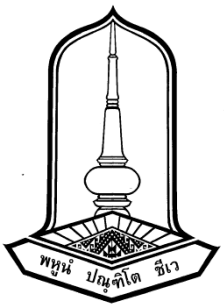


สารสกัดเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร ต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

เอกสิทธิ์ อ่อนนางใย

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรกฎาคม 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

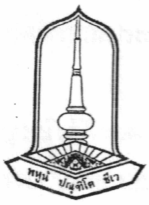
Mahasarakham University

สารสกัดเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร ต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

เอกสิทธิ์ อ่อนนางใย

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรกฎาคม 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายเอกสิทธิ์ อ่อนนางใย แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....	ประธานกรรมการ
(รศ.ดร.ศิริธร ศิริอมรพรรณ)	(อาจารย์บัณฑิตศึกษาประจำคณะ)
.....	กรรมการ
(ผศ.ดร.ประภัสสร บุษหมั่น)	(อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก)
.....	กรรมการ
(ผศ.ดร.วิจิตรา หลวงอินทร์)	(อาจารย์บัณฑิตศึกษาประจำคณะ)
.....	กรรมการ
(ผศ.ดร.ปวีณา รัตนเสนา)	(ผู้ทรงคุณวุฒิ)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....	.....
(รศ.ดร.อนุชิตา มุ่งงาม)	(ผศ.ดร.กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีคณะเทคโนโลยี	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 21 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2561

Mahasarakham University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริธร ศิริอมรพรรณ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา หลวงอินทร์ อาจารย์ระดับบัณฑิตศึกษาประจำคณะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา รัตนเสนา ผู้ทรงคุณวุฒิ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประภัสสร บุษหมั่น อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำวิธีดำเนินงานวิจัย แนวทางแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางด้านวิชาการ และแนะนำแนวความคิดที่เป็นประโยชน์ทั้งในด้านการเรียน การทำงาน และการดำรงชีวิต

ขอขอบพระคุณพี่ๆ น้องๆ สมาชิกในหน่วยวิจัย Biological control research unit คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคามทุกคนที่ได้ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณพ่อมานิตย์ อ่อนนางใย คุณแม่ดวงจันทร์ อ่อนนางใย ผู้ให้ชีวิตและผู้ให้โอกาสทางการศึกษา รวมทั้งให้การอบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ประโยชน์และคุณค่าที่ได้จากรายงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยของมอบบูชาพระคุณบุพการี และบูรพาจารย์ที่ประสาทความรู้ให้แก่ผู้วิจัยจนประสบผลสำเร็จ

เอกสิทธิ์ อ่อนนางใย

Mahasarakham University

ชื่อเรื่อง สารสกัดเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช
ผู้วิจัย นายเอกสิทธิ์ อ่อนนางใย
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประภัสสร บุษหมั่น
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2561

บทคัดย่อ

การศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* PB09 มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 และประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์จากแบคทีเรียดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช ซึ่งเริ่มจากการนำแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มาเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบ/นาที โดยทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน Lauria Bertani broth (LB) ซึ่งประกอบไปด้วย ทริปโตน 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และทำการเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตร LB ที่มีการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร คือ มีการเติมกากมันสำปะหลังปรับสภาพหรือกากน้ำตาลในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงไปเพื่อทดแทนทริปโตนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเดิม และทำการเติมกากถั่วเหลือง หรือกากยีสต์ปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงไปเพื่อทดแทนสารสกัดยีสต์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเดิม พบว่า การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตร LB ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 14.3 กรัม/ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตร LB ที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.4 กรัม/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน LB และได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.03 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ การศึกษาประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Rhizoctonia solani* โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารเหลว LB ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* สูงสุดที่ 85.00±1.90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสูงสุด คือ ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เมื่อใช้อาหารปรับสูตร LB ที่ใช้กากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ 67.00±1.37 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับ

Mahasarakham University

อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน LB คือ 65.00±3.53 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสมในการใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เพื่อผลิตสารเมทาโบไลท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งศัตรูพืช คือ กากน้ำตาล และกากยีสต์ ดังนั้นจึงนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสากรรมเกษตรทั้งสองอย่างนี้ มาศึกษาต่อโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เพื่อผลิตสารเมทาโบไลท์สูงในถังหมักแบบกะขนาด 5 ลิตร พบว่า สารเมทาโบไลท์ของส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *F. oxysporum* ได้ถึง 86.00±0.30 เปอร์เซ็นต์ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร มีฤทธิ์เป็นสารต้านจุลชีพ โดยมีประสิทธิภาพในยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้ดี จึงน่าจะนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมทางชีวภาพในอนาคต

คำสำคัญ: *Xenorhabdus stockiae* PB09, สารเมทาโบไลท์, กากน้ำตาล, กากมันสำปะหลัง, กากถั่วเหลือง, กากยีสต์ และเชื้อราก่อโรคพืช

Mahasarakham University

TITLE Crude metabolite extract of *Xenorhabdus stockiae* PB09 produced from agro-industrial waste against plant pathogenic fungi

AUTHOR Mr. Ekasit On-nangyai

DEGREE Master Degree of Science **MAJOR** Biotechnology

ADVISORS Asst. Prof. Dr.Prapassorn Bussaman

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2018

ABSTRACT

This study focused on the use of agricultural wastes as carbon and nitrogen sources for the production of bacterial metabolites from *Xenorhabdus stockiae* PB09. The aim of the study was to examine the growth and efficacy of *X. stockiae* PB09 for inhibiting fungal plant pathogens. In this study, *X. stockiae* PB09 bacteria were initially cultured in original Lauria Bertani broth (LB), which containing Tryptone 10.0 g, Yeast extracts 5.0 g, and Nacl 10.0 g in 1 L of distilled water, by using flask-scale shaker at 200 rpm and 28°C, and the resulting culture was compared with the modified LB media of which tryptone (original carbon source) was replaced by cassava pulp or molasses at 1% (w/v) and yeast extract (original nitrogen source) was replaced by soybean pulp or brewer's yeast at 0.5% (w/v). After 96 h of incubation, *X. stockiae* PB09 bacteria that were cultured in modified LB medium which using molasses as carbon source were shown to have maximal cell dried weight at 14.3 g/L. Also, *X. stockiae* PB09 bacteria cultured in modified LB medium that using brewer's yeast as nitrogen source were found to have maximal cell dried weight at 11.4 g/L, which was similar to that cultured in original LB which resulting in cell dried weight at 11.03 g/L. Moreover, the metabolites derived from *X. stockiae* PB09 were used for inhibiting the four pathogenic fungi, including *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizoctonia solani*. *X. stockiae* PB09 was cultured in modified LB medium that using molasses as carbon source and the results showed that its cell-free supernatant could maximally inhibit the growth of *F. oxysporum* at 85.00±1.90%. In addition, when soy bean pulp was used as nitrogen source, bacterial cell-free supernatant was found to have the significant level of inhibition against *R. solani* at 67.00±1.37%, which was similar to 65.00±3.53% inhibition due to the use of original LB medium. From these, the results showed that the agricultural wastes suitable for

Mahasarakham University

promoting *X. stockiae* PB09 bacteria to produce antifungal metabolites were molasses and soybean pulp. Therefore, these two agricultural wastes were further assessed by 5L-batch fermentation and the results showed that *X. stockiae* PB09 cell-free supernatant could effectively suppress the growth of *F. oxysporum* up to 86.00±0.30%. The results of this study demonstrated that the metabolites from *X. stockiae* PB09 bacteria cultured by using agricultural wastes can be applied as effective antifungal agents and have potential to be used as biological control products in the future.

Key Words: *Xenorhabdus stockiae* PB09, metabolite, molasses, cassava pulp, soybean pulp, brewer's yeast and fungal plant pathogens

Mahasarakham University

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย	3
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 แบคทีเรีย *Xenorhabdus*	5
2.1.1 ภาวะ Symbiotic ระหว่างแบคทีเรียกับไส้เดือนฝอย	5
2.1.2 ลักษณะการก่อโรค และกลไกการเข้าทำลายตัวอ่อนแมลง	6
2.1.3 สารเมทาโบไลท์ (metabolites) จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus*	7
2.1.4 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย	10
2.2 วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่ใช้ในการวิจัย	14
2.2.1 กากน้ำตาล (Molasses)	14
2.2.2 กากมันสำปะหลัง (Cassava pulp)	17
2.2.3 กากถั่วเหลือง (Soybean meal)	18
2.2.4 กากยีสต์ (Spent yeast)	19
2.3 เชื้อราก่อโรคพืชใช้ทดสอบในงานวิจัย	20
2.3.1 *F. oxysporum*	20
2.3.2 *Phytophthora* sp.	22
2.3.3 *C. gloeosporiodes*	23
2.3.4 *R. solani*	24
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26

Mahasarakham University

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 28
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 28
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย 29
3.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย 30
3.4 แผนการวิจัย 30
3.5 ขั้นตอนการวิจัย 31
3.6 การวิเคราะห์และการทดสอบทางชีววิทยา 33
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล 34
3.8 สถิติที่ใช้ในการวิจัย 34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย 35
4.1 ผลของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์ของแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 35
4.2 ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ในถังหมักแบบกะ 55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 59
5.1 สรุปผลการวิจัย 59
5.2 ข้อเสนอแนะ 60
เอกสารอ้างอิง 61
ภาคผนวก 66
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลิทรีย์ 67
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี 71
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน 73
ภาคผนวก ง ลักษณะเชื้อราก่อโรคหลังจากได้รับสารเมทาโบไลท์ที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 75
ประวัติย่อผู้วิจัย 78

Mahasarakham University

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 2.1 องค์ประกอบต่างๆ ของกากน้ำตาล 16

ตาราง 2.2 สารประกอบไนโตรเจนต่างๆ ที่พบในกากน้ำตาล 17

ตาราง 2.3 แสดงองค์ประกอบของยีสต์ 20

ตาราง 4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 38

ตาราง 4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 39

ตาราง 4.3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 40

ตาราง 4.4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 41

ตาราง 4.5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 42

ตาราง 4.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 43

ตาราง 4.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 44

Mahasarakham University

หน้า

ตาราง 4.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 45
ตาราง 4.9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 48
ตาราง 4.10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 49
ตาราง 4.11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 50
ตาราง 4.12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 51
ตาราง 4.13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 52
ตาราง 4.14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 53
ตาราง 4.15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 54
ตาราง 4.16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 55

Mahasarakham University

หน้า

ตาราง 4.17 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชสูงสุด
หลังจากทดสอบกับสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09
ทั้งที่เพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ และที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะ 57

Mahasarakham University

สารบัญภาพประกอบ

หน้า

ภาพประกอบ 2.1 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ที่อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอย *Steinermatidae* 6

ภาพประกอบ 2.2 สารประกอบ xenorhabdins 7

ภาพประกอบ 2.3 สารประกอบ xenocoumacins 8

ภาพประกอบ 2.4 สารประกอบ nematophin 8

ภาพประกอบ 2.5 สารประกอบ xenorxides 9

ภาพประกอบ 2.6 สารประกอบ xenematide 9

ภาพประกอบ 2.7 ลักษณะของเส้นใย และการก่อโรคของเชื้อรา *F oxysporum* 21

ภาพประกอบ 2.8 ลักษณะของเส้นใย และการก่อโรคของเชื้อรา *P. infestans* 23

ภาพประกอบ 2.9 ลักษณะของเส้นใย และการก่อโรคของเชื้อรา *C. gloeosporioides* 24

ภาพประกอบ 2.10 ลักษณะของเส้นใย และการก่อโรคของเชื้อรา *R. solani* 25

ภาพประกอบ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 36

ภาพประกอบ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร 46

ภาพประกอบ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ในน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสม 56

ภาพประกอบ ค1 กราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ที่เวลาเวลาการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง 73

ภาพประกอบ ง1 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum gloeosporioides* (A), *Phytopthora* sp. (B), *Fusarium oxysporum* (C) และ *Rhizoctonia solani* (D) 75

ภาพประกอบ ง2 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราก่อโรคแต่ละชนิดเมื่อทดสอบกับสารเมทาโบไลท์ *Colletotrichum gloeosporioides* (A), *Phytopthora* sp. (B), *Fusarium oxysporum* (C) และ *Rhizoctonia solani* (D) 76

Mahasarakham University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการเพาะปลูกพืชเป็นส่วนใหญ่และมีโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรเกิดขึ้นมากมาย เพื่อการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร จึงส่งผลก่อให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรในปริมาณมาก เช่น กากน้ำตาลจากโรงงานน้ำตาล กากมันสำปะหลังจากโรงงานแป้งมัน กากยีสต์จากอุตสาหกรรมเบียร์ กากถั่วเหลืองจากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลือง และอื่นๆ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีผู้ที่มีความสนใจที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรเหล่านี้มาใช้ให้เป็นประโยชน์มากขึ้น เช่น การหมักเอทธานอลจากน้ำอ้อยหรือกากน้ำตาล การผลิตกรดแลกติก และการผลิตโอลิโกแซ็คคาร์ไลด์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น

ปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียมาผลิตสารต่างๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางเศรษฐกิจมีหลายด้าน เช่น การผลิตยาปฏิชีวนะ และสารควบคุมศัตรูพืช เป็นต้น และเนื่องจากในช่วงระหว่างการเจริญของแบคทีเรียจะมีการผลิตสารเมทาโบไลท์เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตและช่วยป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก (เสาวนีย์ ธรรมสถิต, 2547) สามารถผลิตได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง ดังนั้นสารเมทาโบไลท์จากแบคทีเรียจึงถูกนำมาใช้กันในวงกว้าง (สมใจ ศิริโภค, 2550) ทั้งนี้ พบว่ามีแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารเมทาโบไลท์ได้ และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรีย *Xenorhabdus* เป็นแบคทีเรียอีกหนึ่งสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารเมทาโบไลท์ได้อย่างหลากหลาย และมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สาร Xenocoumacin 1 หรือที่เรียกสั้นๆ ว่า Xcin1 ซึ่งเป็นสารที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* var. *pekingensis* สาร Xcin1 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.25-4.17 ไมโครกรัมต่อลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Phytophthora* spp. ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าสาร Xcin1 สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อลิตร ยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 92.63 เปอร์เซ็นต์ภายใต้ห้องปฏิบัติการ และในแปลงทดสอบยับยั้งได้ 80.27 เปอร์เซ็นต์ (Xiufen *et al*., 2011) ทั้งนี้แบคทีเรีย *Xenorhabdus* จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในวงศ์ Steinernematidae ในระยะ IJ (Infective juvenile) โดยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Symbiotic association) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังจัดเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลง (Entomopathogenic bacteria) (Akhurst, 1980) แบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีบทบาทสำคัญหลายประการในขณะที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับไส้เดือนฝอย เช่น ทำหน้าที่ฆ่าแมลง (Forst *et al*., 1997) และจัดเตรียมแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของไส้เดือนฝอย

Mahasarakham University

โดยการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยเนื้อเยื่อภายในตัวแมลง และปกป้องซากแมลงโดยการสร้างสารประกอบ ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา (Webster *et al.*, 2001) ซึ่งจากประโยชน์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ทำให้ Fang *et al*. (2010) ได้ทำการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophila* TB พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Tryptone soyptone broth (TSB) เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญสูงสุด 27 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงถึง 246.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนอื่นๆ เพื่อเพิ่มการผลิตสารปฏิชีวนะ พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนจากกลูโคส และเปปโตนจะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้นเป็น 256.7 และ 263.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เพราะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึงประสิทธิภาพการในการยับยั้งเชื้อราของสารเมทาโบไลท์จากเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* PB09 และการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่สามารถผลิตสารเมทาโบไลท์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค การเข้าทำลายแมลง และการกำจัดศัตรูพืชต่างๆ รวมทั้งใช้ในการปกป้องผลผลิตทางการเกษตร ช่วยลดต้นทุน ลดปริมาณการใช้สารเคมีเพื่อสุขภาพ และคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นของเกษตรกร

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตรที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในระดับฟลาสก์ และถังหมักแบบกะ

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์ของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงด้วยแหล่งอาหารจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร ต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ศึกษาวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในระดับฟลาสก์ และถังหมักแบบกะ

1.3.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ด้วยแหล่งอาหารวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

Mahasarakham University

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1.4.1 ทราบถึงวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในระดับฟลาสก์ และในถังหมักแบบกะ

1.4.2 ทราบถึงศึกษาประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ต่อการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืช

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.5.1 แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 หมายถึง แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอยในวงศ์ Steinernematidae

1.5.2 สารเมทาโบไลท์ (Metabolite) หมายถึง สารที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ประกอบด้วยสารที่มีคุณสมบัติในการควบคุมศัตรูพืชได้

1.5.3 วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร หมายถึง ผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมทางการเกษตร ซึ่งมีการนำวัตถุดิบทางการเกษตรมาใช้ในกระบวนการต่างๆ

1.5.4 เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย (Cells suspension, CS) หมายถึง เซลล์ของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลว

1.5.5 ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย (Cell-free supernatant, CFS) หมายถึง ส่วนใสของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย และผ่านการกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออก โดยการปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย ในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใส (Supernatant) มากรองผ่านกระดาษกรองแบคทีเรียขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมครอน

1.5.6 สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย (Crude cell extract, CE) หมายถึง สารหรือส่วนใสที่ได้ภายหลังจากการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก แล้วทำการกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออก โดยการปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย ในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และนำส่วนใส (Supernatant) มากรองผ่านกระดาษกรองแบคทีเรียขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมครอน

1.5.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW) หมายถึง น้ำหนักของเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 หลังการเพาะเลี้ยง โดยนำเอาเฉพาะเซลล์แบคทีเรียมาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

1.5.8 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) หมายถึง ค่าที่บอกความเร็วในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ยิ่งค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงก็จะยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว และถ้าเซลล์ไม่มี

Mahasarakham University

การเจริญ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะมีค่าเป็นศูนย์ ขณะที่ในช่วงการเจริญแบบ Exponential phase ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะค่อนข้างคงที่ นั่นคือ แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่อัตราคงที่

1.5.9 แหล่งคาร์บอน หมายถึง แหล่งอาหารของแบคทีเรียที่อยู่ในรูปของคาร์โบไฮเดรต (Cabohydrate)

1.5.10 แหล่งไนโตรเจน หมายถึง แหล่งอาหารของแบคทีเรียที่อยู่ในรูปของไนโตรเจน (N_2) ทั้งที่อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เกลือไนไตรต์แอมโมเนียม และสารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน โปรตีน เพปไทด์

1.5.11 เชื้อราก่อโรคพืช หมายถึง เชื้อราที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคในพืช และก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชผลทางการเกษตร ในงานวิจัยนี้หมายถึง เชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Phytopthora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Rhizoctonia solani*

1.5.12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช หมายถึง เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช ซึ่งทดสอบบนอาหาร PDA ที่ผสมส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย (Cell-free supernatant, CFS) หรือทดสอบบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย (Crude cell extract, CE) แล้วทำการเปรียบเทียบกับการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชในชุดควบคุมที่ทดสอบบนอาหาร PDA ที่ผสมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Poisoned food technique

Mahasarakham University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรีย *Xenorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยในรูปแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Symbiotic bacteria) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae (Akhurst, 1980) มีรูปร่างเป็นท่อน สามารถเจริญได้ในสภาพที่มี และไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe) จะเข้าไปอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอยวงศ์ Steinernematidae ในระยะ Infective juvenile ไส้เดือนฝอยจะเข้าสู่ระบบเลือดของแมลงทางรูหายใจ หรือผ่านทางช่องเปิดตามลำตัว เช่น ปากและทวารหนัก หรืออาจเจาะทะลุผ่านทางผิวหนังของตัวอ่อนแมลงโดยตรง ภายหลังจากที่เข้าสู่ตัวอ่อนของแมลงแล้ว ไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือดของตัวอ่อนแมลง แบคทีเรียและไส้เดือนฝอยจะฆ่าตัวอ่อนของแมลงอย่างรวดเร็ว โดยแบคทีเรียจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยอวัยวะต่างๆ ของตัวอ่อนแมลง ซึ่งเป็นอาหารของไส้เดือนฝอยต่อไป หลังจากไส้เดือนฝอยกินเนื้อเยื่อที่ย่อยสลายของแมลงแล้วจะมีการเจริญและสืบพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนอยู่ในซากตัวอ่อนของแมลง เมื่อไส้เดือนฝอยรุ่นลูกเจริญเข้าสู่ระยะทำลาย (Infective juvenile, IJ) จะเคลื่อนที่ออกจากซากแมลงตัวเดิมโดยไส้เดือนฝอยจะพาแบคทีเรียออกมาด้วย เนื่องจากเมื่อไส้เดือนฝอยกินเนื้อเยื่อของแมลงก็จะกินแบคทีเรียกลับเข้าไปในลำตัวด้วย จากนั้นไส้เดือนฝอยระยะ IJ ก็จะหาเหยื่อรายใหม่ต่อไป (Forst *et al*., 1997)

2.1.1 ภาวะ Symbiotic ระหว่างแบคทีเรียกับไส้เดือนฝอย

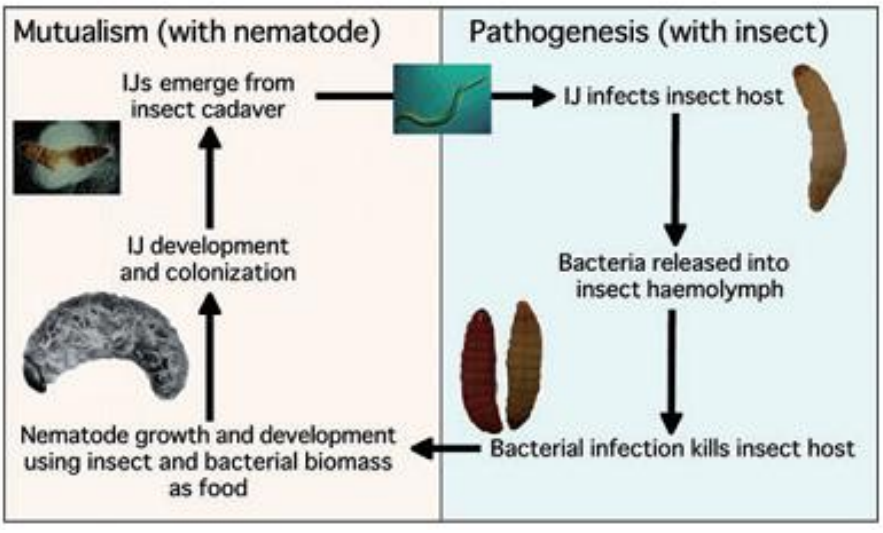
แบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. จะดำรงชีวิตอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอย โดยไส้เดือนฝอยทำหน้าที่ป้องกันอันตรายและเป็นพาหะนำตัวแบคทีเรียเข้าสู่ตัวแมลง ไส้เดือนฝอยจะเข้าหาเยื่อและเจาะไชผ่านผนังลำตัวช่องเปิดหรือรูหายใจของแมลง จากนั้นไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยแบคทีเรียออกมา ทำให้เกิดภาวะเลือดที่เป็นพิษสำหรับแมลง ทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็ว ส่วนแบคทีเรียจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่อาศัยอยู่ภายในช่องว่างลำตัวแมลง แมลงที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะไม่พบจุลินทรีย์เข้าทำลายซ้ำ เนื่องจากแบคทีเรียจะสร้างสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobials) (Paul *et al*., 1981) แมลงที่ตายจะกลายเป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย โดยแบคทีเรียจะเปลี่ยนองค์ประกอบภายในตัวแมลงไปเป็นอาหารสำหรับไส้เดือนฝอย ไส้เดือนฝอยจะมีเซลล์แบคทีเรียอยู่ในตัวและออกมาอยู่ในซากของแมลง แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันจะมีการเตรียมอาหารที่จำเพาะในระหว่างการเพิ่มจำนวนของไส้เดือนฝอย แบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ในระยะ Stationary phase จะผลิตผลึกโปรตีนภายในเซลล์เพื่อเป็นอาหารในการช่วยให้ไส้เดือนฝอยเจริญ และเพิ่มจำนวน (Heidi and Clarke, 2007)

Mahasarakham University

2.1.2 ลักษณะการก่อโรค และกลไกการเข้าทำลายตัวอ่อนแมลง

กลไกการเข้าทำลายตัวอ่อนแมลงของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกัน จะเกิดขึ้นโดยไส้เดือนฝอยเข้าสู่ลำตัวแมลงศัตรูพืชทางปาก ทวาร หรือรูหายใจ จากนั้นจะชอนไชเข้าสู่กระแสเลือดและเจริญเติบโตในตัวแมลง ในตอนแรกที่มีการเข้าสู่ตัวเหยื่อ เหยื่อจะมีระบบที่ป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของแบคทีเรีย แต่เมื่อปริมาณของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น แบคทีเรียที่เข้าไปยังเลือดของเหยื่อจะเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นปุ่มเล็กๆ กระจายไปตามเลือด และไปเกาะอยู่ตามเนื้อเยื่อ ความสามารถของการเกิดโรคของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะต่างกันตามชนิดของแบคทีเรียและชนิดของเหยื่อที่แบคทีเรียเข้าทำลาย (Forst *et al*., 1997)

วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. จะเริ่มต้นและสิ้นสุดเมื่ออพยพออกมาจากลำไส้ของไส้เดือนฝอยซึ่งอาศัยอยู่ในดินและเป็นระยะที่ไม่มีการกินอาหาร เรียกไส้เดือนฝอยในระยะนี้ว่าตัวอ่อนระยะ IJ (ภาพประกอบ 2.1) การเข้าสู่แมลงอาศัยนั้นไส้เดือนฝอยระยะ IJ จะเข้าไปยังช่องว่างภายในลำตัวของแมลง และปลดปล่อยแบคทีเรียออกมา แบคทีเรียจะทำการเพิ่มจำนวน จากนั้นจะฆ่าแมลง และเปลี่ยนซากของแมลงให้เป็นสารอาหารสำหรับไส้เดือนฝอยใช้ในการเจริญและเพิ่มจำนวน หลังจาก 1-3 รอบของการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยนั้น รุ่นลูกของไส้เดือนฝอยจะถูกกระตุ้นให้มีการพัฒนาอยู่ในระยะ IJ รุ่นใหม่ (Wang and Bedding, 1996) แบคทีเรียจะอพยพออกมาโดยระยะ IJ ของไส้เดือนฝอย (มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ของ IJ ที่อพยพออกมาจะพาแบคทีเรียมาด้วย) ระหว่างวงชีวิตของ *Xenorhabdus* sp. จะมีไส้เดือนฝอยประมาณหนึ่งแสนตัวที่ออกมาจากซากแมลงหนึ่งตัว (Heidi and Clarke, 2007)



ภาพประกอบ 2.1 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ที่อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอย Steinernematidae

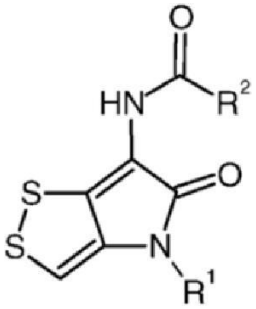
ที่มา: Heidi และ Clarke (2007)

Mahasarakham University

2.1.3 สารเมทาโบไลท์ (Metabolites) จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* สามารถผลิตสารเมทาโบไลท์ (จิรายุ สาอุตม์, 2557) ที่เป็นสาร เมทาโบไลท์ทุติยภูมิได้มากมายหลายชนิด ซึ่งสารเหล่านี้มีการศึกษากันอย่างละเอียดส่วนใหญ่ได้จากการศึกษาแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophila* และ *Xenorhabdus bovienii* ตัวอย่างสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* (Bode, 2009) มีดังต่อไปนี้

1) สารประกอบ Xenorhabdins เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ Dithiolopyrrolone มีโครงสร้างทั้งหมด 5 แบบ (ภาพประกอบ 2.2) แยกได้จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus bovienii* และ *Xenorhabdus nematophila* ในระยะ Phase I มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี เช่น *Micrococcus luteus, Bacillus subtilis, Streptococcus pyogenes* และ *Staphylococcus aureus* แต่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ต่ำ (McInerney *et al*, 1991) นอกจากนี้ Xenorhabdins ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา และมีคุณสมบัติในการเป็นสารฆ่าแมลง แต่ยังมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีฆ่าแมลง

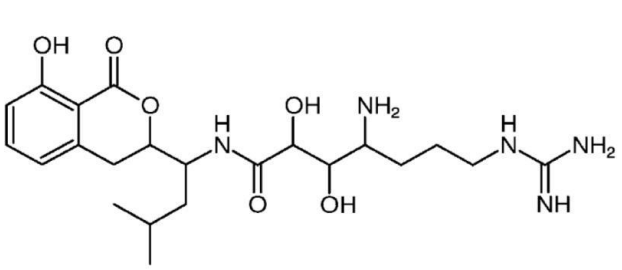


	R^1	R^2
Xenorhabdin 1	H	*n*-pentyl
xenorhabdin 2	H	4-methylpentyl
xenorhabdin 3	H	*n*-heptyl
xenorhabdin 5	Me	4-methylpentyl

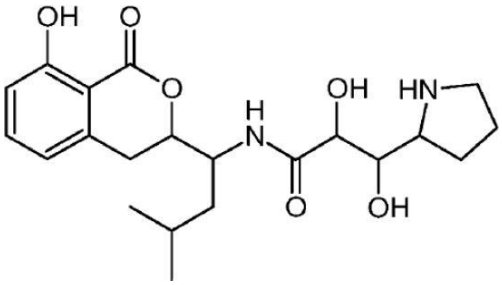
ภาพประกอบ 2.2 สารประกอบ Xenorhabdins
ที่มา : Bode (2009)

2) สารประกอบ Xenocoumacin 1 และ 2 (ภาพประกอบ 2.3) เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ Benzopyran-1-one แยกได้จากแบคทีเรีย *X. nematophila* ในระยะ Phase I มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* และ *Staphylococcus* และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* บางสายพันธุ์ได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพพบว่า สารประกอบ Xenocoumacin 1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า Xenocoumacin 2 นอกจากนี้ Xenocoumacins ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา Xenocoumacin 1 สามารถยับยั้งการเริญของเส้นใยเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ได้สูง และยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Trichophyton mentagrophytes* และ *Trichophyton rubrum* ได้ในระดับปานกลาง ในขณะที่สารประกอบ Xenocoumacin 2 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราเหล่านี้ได้ (McInerney *et al*., 1991)

Mahasarakham University



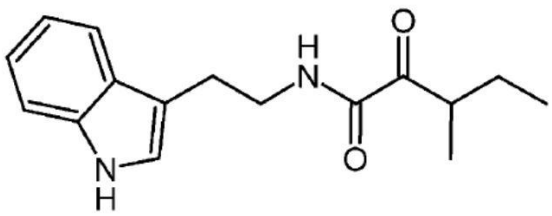
Xenocoumacin 1 (XCN1)



Xenocoumacin 2 (XCN2)

ภาพประกอบ 2.3 สารประกอบ Xenocoumacins
ที่มา : Bode (2009)

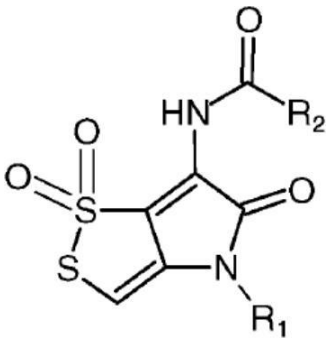
3) สารประกอบNematophin (3-Indoleethyl (3′-Methyl-2′-Oxo Pentanamide) (ภาพประกอบ 2.4) แยกได้จากแบคทีเรีย *X. nematophila* BC1 มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา การที่แบคทีเรียจะสามารถผลิตสารประกอบ Nematophin ได้นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียและสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Li *et al.,* 1997)



ภาพประกอบ 2.4 สารประกอบ Nematophin
ที่มา : Li *et al.* (1997)

4) สารประกอบ Xenoxides (ภาพประกอบ 2.5) แยกได้จากแบคทีเรีย *X. bovienii* มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในแกรมบวกได้หลายชนิด ได้แก่ *B. subtilis, M. luteus* และ *S. aureus* และนอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเชื้อรา โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus famigatus* และ *C. neoformans* ได้ (Webster *et al*., 2001)

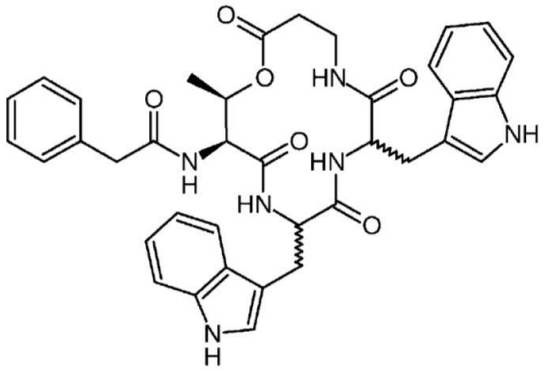
Mahasarakham University



	R^1	R^2
Xenorxides 1	Me	*n-pentyl*
Xenorxides 2	Me	4-methyletyl

ภาพประกอบ 2.5 สารประกอบ Xenorxides
ที่มา : Bode (2009)

5) สารประกอบ Xenematide เป็นสารในกลุ่ม Cyclodepsipeptide (ภาพประกอบ 2.6) ที่สามารถแยกได้จากแบคทีเรีย *X. nematophila* มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ เช่น *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia amylovora*, *P. syringae, R. solanacearum* และ *B. subtilis* และนอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงโดยสามารถฆ่าหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ได้ภายใน 6 วัน (Lang *et al.,* 2008)



ภาพประกอบ 2.6 สารประกอบ Xenematide
ที่มา : Bode (2009)

Mahasarakham University

2.1.4 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

1) อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกระบวนการหมักแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก แต่โดยทั่วไปจะต้องมีส่วนประกอบดังนี้

1.1) แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงานโดยทั่วไปของแบคทีเรีย (สมใจ ศิริโภค, 2550) แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์สำหรับการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์สำหรับการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมากและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชชนิดต่างๆ แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง หรือการใช้เมล็ดข้าวโพด เมล็ดธัญพืชที่บดเป็นชิ้นเล็กๆ อาจย่อยแป้งด้วยกรดเกลือเจือจางหรือเอนไซม์ ได้เป็นกลูโคสที่อยู่ในรูปของแข็งเป็นผง หรืออาจอยู่ในรูปไซรัป อย่างไรก็ตามกลูโคสที่ได้จากการย่อยด้วยกรดอาจมีผลผลิตที่เป็นพิษเจือปนอยู่ จึงไม่เหมาะสำหรับกระบวนการผลิตสารบางอย่าง นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ กากมันสำปะหลัง เนื่องจากมีคาร์โบไฮเดรตสูง หาง่าย และมีราคาถูก ส่วนกากถั่วเหลือง (Soybean meal) ก็นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เนื่องจากมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยในปริมาณสูง จึงใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย

1.2) แหล่งไนโตรเจน

เซลล์แบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (สมใจ ศิริโภค, 2550) ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นกับว่าแบคทีเรียสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยพิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจน และประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย อย่างไรก็ตามในกระบวนการหมักบางชนิด ถ้าใช้สารประกอบไนโตรเจนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว อาจทำให้สร้างผลผลิตที่ต้องการได้น้อย โดยเฉพาะการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยทั่วไปจึงนิยมใช้แหล่งไนโตรเจนที่แบคทีเรียนำไปใช้ได้อย่างช้าๆ และนอกจากนี้ แบคทีเรียบางชนิดก็สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสารอินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดจะต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ แก๊สแอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และไนเตรต ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนอาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน วัตถุดิบที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ กากถั่วเหลือง และกากยีสต์

Mahasarakham University

1.3) แร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญซึ่งปกติต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ ศิริโภค, 2550) ได้แก่ Mg, P, K, S, Ca และ Cl นอกจากนี้ยังมี Trace element ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีก เช่น Co, Cu, Fe, Mn และ Zn แต่โดยทั่วไปมักจะพบ Trace element เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่บ้างแล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่ต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารโดยตรง แร่ธาตุต่างๆ ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ตามปกตินิยมใช้ในรูปของสารอนินทรีย์ เช่น KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4{\cdot}H_2O$, KCl, $CaCO_3$, $FeSO_4{\cdot}H_2O$, $ZnSO_4{\cdot}H_2O$, $MnSO_4{\cdot}H_2O$ และ $CuSO_4{\cdot}H_2O$ เป็นต้น

ส่วนประกอบของอาหารจะต้องมีธาตุต่างๆ จำเป็นต่อการเจริญ การสร้างสาร ปฐมภูมิ และสารทุติยภูมิต่างๆ และการรักษาสภาพของเซลล์ (สมใจ ศิริโภค, 2550) ดังนั้นการกำหนดสูตรอาหารจึงอาจพิจารณาได้จากสมการดังนี้คือ

แหล่งคาร์บอน + แหล่งไนโตรเจน + อื่นๆ $\longrightarrow$ เซลล์ + ผลผลิต + CO_2 + น้ำ + ความร้อน

จากสมการนี้สามารถแสดงค่าในเชิงปริมาณได้ ทำให้คำนวณปริมาณธาตุอาหารที่น้อยที่สุดซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างมวลเซลล์ในปริมาณที่ต้องการได้ อย่างไรก็ตามส่วนประกอบบางอย่างของอาหารจะมีความจำเป็นสำหรับการสร้างผลผลิตแต่ไม่จำเป็นสำหรับการสร้างมวลเซลล์ นอกจากนี้ในการทำสมการให้สมดุลจำเป็นต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบของธาตุในจุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยง ได้แก่ C, H, O, N, S, P, Mg และ K

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในระดับห้องปฏิบัติการ อาจจะใช้สารบริสุทธิ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้ (สมใจ ศิริโภค, 2550) แต่กระบวนการหมักในระดับที่ใหญ่ขึ้น การใช้สารบริสุทธิ์อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากมีราคาแพง โดยทั่วไปการเลือกวัตถุดิบเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักจะพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ ราคาถูก คุณภาพคงที่ และมีใช้ตลอดปี ทำให้ได้ผลผลิตหรือได้มวลเซลล์ต่อกรัมของสารตั้งต้นที่ใช้ไปมากที่สุด ทำให้ได้ผลผลิตหรือมวลเซลล์ความเข้มข้นสูงที่สุด ทำให้มีอัตราการสร้างผลผลิตสูงที่สุด ทำให้เกิดสารอื่นที่ไม่ต้องการน้อยที่สุด ทำให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิตน้อยที่สุด

