสูตรสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบเชื้อสด ซึ่งองค์ประกอบสารพาหะหรือวัสดุห่อหุ้มเซลล์อาจจะช่วยให้แบคทีเรียปฏิปักษ์เกาะบนใบพืชได้ดีและมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ทำให้มีการ

ควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีกว่า ในงานวิจัยได้ทดสอบวิธีการใช้งานของชีวภัณฑ์ด้วยวิธีการฉีดพ่นในแต่ละกรรมวิธีเพียงครั้งเดียว ซึ่งวิธีการและระยะเวลาในการใช้งานของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถปรับเปลี่ยนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคมามากยิ่งขึ้น

จากงานวิจัยครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลต N1 ทั้ง 3 สูตร พบว่าสูตรที่ 2 ที่มีองค์ประกอบ ได้แก่ skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ maltodextrin 20 เปอร์เซ็นต์ sodium alginate 0.06 เปอร์เซ็นต์ และแป้งข้าวโพด 5 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นน้อยที่สุด ทำให้มีความรอดชีวิตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ที่มีอายุการเก็บเป็นระยะเวลา 3 เดือน มากที่สุด และยังสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุด โดยสูตรชีวภัณฑ์สามารถนำไปดัดแปลงและปรับสภาวะการทำแห้งแบบพ่นฝอยให้เหมาะสมเพื่อความคงตัวมากยิ่งขึ้น หรือมีการปรับวิธีการใช้งานและการเพิ่มปริมาณของชีวภัณฑ์ให้เพียงพอต่อการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการควบคุมโดยชีววิธีเพื่อลดการใช้สารเคมีที่เป็นสารตกค้างในผลผลิตการเกษตรและพื้นที่การเพาะปลูก ซึ่งเสี่ยงต่อการเกิดปัญหาสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภคและมีต้นทุนสูง ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวจึงเป็นทางเลือกให้กับเกษตรกร ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนการผลิต โดยชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชสามารถจดทะเบียนทางการค้าและนำไปใช้ในด้านการเกษตรได้

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยศึกษาองค์ประกอบ อัตราส่วน และสภาวะเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยให้เหมาะสมต่อความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ยาวนานและคงที่มากขึ้น
2. ต้องมีการศึกษา วิธีการ อัตรา และระยะเวลา ในการใช้งานของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพิ่มเติมเพื่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กรมการข้าว. (n.d.). *องค์ความรู้เรื่องข้าว*. [http://www.ricethailand.go.th/Rkb/disease and insect/index.php-file=content.php&id=120.html](http://www.ricethailand.go.th/Rkb/disease%20and%20insect/index.php-file=content.php&id=120.html)
- มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์. (2557). สารไซโตเดอรโรพอร์จากจุลินทรีย์. *Srinakharinwirot Science Journal*, 30(1), 229–247.
- บุญหงษ์ จงคิด. (2014). *ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต*. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- ปาริชาติ สถิตธรรมพนา, ดุสิต อธิณวัฒน์, และ วิลาวรรณ เชื้อบุญ. (2555). ประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว. *Thai Journal of Science and Technology*, 1(3), 180–188.
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2561). *สถิติส่งออกข้าว*. <http://www.thairiceexporters.or.th/default.html>
- อรอนงค์ นัยวิกุล. (2550). *ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* (พิมพ์ครั้งที่ 2). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัมมาร สยามวาลา และ วิโรจน์ ณ ระนอง. (2533). *ประมวลความรู้เรื่องข้าว*. สถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศไทย.
- อัมรา เวียงวีระ, วัชระ ภูรีวิโรจน์กุล, อรพิน วัฒนเสวก, อานนท์ สุขสวัสดิ์, ดารา เจตนะจิตร, วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, สุวัฒน์ รวยอารีย์, ลือชัย อารยะรังษฤษฎ์, อาทิตย์ กุคำอู, เอกสงวน ชูวิสิษฐกุล, กัญญา เชื้อพันธุ์, ละม้ายมาศ ยิ่งสุข, และ ชาญชัย โรจนสโรช. (2547). *ข้าว: เอกสารวิชาการลำดับที่ 18/2547*. กรมวิชาการเกษตร.
- Abdhul, K., Ganesh, M., Shanmughapriya, S., Vanithamani, S., Kanagavel, M., Anbarasu, K., & Natarajaseenivasan, K. (2015). Bacteriocinogenic potential of a probiotic strain *Bacillus coagulans* [BDU3] from Ngari. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 800–806.

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. (5th ed). Elsevier Academic Press.
- Akhtar, M. S., Shakeel, U., & Siddiqui, Z. (2010). Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turkish Journal of Biology*, 34, 1–7.
- Anantal, E., Birkeland, S. E., Corcoran, B., Fitzgerald, G., Hinz, S., Klijn, A., Mättö, J., Mercernier, A., Nilsson, U., Nyman, M., O'Sullivan, E., Parche, S., Rautonen, N., Ross, R. P., Saarela, M., Stanton, C., Stahl, U., Suomalainen, T., Vincken, J. P., ... Knorr, D. (2004). Processing effects on the nutritional advancement of probiotics and prebiotics. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 16(2–3), 113–124.
- Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4(2), 127–136.
- Atrih, A., & Foster, S. J. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), 364–372.
- Barratt, B. I. P., Moran, V. C., Bigler, F., & van Lenteren, J. C. (2018). The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. *BioControl*, 63(1), 155–167.
- Barzman, M., Bärberi, P., Birch, A. N. E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., Graf, B., Hommel, B., Jensen, J. E., Kiss, J., Kudsk, P., Lamichhane, J. R., Messéan, A., Moonen, A. C., Ratnadass, A., Ricci, P., Sarah, J. L., & Sattin, M. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(4), 1199–1215.

- Bejarano, A., & Puopolo, G. (2020). Bioformulation of microbial biocontrol agents for a sustainable agriculture. In A. De Cal, P. Melgarejo, & N. Magan (Eds.), *How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases* (pp. 275–293). Springer International Publishing.
- Ben Abdallah, D., Frikha-Gargouri, O., & Tounsi, S. (2018). Rizhospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. *Biological Control*, *124*, 61–67.
- Bhasin, H., Bhatia, D., Raghuvanshi, S., Lore, J. S., Sahi, G. K., Kaur, B., Vikal, Y., & Singh, K. (2012). New PCR-based sequence-tagged site marker for bacterial blight resistance gene Xa38 of rice. *Molecular Breeding*, *30*(1), 607–611.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(7), 423–431.
- Bromilow, R. H. (2004). Paraquat and sustainable agriculture. *Pest Management Science*, *60*(4), 340–349.
- Brun-Graeppe, A. K. A. S., Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D., & Merten, O.-W. (2011). Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, *149*(3), 209–224.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*(4), 467–483.

- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, *166*, 111208.
- Cao, Y., Pi, H., Chandransu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J. D., & Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–14.
- Castillo, H. F. D., Reyes, C. F., Morales, G. G., Herrera, R. R., & Aguilar, C. (2013). Biological control of root pathogens by plant-growth promoting *Bacillus* spp. *Weed and Pest Control-Conventional and New Challenges*, 80–103.
- Cha, E. S., Chang, S.-S., Gunnell, D., Eddleston, M., Khang, Y.-H., & Lee, W. J. (2015). Impact of paraquat regulation on suicide in South Korea. *International Journal of Epidemiology*, *45*(2), 470–479.
- Chanprapai, P., & Chavasiri, W. (2017). Antimicrobial activity from *Piper sarmentosum* Roxb. against rice pathogenic bacteria and fungi. *Journal of Integrative Agriculture*, *16*(11), 2513–2524.
- Chávez, B. E., & Ledebor, A. M. (2007). Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, *25*(7–8), 1193–1201.
- Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gong, G. H., Wang, P., & Yu, Z. L. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, *47*(3), 180–186.

- Chen, L., Heng, J., Qin, S., & Bian, K. (2018). A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–22.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., & Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, *25*(9), 1007–1014.
- Chithrashree, Udayashankar, A. C., Chandra Nayaka, S., Reddy, M. S., & Srinivas, C. (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, *59*(2), 114–122.
- Chowdappa, P., Mohan Kumar, S. P., Jyothi Lakshmi, M., & Upreti, K. K. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*, *65*(1), 109–117.
- Chumthong, A., Wiwattanapatapee, R., Viernstein, H., Pengnoo, A., & Kanjanamaneesathian, M. (2016). Spray-dried powder of *Bacillus megaterium* for control of rice sheath blight disease: formulation protocol and efficacy testing in laboratory and greenhouse. *Cereal Research Communications*, *44*(1), 131–140.

- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson, C. A., & Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed - 80°C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 135–138.
- Curtis, L. C. (1943). Deleterious effects of guttated fluids on foliage. *American Journal of Botany*, 30(10), 778–782.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302.
- Dos Santos, K. B., Neves, P., Meneguim, A. M., dos Santos, R. B., dos Santos, W. J., Boas, G. V., Dumas, V., Martins, E., Praça, L. B., Queiroz, P., Berry, C., & Monnerat, R. (2009). Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 50(2), 157–163.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2491.
- Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., & Li, Y. (2017). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199, 89–97.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55.

- Freitas, S., Merkle, H. P., & Gander, B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, *102*(2), 313–332.
- Gao, D.-Y., Xu, Z.-G., Chen, Z.-Y., Sun, L.-H., Sun, Q.-M., Lu, F., Hu, B.-S., & Liu, Y.-F. (2002). Identification of a resistance gene to bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) in a somaclonal mutant HX-3 of indica rice. *Yi Chuan Xue Bao*, *29*(2), 138–143.
- Gasic, S., & Tanovic, B. (2013). Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. *Pesticidi i Fitomedicina*, *28*(2), 97–102.
- Gnanamanickam, S. S., Brindha Priyadarisini, V., Narayanan, N. N., Vasudevan, P., & Kavitha, S. (1999). An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. *Current Science*, *77*(11), 1435–1444.
- Goto, M. (1992). Diagnosis and control of bacterial plant diseases. In M. Goto (Ed.), *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology* (pp. 242–265). Academic Press.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(7), 330–347.
- Guo, D., Yuan, C., Luo, Y., Chen, Y. H., Lu, M., Chen, G., Ren, G., Cui, C., Zhang, J., & An, D. (2020). Biocontrol of tobacco black shank disease (*Phytophthora nicotianae*) by *Bacillus velezensis* Ba168. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *165*, 104523.
- Handelsman, J., & Stabb, E. V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*, *8*(10), 1855–1869.

- Hastuti, R. D., Lestari, Y., Suwanto, A., & Saraswati, R. (2012). Endophytic *Streptomyces* spp. as biocontrol agents of rice bacterial leaf blight pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(4), 155–162.
- Ho, B. L., & Lim, W. C. (1979). Effects of nitrogen and planting density on bacterial blight *Xanthomonas oryzae* of rice. *Malaysian Agricultural Journal*, 52, 171–176.
- Ji, G. H., Wei, L. F., He, Y. Q., Wu, Y. P., & Bai, X. H. (2008). Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-1. *Biological Control*, 45(3), 288–296.
- Jiang, C. H., Yao, X. F., Mi, D. D., Li, Z. J., Yang, B. Y., Zheng, Y., Qi, Y. J., & Guo, J. H. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* F21 against *Fusarium* Wilt on watermelon. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–17.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211–226.
- Jonit, N. Q., Low, Y. C., & Tan, G. H. (2016). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Biochemical tests, rice (*Oryza sativa*), bacterial leaf blight (BLB) disease, Sekinchan. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 4(3), 63–69.
- Kanjanamaneesathian, M., Kusonwiriawong, C., Pengnoo, A., & Nilratana, L. (1998). Screening of potential bacterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial formulations for effective application. *Australasian Plant Pathology*, 27(3), 198–206.