2) การหมัก (Fermentation)

การหมัก (Fermentation) เริ่มแรกเป็นการอธิบายลักษณะที่เกิดจากการกระทำของยีสต์ในน้ำสกัดจากผลไม้หรือเมล็ดข้าวมอล์ท (สมใจ สิริโภค, 2550) เนื่องจากยีสต์ย่อยสารละลายน้ำตาลภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำให้เกิดฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผุดขึ้นมาคล้ายน้ำเดือด ในสภาวะปัจจุบันนักชีวเคมีและจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมได้นำคำว่าการหมักมาใช้ในความหมายที่แตกต่างกันไป

Mahasarakham University

ในทางชีวเคมี การหมัก หมายถึง การสร้างพลังงานจากการย่อยสลายของสารประกอบอินทรีย์ หรือ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์เนื่องจากเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน

ในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม การหมัก หมายถึง กระบวนการผลิตใดก็ตามที่ได้จากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (Mass culture) ซึ่งจะครอบคลุมถึงกระบวนการใช้และไม่ใช้ออกซิเจน ในขณะที่การหมักทางชีวเคมีหมายถึงเฉพาะกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนเท่านั้น

2.1) ชนิดของการหมักที่มีความสำคัญทางการค้าแบ่งได้ 4 ประเภทใหญ่ๆ คือ (สมใจ ศิริโภค, 2550)

2.1.1) การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นตัวเซลล์ (Microbial cell หรือ Biomass) การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางการค้า ได้แก่ การผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนมปัง (Bakers' yeast) ซึ่งเริ่มผลิตในอุตสาหกรรมครั้งแรกตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 19 และการผลิตเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์หรือสัตว์ (Single cell protein, SCP) ซึ่งเริ่มผลิตครั้งแรกในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 1 ในประเทศเยอรมันนี

2.1.2) การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นเอนไซม์ (Microbial enzyme) การผลิตเอนไซม์สามารผลิตได้ทั้งจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามจุนทรีย์ได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญมากที่สุด เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมากได้ในระยะเวลาสั้น โดยใช้เทคนิคการหมัก และสามารถปรับปรุงผลผลิตให้ได้ปริมาณสูงขึ้นได้ง่ายกว่าจากการผลิตจากพืชหรือสัตว์ และการนำมาใช้ประโยชน์ซึ่งส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหารและยา นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกด้วย เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก (Detergent) อุตสาหกรรมสิ่งทอ การฟอกหนัง และการใช้ในงานวิจัย เป็นต้น

2.1.3) การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นสารเมทาโบไลท์ (Microbial metabolite) โดยที่สารเมทาโบไลท์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ผลิตได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ สารเมทาโบไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) และสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite)

สารเมทาโบไลท์ปฐมภูมิ เป็นสารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ตัวอย่าง เช่น โปรตีน กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ กรดนิวคลีอิก ลิปิด และคาร์โบไฮเดรต จุลินทรีย์จะผลิตสารเหล่านี้ขึ้นในช่วง Trophophase (Log phase) ของการเจริญ ตัวอย่างของสารเมทาโบไลท์ปฐมภูมิที่มีความสำคัญทางการค้าและการผลิตขึ้นโดยการหมัก เช่น เอทานอล กรดซิตริก กรดกลูตามิก ไลซีน อะซิโตน บิวทานอล นิวคลีโอไทด์ โพลีแซคคาร์ไรด์ และวิตามิน

สารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ เป็นสารที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารมัธยัตร์ (Intermediate) หรือผลผลิตจากการกระบวนการเมทาบอลิซึมปฐมภูมิ (Primary Metabolism) ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในช่วง Idiophase (Stationary phase) ของการเจริญ และอาจพบได้ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (Continuous culture) ที่มีอัตราการเจริญต่ำ จุลินทรีย์ที่พบว่ามีการสังเคราะห์สารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิ

Mahasarakham University

ได้แก่ แบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (Filamentous bacteria) แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ (Spore-forming bacteria) และเชื้อรา (Fungi) จุลินทรีย์ที่ยังไม่พบว่ามีการสังเคราะห์สารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิ ได้แก่ แบคทีเรียในแฟมิลี Enterobacteriaceae สำหรับบทบาททางสรีรวิทยาของสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิในเซลล์จุลินทรีย์ที่ผลิตสารนี้ขึ้นมานั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ไม่พบว่ามีหน้าที่ในกระบวนเมทาบอลิซึมของเซลล์ อย่างไรก็ตาม สารเหล่านี้มีความสำคัญมากต่อในทางอุตสาหกรรมการหมัก เนื่องจากมีผลต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เป็นสารส่งเสริมการเจริญ (Growth promoter) หรือมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค เป็นต้น

2.1.4) การหมักเพื่อทำให้เกิดกระบวรการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบ (Transformation process) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในรูปที่คล้ายกัน แต่มีราคาสูงขึ้น ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ หรือ สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา Dehydrogenation, Dehydroxylation, Dehydration, Decarboxylation, Deamination, Oxidation, Condensation หรือ Isomerization การใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าการใช้สารเคมี คือ มีความจำเพาะมากกว่า และสามารถทำได้ที่อุณหภูมิต่ำ โดยไม่ต้องใช้โลหะหนักซึ่งเป็นสารมลพิษเป็นตัวเร่ง Transformation process ที่ใช้จุลินทรีย์ที่รู้จักกันดีได้แก่ กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู (การเปลี่ยนแปลงเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก) อย่างไรก็ตาม Transformation process ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการผลิตสารที่มีราคาแพง เช่น สารปฏิชีวนะ สเตรอยด์ (Steroid) และพรอสตาแกลนดิน (Prostaglandin) เป็นต้น

การแบ่งตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็น 2 ชนิด คือการหมักด้วยอาหารแข็งซึ่งมีการเติมน้ำเล็กน้อยเพียงเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการเท่านั้น เช่น การหมักกรดอะซิติกโดยเชื้อรา เป็นต้น การหมักแบบเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มีลักษณะเหลว เช่น การหมักแอลกอฮอล์ และน้ำส้มสายชู

2.2) การหมักแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ได้เป็น 3 แบบ คือ

2.2.1) การหมักแบบกะ (Batch fermentation) เป็นการหมักในระบบปิด ที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงในระบบแล้วจะไม่มีการเติมสารอาหารใดๆ เพิ่มลงไปอีก

2.2.2) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermeantation) เป็นการหมักแบบต่อเนื่องโดยมีการเติมสารอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญ และเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

2.2.3) การหมักแบบเฟดแบทช์ (Fed-batch fermentation) เป็นการหมักที่มีเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก การหมักแบบนีส่วนใหญ่เป็นการ

Mahasarakham University

แก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอได้ยาก

2.2 วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่ใช้ในการวิจัย

2.2.1 กากน้ำตาล (Molasses) (คมเดช งามสมจิตร, 2553)

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยนั้น เริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบได้น้ำอ้อย แล้วเคี่ยวน้ำอ้อยจนได้ผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมาแยกผลึกน้ำตาลทรายออกจากกากน้ำตาลด้วยหม้อปั่น (Centrifuge) ผลพลอยได้ที่สำคัญจากการผลิตน้ำตาลทรายด้วยวิธีนี้ ได้แก่ กากน้ำตาล (Molasses) ขี้ตะกอน (Filter cake) และกากอ้อย (Bagasses) กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ที่มีคุณค่ามากที่สุด กากน้ำตาลต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบและคุณสมบัติแตกต่างกัน ความแตกต่างนี้ขึ้นอยู่กับท้องถิ่นที่ทำการผลิต กรรมวิธีของโรงงาน ฤดูกาล และสภาพการเก็บเกี่ยว ในอุสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะใช้กากก้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (Black strap molasses) เป็นหลัก ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลซูโครส และมี Growth factor ต่างๆ มากกว่ากากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (Refinery molasses) โดยทั่วไปแล้วกากน้ำตาลเป็น Residual syrup ที่ไม่สามารถตกผลึก ในกากน้ำตาลนั้นจะมีกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นประมาณ 4-6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต

กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามกรรมวิธีในการผลิตน้ำตาลทราย (คมเดช งามสมจิตร, 2553) คือ

1) กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (Plantation white sugar) ซึ่งเรียกว่า Black strap molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์

2) กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (Refine sugar) ซึ่งเรียกว่า Refinery molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์

3) กากน้ำตาลที่ได้จากการทำบางส่วนของน้ำอ้อยแปรสภาพให้เข้มข้น โดยการระเหย (Inverted can juice) ซึ่งเรียกว่า Invert molasses หรือ Hightest molasses วิธีนี้เป็นการผลิตกากน้ำตาลโดยตรง มีน้ำตาลอยู่ประมาณ 77 เปอร์เซ็นต์

กากน้ำตาลมีองค์ประกอบซับซ้อนดังแสดงในตาราง 2.1 ค่าที่ได้เป็นค่าที่พบในกากน้ำตาลของหลายประเทศที่มีการผลิตน้ำตาล (คมเดช งามสมจิตร, 2553) ความถ่วงจำเพาะของกากน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 1.39-1.49 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล คือ คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส กากน้ำตาลบีทจะมีน้ำตาลซูโครสและฟรุกโทสในปริมาณที่น้อย แต่จะมีน้ำตาลราฟีโนสเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งต่างจากน้ำตาลอ้อย กากน้ำตาลอ้อยและการน้ำตาลบีทมีส่วนที่เป็นสารประกอบอ

Mahasarakham University

นินทรีย์ในปริมาณสูง มีวิตามินและสารจำเป็นสำหรับเจริญ (Growth factor) ในปริมาณที่แตกต่างกัน สารประกอบไนโตรเจน และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ อีกหลายชนิดยังนับเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ เช่น Chlorogenic, Caffeic acids, Uronic acids, Sugar alcohol organic acids, Amino acids, Nucleotides, Sterols, Tannins, Plant pigment gums, Waxes และ Lipids ดังแสดงในตาราง 2.2 โดยเฉพาะกากน้ำตาลบีทจะมีสารประกอบพวก Non-amino acids Nitrogen-containing substances อยู่ในปริมาณสูง เช่น Betaine และ Polyamine ชนิดต่างๆ การนำกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลมักจะเกิดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น Osmophilic yeast หรือจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักเอทานอล ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณ Dry matter มากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ และในบางครั้งสามารถพบสปอร์ของรา และแบคทีเรียในกากน้ำตาลที่เก็บรักษาในถังเก็บที่มีช่องว่างระหว่างระดับของกากน้ำตาลกับฝาถังเก็บ ที่จะมีการกลั่นตัวของไอน้ำในอากาศที่อยู่ระหว่างช่องว่างนี้ ส่งผลให้บริเวณผิวของกากน้ำตาลมีความเข้มข้นลดลงเนื่องจากไอน้ำกลั่นตัวมาเจือจางทำให้จุลินทรีย์เจริญได้

กากน้ำตาลมีประโยชน์อยู่มากมาย เนื่องจากในกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลและแร่ธาตุต่างๆ ที่เป็นประโยชน์โดยตรง สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ และการหมักเอทานอล (คมเดช งามสมจิตร, 2553) เนื่องจากกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ซึ่งเป็นแหล่งอาหาร แหล่งพลังงานที่เหมาะสมและราคาไม่แพง จึงมีการใช้เป็นส่วนผสมอาหารสัตว์หลายชนิด ทั้งยังสามารถใช้เป็นปุ๋ยเพราะในกากน้ำตาลมี ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับพืช นอกจากนี้กากน้ำตาลยังใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการหมักหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ สุรา กรดมะนาว กรดน้ำส้ม กรดแลคติก ผงชูรส ยีสต์ขนมปัง และยีสต์อาหารสัตว์ เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูก และเหมาะสมกว่าเมื่อเทียบกับวัตถุดิบชนิดอื่นๆ

Mahasarakham University

ตาราง 2.1 องค์ประกอบต่างๆ ของกากน้ำตาล

Carbohydrates	Percentage values (%)				
	Solids	Sugars	Sucrose	Invert	Raffinose
Blackstrap	80-86	50-65	30-40	10-25	-
Beet	76-85	48-58	47-55	0.2-2.0	0.2-2.0
Refinery	76-84	50-58	32-42	14-20	-
High test	82-86	72-75	-	72-75	-

Vitamins	Percentage values (mg/kg)	
	Cane	beet
Biotin	3	0.4
Folic acids	0.04	0.2
Inositol	6000	8000
Pantothenate	55	100
Pyridoxin	3	5
Riboflavin	3	0.4
Thiamine	2	1.3
Nicotinic acid	800	45
Choline	600	400