- Kauffman, H. E., Reddy, A. P. K., Hsieh, S. P. Y., & Merca, S. D. (1973). Improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Disease Reporter*, 57(6), 537–541.
- Khoa, N. Đ., Giàu, N. Đ. N., & Tuấn, T. Q. (2016). Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 103, 1–10.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259–1266.
- Knowles, A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *The Environmentalist*, 28(1), 35–44.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–19.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
- Kumar, P. N., Sujatha, K., Laha, G. S., Rao, K. S., Mishra, B., Viraktamath, B. C., Hari, Y., Reddy, C. S., Balachandran, S. M., Ram, T., Madhav, M. S., Rani, N. S., Neeraja, C. N., Reddy, G. A., Shaik, H., & Sundaram, R. M. (2012). Identification and Fine-Mapping of Xa33, a Novel Gene for Resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Phytopathology*, 102(2), 222–228.
- Latif, M. A., Rahman, M. M., Kabir, M. S., Ali, M. A., Islam, M. T., & Rafii, M. Y. (2011). Genetic diversity analyzed by quantitative traits among rice (*Oryza sativa* L.) genotypes resistant to blast disease. *African Journal of Microbiology Research*, 5(25), 4383–4391.

- Lee, K. S., Rasabandith, S., Angeles, E. R., & Khush, G. S. (2003). Inheritance of Resistance to Bacterial Blight in 21 Cultivars of Rice. *Phytopathology*, *93*(2), 147–152.
- Li, S. Bin, Xu, S. R., Zhang, R. N., Liu, Y., & Zhou, R. C. (2016). The antibiosis action and rice-induced resistance, mediated by a lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* B014, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(4), 748–756.
- Lim, C., Kim, J., Choi, J. N., Ponnusamy, K., Jeon, Y., Kim, S. U., Kim, J. G., & Lee, C. H. (2010). Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(3), 494–500.
- Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. (2020). Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of Applied Microbiology*, *128*(1), 242–254.
- Locatelli, G. O., dos Santos, G. F., Botelho, P. S., Finkler, C. L. L., & Bueno, L. A. (2018). Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control*, *117*, 21–29.
- López-Cruz, R., Ragazzo-Sánchez, J. A., & Calderón-Santoyo, M. (2020). Microencapsulation of *Meyerozyma guilliermondii* by spray drying using sodium alginate and soy protein isolate as wall materials: a biocontrol formulation for anthracnose disease of mango. *Biocontrol Science and Technology*, *30*(10), 1116–1132.

- Lucas, J., Ralaivao, M., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2020). A new approach for the microencapsulation of curcumin by a spray drying method, in order to value food products. *Powder Technology*, *362*, 428–435.
- Ma, X., Wang, X., Cheng, J., Nie, X., Yu, X., Zhao, Y., & Wang, W. (2015). Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological Control*, *90*, 34–41.
- Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*, *54*(2), 83–89.
- Manonmani, A. M., Prabakaran, G., & Hoti, S. L. (2008). Retention of mosquito larvicidal activity of lyophilized cells and WDP formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on long-term storage. *Acta Tropica*, *105*(2), 170–175.
- Meng, X., Yu, J., Yu, M., Yin, X., & Liu, Y. (2015). Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. *Biological Control*, *85*, 46–51.
- Mew, T. W. (1993). Focus on bacterial blight of rice. *Plant Disease*, *77*(1), 5.
- Mizukami, T., & Wakimoto, S. (1969). Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. *Annual Review of Phytopathology*, *7*(1), 51–72.
- Monteiro, S. M., Clemente, J. J., Henriques, A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M. J., & Cunha, A. E. (2005). A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, *21*(4), 1026–1031.

- Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 6(4), 245–252.
- Myo, E. M., Liu, B., Ma, J., Shi, L., Jiang, M., Zhang, K., & Ge, B. (2019). Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control*, 134, 23–31.
- Niño-Liu, D. O., Ronald, P. C., & Bogdanove, A. J. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology*, 7(5), 303–324.
- Noda, T., & Kaku, H. (1999). Growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* In Planta and in Guttation Fluid of Rice. *Japanese Journal of Phytopathology*, 65(1), 9–14.
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2009). Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 471–479.
- Pal, K. K., Scholar, V., & Gardener, B. M. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*.
- Pandin, C., Le Coq, D., Deschamps, J., Védie, R., Rousseau, T., Aymerich, S., & Briandet, R. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: A biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease. *Journal of Biotechnology*, 278, 10–19.
- Park, J. K., & Chang, H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18(4), 303–319.