Minerals	Percentage values (%)	
	Cane	Molasses
Sodium	0.1-0.4	0.3-0.7
Potassium	1.5-5.0	2-7
Calcium	0.4-0.8	0.1-0.5
Chlroide	0.7-3.0	0.5-1.5
Phosphorus	0.03-0.1	0.02-0.1
Sulphur	0.3-0.8	0.15-0.5

ที่มา : คมเดช งามสมจิตร (2553)

Mahasarakham University

ตาราง 2.2 สารประกอบไนโตรเจนต่างๆ ที่พบในกากน้ำตาล

Nitrogenous compounds	Usual range (%)	Indicative average
Nitrogenous compounds	2.5-4.5	4.0
Crude proteins	0.3-0.5	0.5
Amino acids	**mg/g molasses**	
Alanine	0.02-0.2	
r-Aminobutyric acid	0.06-0.08	
Aspatic acid	0.9-1.65	
Glutamic acid	1.02-1.04	
Glycerine	0.06-0.07	
Leucine	0.03-0.05	
Lysine	0.05-0.07	
Serine	0.39-0.8	
Threonine	0.3-0.9	
Valine	0.11-0.2	

ที่มา : คมเดช งามสมจิตร (2553)

2.2.2 กากมันสำปะหลัง (Cassava pulp)

กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง (พุทธพร แสงเทียน และคณะ, 2559) โดยมีสัดส่วนปริมาณถึง 10% ของหัวมันสำปะหลังสด ที่ถูกนำเข้าสู่กระบวนการผลิต ปัจจุบันในโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังมีการจัดการกับกากมันสำปะหลัง โดยการนำมาตากให้แห้งแล้วขายเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ในราคาที่ต่ำมาก และถ้าไม่มีการจัดการที่ดีอาจทำให้เกิดปัญหาในการเก็บ เกิดกลิ่นเหม็น กลายเป็นมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้

1) กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้จากการผ่านกระบวนการผลิตแป้งสำปะหลัง กรรมวิธีการผลิตที่ใช้ในการผลิตแป้งมันสำปะหลังสำหรับโรงงาน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

1.1) กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตแป้งมันสำปะหลังแบบสลัดแห้ง ในการผลิตหัวมันจะถูกส่งเข้าสู่ตะแกรงร่อนดินทราย (Sand removal drum) เพื่อกำจัดดินทรายที่ติดมากับหัวมันและลอกผิวออก ซึ่งดินทรายและผิวมันที่แยกออกได้นี้ จะนำไปใช้ทำปุ๋ยอินทรีย์ จากนั้นหัวมันที่ปอกเปลือกเรียบร้อยแล้วจะถูกส่งไปยังเครื่องล้างหัวมัน (Root washer) ทำความสะอาดโดยใช้หัวฉีด และทำการฟอกสีมันสำปะหลังโดยการเติมกำมะถัน (Sulfur water) หัวมันที่ล้างเรียบร้อยแล้วส่งต่อไปยังเครื่องหั่นหัวมัน ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-2 นิ้ว แล้วผ่านเข้าสู่เครื่องขูดหัวมัน (Root rasper) ทำให้ได้

Mahasarakham University

มันสำปะหลังชิ้นละเอียดหลังจากนั้นจะเข้าสู่เครื่องแยกหยาบ (Coarse extractor) แยกเอากากมันสำปะหลังออกจากน้ำแป้ง กากที่ได้จะถูกนำไปเข้าเครื่องอัดกากและนำไปตากแดดได้เป็นกากมันสำปะหลังชนิด แห้ง และขายเพื่อเป็นอาหารสัตว์ต่อไป

1.2) กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตแป้งมันสำปะหลังแบบอังไฟ กรรมวิธีเริ่มต้นของการผลิตแป้งมันคล้ายคลึงการวิธีแบบสลัดแห้ง กล่าวคือ หลังจากได้แป้งมันสำปะหลังที่ขูดเป็นชิ้นละเอียดแล้วมันสำปะหลังจะถูกส่งไปยังตะแกร่งร่อนรูปทรงกระบอก มีการหมุนและฉีดพ่นน้ำตลอดเวลา เพื่อชะแป้งให้ออกจากชิ้นมันละเอียด แป้งมันจะแยกออกจากกากมันโดยน้ำแป้งจะไหลลงสู่ถังด้านล่าง ส่วนกากมันถูกนำไปเข้าเครื่องอัดและทำให้แห้งเป็นกากมันสำปะหลัง

2) ข้อดีของกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจในการนำผลิตเอนไซม์ เนื่องจากมีข้อได้เปรียบกว่าวัตถุดิบอื่น ดังนี้

2.1) การปลูกมันสำปะหลังไม่จำเป็นต้องใช้ดินที่มีคุณภาพดี มีความต้านทานโรคสูง และมีการปลูกทุกภาคของประเทศไทย

2.2) ประเทศไทยมีการผลิตแป้งมันสำปะหลังปริมาณมาก จึงทำให้มีกากมันสำปะหลังมากด้วย

2.3) กากมันเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมที่มีมูลต่ำ

2.4) สามารถย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์เช่นเดียวกับแป้ง

3) องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต 61.84-69.90 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 1.82-2.03 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.09-0.20 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 10.61-14.32 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 1.61-2.38 เปอร์เซ็นต์ และประกอบด้วยแร่ธาตุ (กิตฑามาศ, 2555) โดยมี เหล็ก แมงกานีส แมกนีเซียม คอปเปอร์ และสังกะสีอยู่ประมาณ 155, 40, 100, 4 และ 21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ กากมันสำปะหลังที่มีอยู่ในประเทศไทย มีหลายลักษณะโดยมีองค์ประกอบแตกต่างกันออกไป องค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลังเป็นพวกคาร์โบไฮเดรต มีโปรตีนปริมาณต่ำมากจึงมักขายในราคาถูกเพื่อนำไปผสมกับอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ โดยใช้เป็นแหล่งของพลังงาน แต่เนื่องจากกากมันสำปะหลังยังมีแป้งหลงเหลืออยู่ในปริมาณสูง จึงน่าที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักได้ โดยจุลินทรีย์สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ดี

2.2.3 กากถั่วเหลือง (Soybean meal)

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากการนำเมล็ดถั่วเหลืองมาสกัดไขมันออกโดยกรรมวิธีที่สำคัญเช่น วิธีกล ด้วยการใช้แรงดันจากการอัดเกลียว (Screw pressure) หรือโดยใช้สารเคมี (Solvent extraction) ทั้งนี้ กากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ ส่วนใหญ่ได้มาจากขบวนการสกัดไขมันออกด้วยสารเคมี (Churh, 1991) วิธีการสกัดน้ำมันโดยใช้สารเคมีได้แสดงโดย Mounts *et al.*

Mahasarakham University

(1987) สรุปย่อได้ดังนี้ คือ (1) ทำความสะอาดเมล็ด กะเทาะเมล็ด และนำเปลือกออก (2) อบเมล็ดให้มีความร้อนระหว่าง 74-79 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และควบคุมให้มีความชื้นอยู่ระหว่าง 9.5-10.5 เปอร์เซ็นต์ (3) รีดเมล็ดให้เป็นแผ่นบาง 0.25 มิลลิเมตร (4) สกัดน้ำมันออกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น Trichloroethylene (5) ระเหยตัวทำละลายออก (6) ทำให้แห้งด้วยความร้อน 115 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 197-204 กิโลปาสคาล เป็นเวลา 15 นาที

กากถั่วเหลืองที่มีคุณภาพที่ดีนั้นในระหว่างขบวนการผลิตจะต้องได้จากการใช้ความร้อน ความชื้น และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้เมล็ดถั่วเหลืองสุกพอดี สามารถทำลายสารขัดขวางการใช้ประโยชน์อาหารหรือสารยับยั้งโภชนะชนิดต่างๆ มีปริมาณเหลือต่ำสุด หรือถูกทำลายจนหมดสิ้นและที่สำคัญโปรตีนจากกากถั่วเหลือง จะต้องมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้สูงสุดจึงเป็นกากถั่วเหลืองที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด (Chang *et al*., 1987)

แต่อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีในการสกัดน้ำมันจากเมล็ดถั่วเหลืองที่เหมาะสม ในแต่ละโรงงานยังแตกต่างกัน ทั้งนี้เพื่อวัตถุประสงให้ได้น้ำมันออกมามากที่สุด กากถั่วเหลืองที่เป็นผลพลอยได้จึงมีคุณภาพแตกต่างกันไป

กากถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ประมาณ 43-51 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.5-8 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 3-6 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 5-6 เปอร์เซ็นต์ และมีแป้งรวม 29-31 เปอร์เซ็นต์ พลังงานที่ใช้ได้ (Metabolizable energy) 3300-3500 กิโลแคลโลรี่ต่อกิโลกรัม แคลเซียม 0.25-0.30 เปอร์เซ็นต์ และฟอสฟอรัส 0.5-0.63 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีในการสกัดน้ำมัน อีกทั้งกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งเสริมโปรตีนที่ดีอย่างหนึ่งเพราะมีโปรตีนสูงและยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็น (Essential amino acids) เป็นอยู่ในปริมาณสูงหลายชนิด ได้แก่ ไลซีน 2.77-3.19 เปอร์เซ็นต์ ทรีโอนีน 1.66-1.91 เปอร์เซ็นต์ และ ทริปโตเฟน 0.54-0.64 เปอร์เซ็นต์ (Krochta and De Mulder-Johnston, 1997)

2.2.4 กากยีสต์ (Spent yeast)

กากยีสต์จากอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ ซึ่งเบียร์เป็นเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (รพีพร, 2542) และมีสารอาหารอยู่หลายชนิด เช่น โปรตีน วิตามินบี และวิตามินซี เป็นเครื่องดื่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซค์ จึงทำให้เบียร์มีรสซ่า และมีรสขมจากสารที่ได้จากฮอฟ (Hop) ในการผลิตเบียร์ จะมีใช้มอลท์ แป้ง ฮอพ น้ำ และยีสต์เป็นวัตถุดิบ โดยมีขั้นตอนในการผลิต คือ การคลุกเคล้า การหมักเบียร์ การบ่ม การกรอง และการบรรจุ ในการผลิตเบียร์กระบวนการที่สำคัญ คือ กระบวนการหมักเบียร์ โดยมียีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* เป็นตัวการที่สำคัญในกระบวนการหมักเบียร์นั่นเอง ดังนั้นในการผลิตเบียร์จึงจำเป็นต้องเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่บริสุทธิ์ คุณภาพ แข็งแรง มี Activity ดี สายพันธุ์ของยีสต์ที่นิยมใช้ทั่วโลก คือ *S. carlsbergensis* และ *S. cerevisiae* โดยบริษัทบุญรอดบริเวอรี่ จำกัด ใช้สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักนี้จะถูกนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 6-7 รอบของการหมัก ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของยีสต์ จำนวนยีสต์ที่ตาย และอ่อนแอด้วย ยีสต์ที่ผ่านกระบวนการหมักเบียร์จะถูกกรองแยกออกจากน้ำเบียร์กลายเป็นกากยีสต์ (Spent yeast) ซึ่งเป็นส่วนที่ต้องกำจัดต่อไป

Mahasarakham University

เนื่องจากกากยีสต์อุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อมนุษย์ ดังตาราง 2.3 จึงได้มีการนำไปใช้ในโรงงานขนมปังกรอบ (Pretzels) และอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ บางแห่งอาจนำกากยีสต์มาผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ เช่น การใช้ความร้อน, Propionic หรือ Formic acids เพื่อทำเป็นอาหารสัตว์

ตาราง 2.3 แสดงองค์ประกอบของยีสต์

Major componant	Concentration (g/100g)	Vitamin	Concentration (mg/100g)
Protein	50	Niacin	50
Carbohydrate	42	Thiamine	15
Ash	7	Pantothenthenate	10
Fat	6	Riboflavin	7
Moisture	5	Folic acid	4
		Pyridoxine	3
		Biotin	0.2

ที่มา : Michael and Pelezar (1995)

สำหรับประเทศไทย กากยีสต์ที่ได้จากโรงงานเบียร์ บางส่วนจะถูกนำไปอบแห้ง แล้วใช้เป็นอาหารสัตว์ และเป็นปุ๋ยในการปลูกข้าวบาร์เลย์ของโรงงาน (รังสรรค์ ปิ่นทอง, 2536) และบางส่วนจะให้ฟรีแก่ผู้มาขอ หรือนำไปถมที่ อย่างไรก็ตามกากยีสต์ก็ยังคงเป็นภาระที่ทางโรงงานต้องกำจัดต่อไป

2.3 เชื้อราก่อโรคพืชใช้ทดสอบในงานวิจัย

2.3.1 *Fusarium oxysporum* (นิพนธ์ วิสารทานนท์, 2552)

Phylum : Ascomycota

Class : Sordariomycetes

Order : Hypocreales

Family : Nectriaceae

ลักษณะทั่วไป

Fusarium oxysporum เส้นใยในตอนแรกมีสีขาว เส้นใยจะเจริญแบบบางๆ ก่อนหลังจากนั้นจะหนาเป็นกระจุกแน่นตรงกลาง การเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. oxysporum* เซลล์เริ่มแรกมีขนาด 23-54 × 3-4.5 ไมครอน ลักษณะเป็นวงรี หรือรูปทรงกระบอกหรือโค้ง มีขนาด 5-12 × 2.3-

Mahasarakham University

3.5 ไมครอน ผิวเรียบหรือขรุขระมีขนาด 5-13 ไมครอน *F. oxysporum* สามารถผลิต Mycotoxins ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สามารถทำให้เกิดโรคในคนได้ *F. oxysporum* สามารถอยู่รอดได้ในดินที่มีอินทรีย์วัตถุ รับอาหารโดยการย่อยสลายสารอินทรีย์ สปอร์สามารถแพร่กระจายโดยน้ำและลม และอยู่ในอากาศได้เป็นเวลานาน *F. oxysporum* มีการผลิตสปอร์ 3 ประเภท คือ Microconidia เป็นสปอร์ที่พบมากที่สุดในเชื้อรา *F. oxysporum,* Macroconidia พบได้ทั่วไปบนผิวของพืช และ Chlamydospore จะผลิตบนเส้นใยอายุมากใกล้ตาย หรือใน Macroconidia

ลักษณะการก่อโรค

เชื้อรา *F. oxysporum* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ของมะเขือเทศ (ชลดา ทองเจริญ, 2553) มีชื่อเรียกทั่วไปว่า โรคเหี่ยวเหลือง เป็นโรคที่ระบาดและสร้างความเสียหายในแหล่งปลูกมะเขือเทศทั่วโลก โดยมะเขือเทศมีพื้นที่ปลูกมากกว่า 16 ล้านไร่ สามารถผลิตมะเขือเทศมากกว่า 50 ล้านเมตริกตัน เชื้อชนิดนี้มีแหล่งอาศัยโดยทั่วไปในดิน สามารถอยู่ข้ามฤดูหนาวได้ในรูปของสปอร์ พบการทำลายในมะเขือเทศได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะที่มะเขือเทศให้ผลผลิต โดยที่สปอร์ของเชื้อในดินจะงอกเป็นเส้นใยเล็กๆ แทงทะลุเข้าไปโดยตรงหรือผ่านทางบาดแผลที่ราก หรือจุดที่มีการสร้างรากแขนง จากนั้นเส้นใยจะมีการพัฒนา และแทงทะลุผ่านส่วนของ Cortex จนถึงท่อน้ำ เจริญแตกกิ่งก้าน และสร้างไมโครโคนิเดียจำนวนมาก ทำให้ท่อน้ำเกิดการอุดตัน การลำเลียงผ่านท่อน้ำน้อยลงหรือไหลผ่านไม่ได้ และท่อน้ำเลี้ยงยังเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ต้นมะเขือเทศแคระแกรน ต่อมาจะเกิดการเหี่ยวขึ้น มะเขือที่เป็นโรคจะไม่ได้ผลผลิต เนื่องจากมะเขือเทศจะตายในที่สุด ดังภาพประกอบ 2.7

ภาพประกอบ 2.7 ลักษณะของเส้นใย และการก่อโรคของเชื้อรา *F. oxysporum*
ที่มา : ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล (2552)

Mahasarakham University

2.3.2 *Phytophthora* sp. (นิพนธ์ วิสารทานนท์, 2552)

Phylum : Oomycota

Class : Peronosporomycetes

Order : Peronospororales

Family : Pythiaceae

ลักษณะทั่วไป

เชื้อรา *Phytophtora* sp. เป็นเชื้อก่อโรคพืช ทำลายพืช ทำให้เกิดอาการเน่าที่ร้ายแรงมากในปี 2419 Anton de Bary เป็นผู้ตั้งชื่อเชื้อราชนิดนี้ว่า *Phytophthora* (Greek : Phyton and Phtherio = Plant destroyer) มีความหมายว่า “ผู้ทำลาย” เนื่องจากในครั้งนั้นเกิดโรคใบไหม้ของมันฝรั่งระบาดรุนแรง ทำให้การปลูกมันฝรั่งต้องล้มเหลวครั้งแล้วครั้งเล่า จนไม่สามารถผลิตหัวมันฝรั่ง ได้เพียงพอกับชาวไอริช ซึ่งบริโภคมันฝรั่งเป็นอาหารหลัก เป็นเหตุให้ชาวไอริชต้องอดอยากล้มตายเป็นจำนวนมาก ที่มีชีวิตอยู่รอดก็พยายามดิ้นรนอพยพหาแหล่งที่ทำกิน และที่อยู่อาศัยใหม่ เพื่อให้รอดพ้นจากโรคร้ายนี้ ที่หมายหนึ่ง คือ ประเทศสหรัฐอเมริกา ลักษณะรูปร่างสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Phytophthora* เส้นใยของ *Phytophthora* ค่อนข้างกว้าง เฉลี่ยอยู่ที่ 6 ถึง 14 มิลลิเมตร Sporangium รูปมะนาวฝรั่ง (Lemoniform) รูปไข่ปลายตัด (Obpyriform) หรือรูปไข่ Zoospore เกิดใน Sporangium เมื่อแก่เต็มที่จะแตกออกมาทาง Papillate zoosporeมีหาง (Flagella) 2 หาง ผนังของ Oogonium มีทั้งแบบเรียบ ขรุขระ หรือเป็นตะปุ่มตะป่ำ (แต่ไม่มีหนาม) ผนัง Oogonium อาจจะหนาขึ้น และมีสีน้ำตาล ส่วน Antheridium เป็นแบบ Amphigynous (มีน้อย Species ที่เป็นแบบ Paragynous)

ลักษณะการก่อโรค

เชื้อรา *Phytophtora* sp. ทำลายส่วนราก ทำให้เกิดโรครากเน่า หรือทำให้เกิดส่วนโคนเน่ากับไม้ยืนต้น (ประพันธ์ โอสถาพันธ์, 2553) *P. palmivora* สาเหตุของโรครากเน่าในลำใย โรครากเน่าโคนเน่าในทุเรียน และโรครากเน่าโคนเน่าในมะละกอ *P. parasitica* สาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าในส้มเขียวหวาน โรครากเน่าของพริก และโรคโคนเน่าในของกระท้อน การแพร่ระบาดของเชื้อรา *P. palmivora* และ *P. parasitica* เชื้อจะแพร่ระบาดไปกับดินและน้ำ โดยมี Zoospore ซึ่งสามารถแพร่ระบาดไปกับลมพายุฝน เข้าทำลายรากและส่วนอื่นของพืชที่อยู่สูงๆ อยู่เหนือระดับดินได้ วงจรของโรคเชื้อราพักตัวหรืออยู่ข้ามฤดูในรูปของ Chlamydospore ในดินเมื่อมีความชื้นจะงอกเป็นเส้นใย หรือ Sporangium ซึ่งจะสร้าง Zoospore ว่ายน้ำเข้าไปหารากพืช แล้วงอกเส้นใยเข้าทำลายรากหรือโคนต้นพืช นอกจากนี้เชื้อยังสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ส่วนต่างๆ ของพืช เช่น กิ่งก้าน ใบ และผลได้ เมื่อมีลมพายุฝนเกิดขึ้นอย่างรุนแรง เชื้อจะเจริญในดินหรือบนส่วนของพืชที่เป็นโรคเพิ่มปริมาณให้มากยิ่งขึ้น แล้วสร้าง Chlamydospore เพื่อการพักตัวในที่สุด ดังภาพประกอบ 2.8

Mahasarakham University

ภาพประกอบ 2.8 ลักษณะของเส้นใย และการก่อโรคของเชื้อรา *Phytophtora* sp.
ที่มา: ประพันธ์ โอสถาพันธ์ (2553)

2.3.3 *Colletotrichum gloeosporiodes* (นิพนธ์ วิสารทานนท์, 2552)

Phylum : Ascomycota

Class : Sordariomycetes

Order : Glomerellales

Family : Glomerellaceae

ลักษณะทั่วไป

เชื้อราชนิดนี้ สามารถสร้างเส้นใยฝังอยู่ในตัวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อน จนถึงน้ำตาลแก่ เส้นใยแตกกิ่งก้าน มีผนังกั้น (Septate) ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา เรียกว่า โคนิเดีย (Conidia) มีลักษณะเซลล์เดียว ไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น (ยกเว้นขณะงอก) มีลักษณะตรง หรือโค้งงอ มีรูปร่างหลายแบบ เกิดบนก้านชูโคนิเดีย (Conidiophore) ซึ่งมีกำเนิดจาก Stromatic cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า Acervulus ใต้ชั้น Epidermis ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออก โคนิเดียจะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้งหรือของเหลวข้น สีเหลืองอ่อนหรือสีส้มอมชมพู เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อราจะสร้างโคนิเดียเป็นกลุ่มบน Stromatic cell คล้ายกับSporodochium การสังเกตุลักษณะของ Acervulus จึงต้องดูจากสภาพธรรมชาติ หรือบนพืชอาศัย บางครั้งพบการสร้าง Sclerotia บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โคนิเดียเดี่ยวๆ ไม่มีสี เซลล์เดียว ผนังบางเรียบ ลักษณะรูปร่างไข่ หรือยาวรี ตรง หรือโค้ง อาจมี Guttile อยู่ภายใน เชื้อรา *Collectotrichum* sp. บางชนิดมีการสร้าง Sterile hypha สีน้ำตาลผนังหนาเรียบ ปลายแหลมคล้ายหนามที่เรียกว่า Setae เกิดบริเวณขอบของ Acervulus หรือปะปนอยู่กับก้านชูโคนิเดีย ลักษณะการสร้าง Setae ของรานี้เป็นลักษณะที่ไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ แอพเพรสซอเรีย (Appressoria) สีน้ำตาล ผนังสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม กลมรีคล้ายกระบอง หรือรูปร่าง

Mahasarakham University

ไม่แน่นอน บางครั้งผนังมีรอยหยัก (Lobe) สร้างเดี่ยวๆ หรือเกิดติดกันเป็นกลุ่ม ระยะ Telemorph ของเชื้อรา *Collectotrichum* จัดอยู่ในสกุล Glomerella

ลักษณะการก่อโรค

ระยะแรกจะพบแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำบริเวณของใบ หรือกลางใบมีขอบเขตไม่แน่นอน (รุ่งทิพย์ สังข์เผือก, 2554) แผลจะขยายออกสู่เส้นกลางใบ ทำให้เนื้อใบมีสีเหลือง เนื้อใบบริเวณแผลจะแห้งเป็นสีน้ำตาล พบชั้นของเชื้อราเรียงเป็นชั้นๆ สีเทา หรือเทาปนขาว คล้ายวงแหวน ดังภาพประกอบ 2.9

ภาพประกอบ 2.9 ลักษณะของเส้นใย และการก่อโรคของเชื้อรา *C. gloeosporioides*
ที่มา : รุ่งทิพย์ สังข์เผือก (2554)

2.3.4 *Rhizoctonia solani* (นิพนธ์ วิสารทานนท์, 2552)

Phylum : Basidiomycota

Class : Agaricomycetes

Order : Ceratobasidiales

Family : Ceratobasidiaceae

ลักษณะทั่วไป

เชื้อราชนิดนี้ไม่สร้างสปอร์ แต่สร้างเส้นใย และมีโครงสร้างที่แข็งแรง ที่เรียกว่า Microsclerium หรือ Sclerotium ซึ่งเกิดจากการพันตัวของเส้นใย หรือเส้นใยประสานกันอย่างหลวมๆ หรือ Monilioid อย่างหลวมๆ มีรายงานว่าเชื้อรา *Rhizoctonia solani* มี Telemorphic state คือ *Thanatephous cucumeris* (Frank) Donks ซึ่งจัดอยู่ใน Sub-divition Basidiomytonia จากการรวบรวมข้อมูลเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา *R. solani* และ *Rhizoctonia*-like fungi โดยใช้ลักษณะของ Septal pore และ ระยะ Telemorphic stage

Mahasarakham University

เป็นเกณฑ์ ทั้งนี้ได้จัดจำแนกเชื้อรากลุ่ม *Rhizoctonia* อยู่ใน Class ต่างๆ คือ Ascomycetes, Ustomycetes, Holobasidiomycetes และ Heterobasidiomycetes โดยใช้ลักษณะของผนังกั้นของเชื้อราแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ในการจัดจำแนกเชื้อรา Class Basidiomycetes มีลักษณะที่เรียกว่า Dolipore septum โดยมีรูอยู่ที่ตรงกลางแผ่น Endoplasmic reticulum เป็นวงกลม และมีช่องเปิดเป็นรูเล็กๆ ที่เรียกว่า Parenthesome ราในกลุ่ม Ustomycetes มีผนังกันแซลล์แบบง่ายๆ และมีช่องเปิดเป็นรูเล็กๆ มีลักษณะเป็นแบบ Perforate parenthesome ส่วนเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่ม Heterobasidiomycetes มี Septal pore อยู่ที่ตรงกลางมีลักษณะค่อนข้างจะซับซ้อน เป็นแบบ Imperforate parenthesome ไม่มีรูเปิด