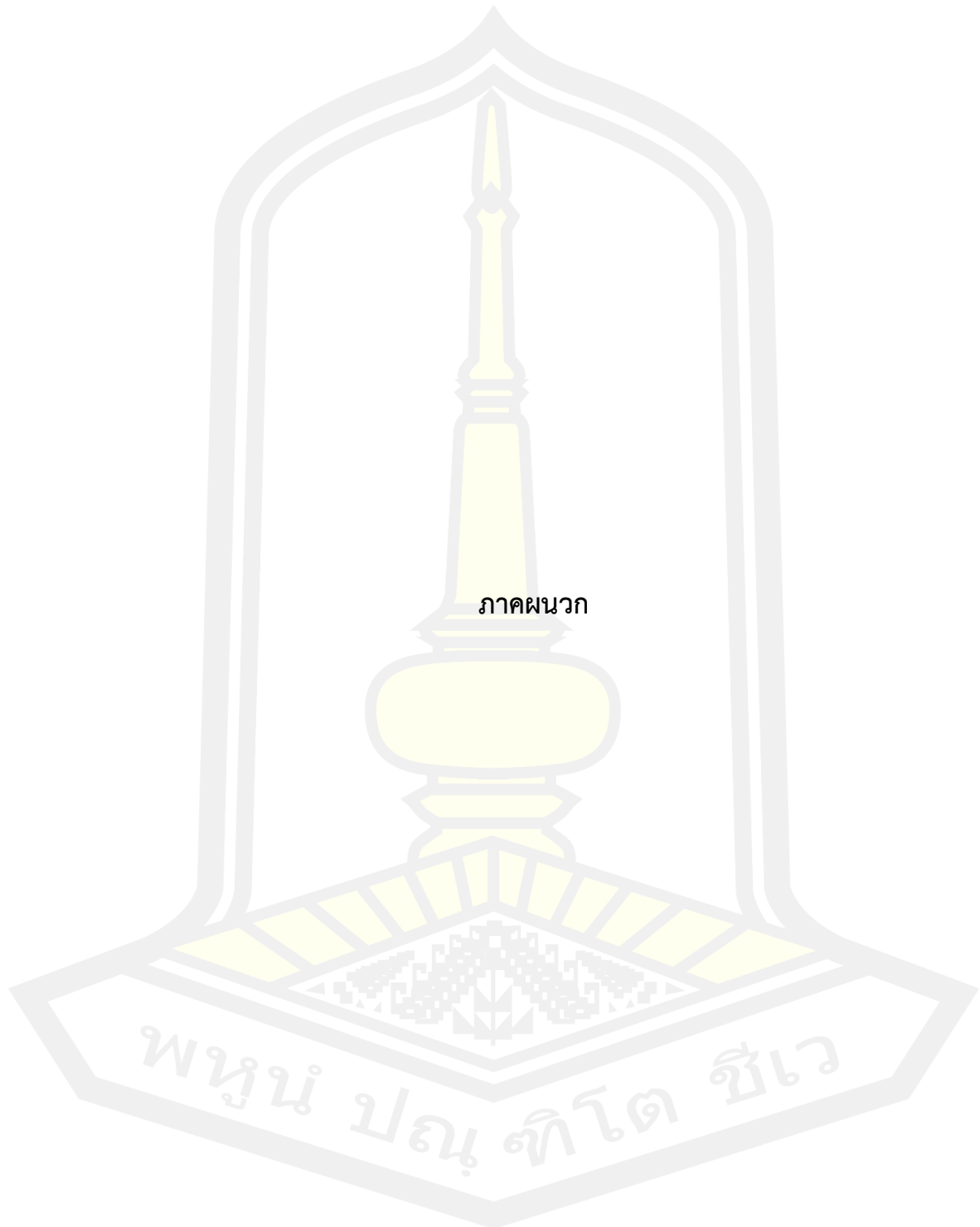
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, *24*(6), 1–13.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, *116*(2), 369–381.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Vilela, S., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation*, *23*(3), 245–257.
- Reyes, V., Chotiko, A., Chouljenko, A., Campbell, V., Liu, C., Theegala, C., & Sathivel, S. (2018). Influence of wall material on production of spray dried *Lactobacillus plantarum* nrrl b-4496 and its viability at different storage conditions. *Drying Technology*, *36*(14), 1738–1748.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, *111*(1), 102–109.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Durán-Lugo, R., Prado-Barragán, L. A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International*, *40*(10), 1299–1306.

- Rokka, S., & Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1), 1–12.
- Sanjoy, K. Das, Sheba, D., Rajan, R., Hirak, M., Tripti, H., Mohanraj, P., Jasmina, K., & Arunabha, N. (2011). Microencapsulation techniques and its practice. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6(2), 1–23.
- Santos, M., Diáñez, F., Moreno-Gavira, A., Sánchez-Montesinos, B., & Gea, F. J. (2019). *Cladobotryum mycophilum* as Potential Biocontrol Agent. *Agronomy*, 9(12).
- Sha, Y., Wang, Q., & Li, Y. (2016). Suppression of *Magnaporthe oryzae* and interaction between *Bacillus subtilis* and rice plants in the control of rice blast. *SpringerPlus*, 5(1), 1–13.
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens : a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.
- Shalini, D., Benson, A., Gomathi, R., John Henry, A., Jerritta, S., & Melvin Joe, M. (2017). Isolation, characterization of glycolipid type biosurfactant from endophytic *Acinetobacter* sp. ACMS25 and evaluation of its biocontrol efficiency against *Xanthomonas oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 252–258.
- Shi, W., Li, C., Li, M., Zong, X., Han, D., & Chen, Y. (2016). Antimicrobial peptide melittin against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(11), 5059–5067.

- Shoda, M. (2000). Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 515–521.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857.
- Suh, J.-P., Jeung, J.-U., Noh, T.-H., Cho, Y.-C., Park, S.-H., Park, H.-S., Shin, M.-S., Kim, C.-K., & Jena, K. K. (2013). Development of breeding lines with three pyramided resistance genes that confer broad-spectrum bacterial blight resistance and their molecular analysis in rice. *Rice*, 6(1), 5.
- Swinkels, J. J. M. (1985). Composition and Properties of Commercial Native Starches. *Starch - Stärke*, 37(1), 1–5.
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102–111.
- Tagami, Y. (1962). Historical review of the researchers on bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson; Special report. *Plant Disease and Insect Pests Forecasting Service*, 10, 112.
- Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Safdar, A., Huang, Z., Rajer, F. U., & Gao, X. (2017). Effect of volatile compounds produced by *Ralstonia solanacearum* on plant growth promoting and systemic resistance inducing potential of *Bacillus* volatiles. *BMC Plant Biology*, 17(1), 133.
- Tang, H. W., Abbasiliasi, S., Murugan, P., Tam, Y. J., Ng, H. S., & Tan, J. S. (2020). Influence of freeze-drying and spray-drying preservation methods on survivability rate of different types of protectants encapsulated *Lactobacillus acidophilus* FTDC 3081. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 84(9), 1913–1920.

- Teera-Arunsiri, A., Supphantharika, M., & Ketunuti, U. (2003). Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *Journal of economic entomology*, *96*(2), 292-299.
- Thai Rice Exporters Association. (2021). *Market Reports*.
http://www.thairiceexporters.or.th/Rice_reports_eng.htm
- Wang, C., Zhao, D., Qi, G., Mao, Z., Hu, X., Du, B., Liu, K., & Ding, Y. (2020). Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for Promoting the Growth of *Malus hupehensis* Rehd. and Inhibiting *Fusarium verticillioides*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–16.
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., & Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, *5*, 1–9.
- Wu, Y., Zhou, L., Lu, F., Bie, X., Zhao, H., Zhang, C., Lu, Z., & Lu, Y. (2019). Discovery of a novel antimicrobial lipopeptide, brevibacillin V, from *Brevibacillus laterosporus* fmb70 and its application on the preservation of skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(45), 12452–12460.
- Xie, S., Zang, H., Jun Wu, H., Uddin Rajer, F., & Gao, X. (2018). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, *19*(1), 49–58.
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Abadías, M., & Teixidó, N. (2012). Formulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA-8 by spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(5), 954–965.

- Yasmin, S., Hafeez, F. Y., Mirza, M. S., Rasul, M., Arshad, H. M. I., Zubair, M., & Iqbal, M. (2017). Biocontrol of Bacterial Leaf Blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1895.
- Yasmin, S., Zaka, A., Imran, A., Zahid, M. A., Yousaf, S., Rasul, G., Arif, M., & Mirza, M. S. (2016). Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by inoculated bacteria. *PLoS ONE*, *11*(8), 1–19.
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, *6*(1), 205–214.
- Zhang, L., Zhang, X., Zhang, Y., Wu, S., Gelbiç, I., Xu, L., & Guan, X. (2016). A new formulation of *Bacillus thuringiensis*: UV protection and sustained release mosquito larvae studies. *Scientific Reports*, *6*, 1–8.
- Zhou, L., Huang, T.-W., Wang, J.-Y., Sun, S., Chen, G., Poplawsky, A., & He, Y.-W. (2013). The rice bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces 3-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid via xanB2 for use in xanthomonadin, ubiquinone, and exopolysaccharide biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*(10), 1239–1248.



การเตรียมสารและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. กลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

กลีเซอรอล 20 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. สารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์

NaCl 0.85 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

3. เจลอากาศโรส 1 เปอร์เซ็นต์

เจลอากาศโรส 1 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar (NGA)

beef extract 1.5 กรัม

yeast extract 1.5 กรัม

bacteriological peptone 5 กรัม

NaCl 0.5 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส 10 กรัม

agar 18 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA)

beef extract 1.5 กรัม

yeast extract 1.5 กรัม

bacteriological peptone 5 กรัม

NaCl 0.5 เปอร์เซ็นต์

agar 18 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB)

beef extract	1.5 กรัม
yeast extract	1.5 กรัม
bacteriological peptone	5 กรัม
NaCl	0.5 เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ modified nutrient broth

ส่วนของ nutrient broth

beef extract	1.5 กรัม
yeast extract	1.5 กรัม
bacteriological peptone	5 กรัม
NaCl	0.5 เปอร์เซ็นต์

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ส่วนของแหล่งคาร์บอน

ซูโครส 10, 20, 30 หรือ 40 กรัม

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ส่วนของ minerals solution

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.045 กรัม
KCl	1 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 กรัม
MnCl_2	0.03 กรัม

ฆ่าเชื้อโดยกรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.22 ไมครอน

นำทั้ง 3 ส่วนผสมกันโดยปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ



คณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบัน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

เลขที่การรับรอง : IBC14-15/2563

ชื่อโครงการวิจัย

ภาษาไทย : การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus spp.* ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันเพื่อควบคุมเชื้อ *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

ภาษาอังกฤษ : Development of *Bacillus spp.* bio-product using microencapsulation technique for control of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, a causal agent of rice bacterial leaf blight

ผู้วิจัย : นางสาวณัฐนา สวัสดิ์พาณิชย์

หน่วยงานที่รับผิดชอบ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สถานที่ทำการวิจัย : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

รับรองประเภทที่ 2

วันที่รับรอง : 3 ธันวาคม 2563

วันหมดอายุ : 2 ธันวาคม 2564

ข้อเสนอการวิจัยนี้ ได้รับการพิจารณาและให้ความเห็นชอบจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบัน มหาวิทยาลัยมหาสารคามแล้ว และอนุมัติในด้านความปลอดภัยทางชีวภาพประเภทที่ 2 ให้ดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่องข้างต้นได้ บนพื้นฐานของโครงร่างงานวิจัยที่คณะกรรมการฯ ได้รับและพิจารณา หากมีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ในโครงการวิจัย ผู้วิจัยจักต้องยื่นขอรับการพิจารณาใหม่

(ศาสตราจารย์อนงค์ฤทธิ์ แข็งแรง)

รองอธิการบดีฝ่ายพัฒนาโครงสร้างพื้นฐาน วิจัยและนวัตกรรม
ประธานคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	ณัฐนา สวัสดิ์พานิชย์
วันเกิด	9 เมษายน พ.ศ. 2538
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	22 หมู่ 1 ถนนรณชัยชาญยุทธ ตำบลอาจสามารถ อำเภออาจสามารถ จังหวัดร้อยเอ็ด รหัสไปรษณีย์ 45160
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2549 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลร้อยเอ็ด อำเภอเมืองร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด พ.ศ. 2555 ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนสตรีศึกษา อำเภอเมืองร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด พ.ศ. 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2564 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
ทุนวิจัย	โครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก ระหว่างสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กับ สถาบันการศึกษา

พูน บุญ ทิโต ชีเว