ลักษณะการก่อโรค

โรคกาบใบแห้ง (Sheath bligh disease) ในข้าว สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia* (จินันทนา จอมดวง และคณะ, 2558) โดยมีอาการที่พบได้ตั้งแต่ระยะแตกกอ ถึงระยะก่อนเก็บเกี่ยว พบแผลสีเขียวปนเทาที่กาบใบบริเวณใกล้ระดับน้ำ ขนาด 1-4 × 2-10 มิลลิลิตร แผลสามารถขยายใหญ่ขึ้นโดยไม่จำกัด และลุกลามไปถึงใบข้าว ถ้าเป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ทนต่อโรคแผลสามารถลุกลามไปจนถึงใบและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบ และกาบหุ้มรวงข้าวเหี่ยว แสดงดังภาพประกอบ 2.10 ทำให้ผลผลิตลดลงเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังพบว่า หากต้นข้าวมีการแตกกอมากขึ้น จะเบียดเสียดกันแน่นยิ่งขึ้น จึงทำให้โรคมีการระบาดอย่างรุนแรง การแพร่ระบาดของเชื้อราสามารถขยายพันธุ์โดยอาศัยอยู่ในตอซังข้าว วัชพืชในนา ตามดินในนา และมีชีวิตอยู่ข้ามฤดู หมุนเวียนเข้าทำลายข้าวได้ตลอดฤดูการทำนา

ภาพประกอบ 2.10 ลักษณะของเส้นใย และการก่อโรคของเชื้อรา *R. solani*
ที่มา : จินันทนา จอมดวง และคณะ (2558)

Mahasarakham University

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wang *et al*. (2008) ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอิทธิพลต่อการเจริญ และการผลิตสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophila* YL001 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Modified yeast extract broth (YSG) แบคทีเรียจะมีการเจริญสูงสุดอยู่ที่ 15.2 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงถึง 243.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะ พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เป็นกลูโคส และเปปโตนจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงถึง 253.3 และ 253.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Wang *et al*. (2010) ศึกษาความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักต่อการเจริญ และการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophila* YL001 พบว่า ที่ความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที ในช่วง 18 ชั่วโมงแรก ค่า DO ที่ 70 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลให้มีการเจริญ และการผลิตสารปฏิชีวนะสูงสุด แต่หลังจากชั่วโมงที่ 18 ของการหมัก พบว่า ที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะมีการเจริญ และการผลิตสารปฏิชีวนะสูงสุด ดังนั้นจึงทดลองโดยควบคุมค่า DO เป็นสองช่วงคือ ที่ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 18 ชั่วโมงแรก และหลัง ตามลำดับ พบว่าชีวมวล และกิจกรรมการผลิตสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 30.04 กรัมต่อลิตร และ 252 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 15.36 เปอร์เซ็นต์ และ 18.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Fang *et al*. (2010) ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *X. nematophila* TB พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Tryptone soyptone broth (TSB) แบคทีเรียมีการเจริญสูงสุดอยู่ที่ 27 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงถึง 246.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนอื่นเพื่อเพิ่มการผลิตสารปฏิชีวนะ พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากกลูโคส และเปปโตนจะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้นเป็น 256.7 และ 263.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Fang *et al*. (2011) ศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรีย *X. bovienii* YL002 ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช พบว่า ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชได้ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora capsici* ได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา *F. oxysporum* และ *R. solani* สามารถยังยั้งได้ 50.50 และ 40.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนาส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์มาสกัดด้วยเมทานอลจะได้ส่วนประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. capsici* โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 70.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบกับเชื้อรา *P. capsici* บนต้นพริก พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 68.14 เปอร์เซ็นต์ และสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ 65.46 เปอร์เซ็นต์

Mahasarakham University

Xiufen *et al*. (2011) ศึกษาถึงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของสาร Xenocoumacin 1 (Xcin1) ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* var. *Pekingensis* พบว่า สาร Xcin1 ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.25–4.17 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่งผลยับยังเชื้อรากลุ่ม *Phytophthora* spp. ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่า สาร Xcin1 สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยได้สูงถึง 100เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบและยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 92.63 เปอร์เซ็นต์ ภายไต้ห้องปฏิบัติการ และในแปลงทดสอบยับยั้งได้ 80.27 เปอร์เซ็นต์

Mahasarakham University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

3.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

3.4 แผนการวิจัย

3.5 ขั้นตอนการวิจัย

3.6 การวิเคราะห์และการทดสอบทางชีววิทยา

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.8 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1) ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) ของบริษัท Uniflow Biohazar, Italy

2) ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ของบริษัท Memmert GmbH Co, Germany

3) ไมโครปิเปต (Micropipette) ของบริษัท Biohit, France

4) ไมโครเวฟ (Microwave) ของ Turbora, Thailand

5) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance) ของบริษัท Mettler-Toledo, USA

6) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance) ของบริษัท Mettler-Toledo, USA

7) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) ของบริษัท New Brunswick scientific Co, USA

8) เครื่องปั่นแยกตกตะกอน (Centrifuge) ของบริษัท Beckman Coulter, USA

9) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท Shimadzu, Japan

10) เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Memmert GmbH Co, Germany

11) กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ของบริษัท Olympus, Japan

12) เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ของบริษัท Hirayama manufacturing corporation, Japan

13) ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 L. ของบริษัท B. Braun Biotech, Germany

Mahasarakham University

14) เครื่องอัลตราโซนิก (High Intensity Untrasonic Processor) ของบริษัท Sonic & Materials, USA

3.1.2 สารเคมี

1) Tryptone ของบริษัท Criterion, USA

2) Yeast extract ของบริษัท Criterion, USA

3) NaCl ของบริษัท Criterion, USA

4) Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท Ajax Finechem, Germany

5) Sodium hydroxide (NaOH) ของบริษัท Ajax Finechem, Germany

6) Potato dextrose broth ของบริษัท Himedia, India

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Xenorhabdus stockiae* PB09

แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ได้รับจากหน่วยวิจัยการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1) การเก็บรักษาแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่ใช้ในการทดลอง จะถูกจัดเก็บอยู่ในอาหารแข็งพื้นฐาน Luria Bertani (LB) slant โดยจะมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ เดือนและจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

เริ่มต้นโดยการเตรียมอาหารเหลวพื้นฐาน Lauria Bertani (LB) (จิรายุ สาอุตม์, 2557) ซึ่งประกอบไปด้วย ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร โดยทำการเตรียมปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำฟลาสก์อาหารเหลวที่เตรียมแล้วนั้นไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เสร็จแล้วพักไว้ให้อาหารเย็น จึงทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 จากอาหาร LB slant ลงไปใน ฟลาสก์อาหารที่เตรียมไว้เต็ม 1 ลูป จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง และทำให้เซลล์มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 เชื้อราก่อโรคพืชที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อราก่อโรคพืชที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ ได้แก่ เชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Phytopthora* sp. (จิรายุ สาอุตม์, 2557) ซึ่งได้รับจากหน่วยวิจัยการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

Mahasarakham University

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และนำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ เดือน และจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

3.3.1 วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่ใช้ในการทดลอง

1) กากถั่วเหลือง ได้จากร้านขายน้ำเต้าหู้ ตลาดคลองถม ตำบลท่าขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

2) กากยีสต์ ได้จากบริษัท ขอนแก่นบริวเวอรี่ จำกัด 333 หมู่ 19 ถนนขอนแก่น-มหาสารคาม ตำบลท่าพระ อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

3) กากน้ำตาล ได้จากบริษัท น้ำตาลวังขนาย จำกัด 222 หมู่ 9 ถนนโกสุมพิสัย-มหาสารคาม ตำบลแก้งแก อำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคาม

4) กากมันสำปะหลัง ได้จากบริษัท แป้งมันกาฬสินธุ์ จำกัด 188 หมู่ 1 ถนนสมเด็จ-กุฉินารายณ์ ตำบลคำบง อำเภอห้วยผึ้ง จังหวัดกาฬสินธุ์

3.3.2 การปรับสภาพกากมันสำปะหลัง

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์มาย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อนำไปใช้ในการเจริญได้ ดังนั้นจะต้องทำการย่อยและปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อน (พุทธพร แสงเทียน, 2559) ซึ่งเริ่มต้นด้วยการอบกากมันสำปะหลังให้แห้งในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำกากมันสำปะหลังไปบดในเครื่องบดละเอียด แล้วกรองผ่านตะแกรงร่อนขนาด 100 เมช แล้วจึงนำกากมันสำปะหลังไปย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.4 โมลลาร์ ในอัตราส่วนของกากมันสำปะหลังต่อปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้คือ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปปรับสภาพด้วยความร้อน โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที พักไว้ให้เย็นแล้วจึงทำให้เป็นด่างแก่ (Overliming) ด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 25 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปรับให้ค่าพีเอชเป็นกลาง (pH 7) จึงนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 แผนการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคพืช โดยศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร มาใช้ทดแทนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน เริ่มต้นจากคัดเลือกอาหารแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยการศึกษาทีละปัจจัย ด้วยแผนการ

Mahasarakham University

ทดสอบแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely random design; CRD) จากนั้นจึงทำการขยายการเพาะเลี้ยงเป็นการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง มีแผนการทดลอง ดังนี้

1) การคัดเลือกวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน LB สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ผลด้วยการวัดการเจริญของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคพืช โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และทำการทดลองทีละปัจจัย จำนวน 3 ซ้ำ

2) การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะ ขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ผลด้วยการวัดการเจริญของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคพืช จากแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5 ขั้นตอนการวิจัย

3.5.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม

เตรียมอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน Lauria bertani (LB) broth (จิรายุ สาอุตม์, 2557) ซึ่งประกอบด้วย ทริปโตน 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตรที่มีการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ อาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลัง ซึ่งประกอบด้วยกากมันสำปะหลังปรับสภาพ 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ต่อการเตรียมอาหารปริมาตร 1 ลิตร หรืออาหารปรับสูตรกากน้ำตาล ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ต่อการเตรียมอาหารปริมาตร 1 ลิตร นอกจากนี้ยังมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตรที่มีการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ อาหารปรับสูตรกากถั่วแหลือง ซึ่งประกอบด้วยทริปโตน 10 กรัม กากถั่วเหลือง 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ต่อการเตรียมอาหารปริมาตร 1 ลิตร หรือ อาหารปรับสูตรกากยีสต์ ประกอบไปด้วยทริปโตน 10 กรัม กากยีสต์ 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร

การศึกษาจะเริ่มจากการทำการศึกษาทีละปัจจัย โดยนำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน LB อาหารปรับสูตรที่มีการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน และอาหารปรับสูตรที่มีการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่

Mahasarakham University

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยในทุกการทดลอง ทุก 24 ชั่วโมงจะทำการตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และทดสอบประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคพืช

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์ของเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคพืช จะทำการทดสอบโดยใช้ทั้งส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย และสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย

การเตรียมส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียทำได้โดยนำตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนาน 24, 47, 72 และ 96 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จะได้ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย

การเตรียมสารสกัดเซลล์แบคทีเรีย ทำได้โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เป็นเวลานาน 24, 47, 72 และ 96 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) เพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์ แล้วทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 รอบ จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonicator แล้วทำการกรองเซลล์แบคทีเรียโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จะได้สารสกัดเซลล์แบคทีเรีย

3.5.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในถังหมักหมักแบบกะ

จากการการทดลองในข้อ 3.5.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสมจะถูกคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในถังหมักแบบกะ (จิรายุ สาอุตม์, 2557) โดยบรรจุนำอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลง LB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนดังกล่าว ปริมาตร 2 ลิตร มาบรรจุในถังหมักขนาดความจุ 5 ลิตร ทำการควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้อยู่ในช่วง pH 7-8 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซค์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นจึงเติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เพื่อทำการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อนาที และทำการกวน 200 รอบต่อนาที

จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเตรียมส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย และสารสกัดเซลล์แบคทีเรียตามวิธีการข้างต้น จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคพืชต่อไป

Mahasarakham University

3.6 การวิเคราะห์และการทดสอบทางชีววิทยา

3.6.1 การวัดการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย

1) นำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (จิรายุ สาอุตม์, 2557) เพื่อวัดการเจริญของเซลล์แบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง

2) นำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน eppendorf tube ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว (จิรายุ สาอุตม์, 2557) นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนอีก 2 รอบ จึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พักให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นใช้การประมาณค่าจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและน้ำหนักแห้งของเซลล์แบคทีเรียในหน่วยกรัมต่อลิตร

3) การหาอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อแบคทีเรีย

กราฟการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย โดยให้แกนนอนเป็นช่วงเวลา (จิรายุ สาอุตม์, 2557) และแกนตั้งเป็นค่า Natural logarithm ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งค่าความชันของกราฟในช่วงการเจริญระยะ exponential phase จะเท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อแบคทีเรียในสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังสมการ

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$

4) การหาผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร

การคำนวณผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yield) จากสมการ

$$Yx/s = \Delta X/\Delta S = - (CX-CX_0)/CS-CS_0$$

เมื่อ CX_0, CX = ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและปริมาณเซลล์ในช่วงระหว่างการเจริญเติบโต

CS_0, CS = ความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นและความเข้มข้นของสารอาหารในช่วงระหว่างการเจริญเติบโต (จิรายุ สาอุตม์, 2557)

Mahasarakham University

3.6.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในการทดลองนี้ใช้วิธี Poisoned food technique (จิรายุ สาอุตม์, 2557) โดยใช้เชื้อราทดสอบทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum*, *R. solani, Phytopthora* sp. และ *C. gloeosporioides* เริ่มจากการนำอาหาร PDA ที่ยังเหลวอยู่ (อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส) ผสมกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ *X. stockiae* PB09 ให้ได้ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยนำส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เทผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วปล่อยให้ผิวหน้าอาหารแห้ง เมื่ออาหารแข็งตัวแล้ว ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA วางคว่ำบริเวณจุดกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อราแต่ละชนิด นำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค (ดังแสดงในภาคผนวก ค) โดยมีชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และสารเคมีฆ่าเชื้อรา (Carbendazim) ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of varience, One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้ LSD-test ของโปรแกรม SAS (1990)

3.8 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. สถิติเชิงพรรณนา

สรุปข้อมูลจากการศึกษาเพื่อแสดงลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่

X	หมายถึง	ค่าเฉลี่ย
%	หมายถึง	ร้อยละ
SD	หมายถึง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. สถิติเชิงวิเคราะห์

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแตกต่างเป็นคู่ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA), LSD-test และ DMRT ทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05

Mahasarakham University

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปราย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร เพื่อทำการทดแทนแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน Luria Bertani (LB) broth ที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 โดยเริ่มต้นจากการคัดเลือกแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อผลิตสารเมทาโบไลท์ แล้วจึงนำสารเมทาโบไลท์ที่แบคทีเรียผลิตได้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช โดยการศึกษาทีละปัจจัยด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely random design; CRD) จากนั้นจึงทำการขยายการเพาะเลี้ยงเป็นการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะ โดยผู้วิจัยได้นำเสนอข้อมูลตามลำดับ ดังต่อไปนี้

4.1 ผลของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรต่อการเจริญและการผลิตสารเมทาโบไลท์ของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะนำเอาวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้ทดแทนแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) broth ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 โดยกำหนดการทดลองทีละปัจจัย ซึ่งสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน LB จะประกอบด้วยทริปโตน 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตร LB ที่มีการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร คือ มีการเติมกากมันสำปะหลังปรับสภาพ หรือกากน้ำตาลในปริมาณ 10 กรัม เพื่อลงไปทดแทนแหล่งคาร์บอนเดิม คือ ทริปโตน แล้วทำการเติมกากถั่วเหลือง หรือกากยีสต์ปริมาณ 5 กรัม เพื่อลงไปทดแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม คือ สารสกัดยีสต์ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ทำการศึกษาทีละปัจจัย โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในระดับฟลาสก์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างระหว่างการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72 และชั่วโมงที่ 96 จากนั้นตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช

4.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์

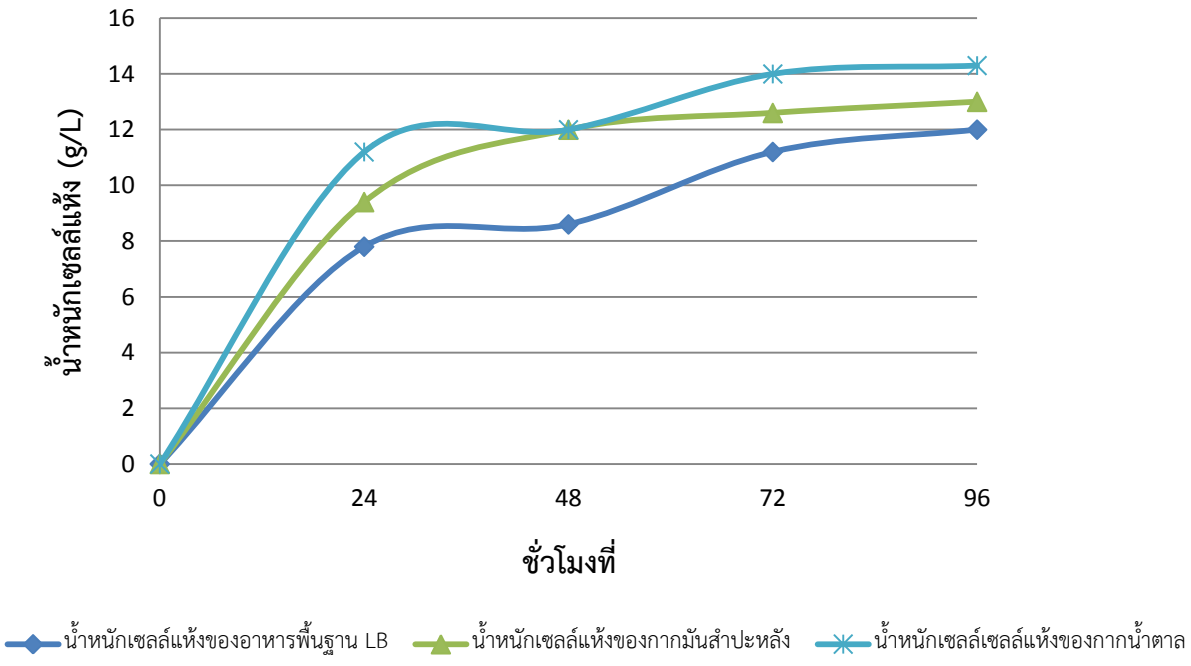
งานวิจัยนี้ได้เลือกวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลอง 2 แหล่ง ได้แก่ กากมันสำปะหลังปรับสภาพ และกากน้ำตาล โดยการเตรียมอาหารปรับสูตร LB ที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร ให้มีอัตราส่วนเท่ากับแหล่งคาร์บอน

Mahasarakham University

เดิม แต่องค์ประกอบอื่นๆ ในอาหารยังคงเดิม เปรียบเทียบกับอาหารพื้นฐาน LB และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาทั้ง 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ในชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 จากนั้นตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ได้ผลการทดลองดังนี้

1) ผลของแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรในอาหารปรับสูตร LB ต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์ของเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

การศึกษาเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการเติมกากมันสำปะหลังปรับสภาพ 10 กรัม หรือกากน้ำตาล 10 กรัม ลงไปทดแทนแหล่งคาร์บอนเดิมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารพื้นฐาน LB (ภาพประกอบ 4.1) พบว่า อาหารปรับสูตรกากน้ำตาลช่วยส่งเสริมการเจริญเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ได้ดี ส่งผลให้เชื้อ *X. stockiae* PB09 มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 คือ 14.3 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลัง 13 กรัมต่อลิตร และในอาหารพื้นฐาน LB มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพประกอบ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

เนื่องจากอาหารปรับสูตรกากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลสูงที่สุดคือ 65 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำตาลซูโครสประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังพบองค์ประกอบของวิตามิน และ

Mahasarakham University

สารอาหารรองจำนวนมาก (ตาราง 2.1) กากน้ำตาลนอกจากจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพแล้ว ยังมีองค์ประกอบที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอยู่ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ และยังมีกลุ่มของกรดอะมิโนอีกด้วย (ตาราง 2.2) ซึ่งทำให้อาหารปรับสูตรกากน้ำตาลให้ผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 สูงกว่าอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลัง และอาหารสูตรพื้นฐาน LB ซึ่งมีแหล่งคาร์บอน หรือปริมาณน้ำตาลต่ำกว่า ส่วนการหาผลได้ของเซลล์จากแหล่งคาร์บอน พบว่า ในอาหารปรับสูตรกากน้ำตาลมีผลได้ของเซลล์จากแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 6.59 รองลงมาคืออาหารปรับสูตรกากถั่วเหลืองเท่ากับ 11.13 และอาหารพื้นฐาน LB เท่ากับ 11.42 ตามลำดับ

2) ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ของสารเมทาโบไลท์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร

การศึกษาเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารพื้นฐาน LB ซึ่งจะประกอบด้วยทริปโตน 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนคือใช้กากมันสำปะหลัง หรือกากน้ำตาล โดยทำการเติมลงไปทดแทนทริปโตน แต่องค์ประกอบของอาหารอื่นๆ ยังคงเดิม ทำการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสต์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่าอยู่ที่ 200 รอบต่อนาที ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนาน 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำเอาตัวอย่างที่เก็บได้ในช่วงเวลาต่างๆ มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จะได้เป็นส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย และแบ่งส่วนหนึ่งมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ เทอาหารเก่าทิ้งแล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ ทำเซลล์ให้กระจายตัวในอาหารใหม่ จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonicator แล้วกรองเอาส่วนใสด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จะได้สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำเอาส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย และสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4.1 - 4.8

Mahasarakham University

ตาราง 4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งคาร์บอน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากมันสำปะหลัง	47.00 ± 2.41^{cC}	55.00 ± 1.45^{dB}	57.00 ± 3.85^{dA}	59.00 ± 2.19^{dA}
อาหารกากน้ำตาล	57.00 ± 0.56^{bC}	75.00 ± 3.10^{bB}	85.00 ± 1.90^{bA}	85.00 ± 0.88^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	49.00 ± 2.18^{cC}	71.00 ± 1.00^{cB}	75.00 ± 1.45^{cA}	75.00 ± 2.18^{cA}
Dw	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.1 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทำการทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร พบว่า ผลของการใช้ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ในอาหารปรับสูตรกากน้ำตาลให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากันที่ 85 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียของอาหารพื้นฐาน LB และส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียของอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลังที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากับ 75 และ 59 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 96 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* ของสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบ แต่ละสูตรที่ชั่วโมงการเพาะเลี้ยงที่ 72 และ 96 พบว่า ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งคาร์บอน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากมันสำปะหลัง	16.00 ± 1.10^{bB}	18.00 ± 2.08^{cB}	19.00 ± 0.58^{dA}	19.00 ± 3.32^{dA}
อาหารกากน้ำตาล	19.00 ± 2.11^{bC}	25.00 ± 1.91^{bB}	29.00 ± 3.70^{bA}	29.00 ± 0.57^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	17.00 ± 0.89^{bB}	24.00 ± 1.45^{bA}	25.00 ± 2.21^{cA}	25.00 ± 0.58^{cA}
Dw	0.00 ± 0.00^{cA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.2 แสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับสารสกัดจากเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร พบว่า ในอาหารปรับสูตรกากน้ำตาลให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 และ 96 คือมีประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากันที่ 29 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารพื้นฐาน LB และอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลังที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากับ 25 และ 19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิดให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. หลังจากการทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งคาร์บอน	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phytophtora* sp.*			
	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96
อาหารกากมันสำปะหลัง	62.00±2.34^{dB}	62.00±1.92^{dB}	66.00±1.54^{dA}	65.00±1.31^{dA}
อาหารกากน้ำตาล	73.00±0.21^{bB}	76.00±2.21^{bA}	76.00±2.82^{bA}	76.00±0.96^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	65.00±2.00^{cB}	69.00±3.47^{cA}	69.00±2.88^{cA}	69.00±2.09^{cA}
Dw	0.00±0.00^{eA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{eA}	0.00±0.00^{eA}
Carbendazim	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.3 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร พบว่า หลังจากทำการทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารปรับสูตรกากน้ำตาล ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48, 72 และ 96 ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากันที่ 76 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารพื้นฐาน LB และอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลังคือมีประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ที่ 69 และ 66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิดให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Phytophtora* sp. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. หลังจากการทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งคาร์บอน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phytophtora* sp.***			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากมันสำปะหลัง	18.00 ± 2.78^{bB}	18.00 ± 2.42^{bA}	19.00 ± 2.94^{cA}	19.00 ± 3.52^{cA}
อาหารกากน้ำตาล	20.00 ± 3.64^{bB}	24.00 ± 3.64^{bB}	25.00 ± 1.57^{bA}	25.00 ± 1.46^{bB}
อาหารพื้นฐาน LB	16.00 ± 0.89^{bB}	18.00 ± 0.45^{bA}	19.00 ± 3.21^{cA}	19.00 ± 0.58^{cA}
Dw	0.00 ± 0.00^{cB}	0.00 ± 0.00^{cA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.4 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. หลังจากทดสอบกับสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร พบว่าการใช้สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารปรับสูตรกากน้ำตาล ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารพื้นฐาน LB และอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลังที่มีการยับยั้งเท่ากันที่ 19 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ในชั่วโมงที่ 72 และชั่วโมงที่ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิดให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophtora* sp. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งคาร์บอน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากมันสำปะหลัง	35.00 ± 1.05^{cC}	49.00 ± 11.36^{dB}	55.00 ± 1.38^{cA}	53.00 ± 1.81^{dA}
อาหารกากน้ำตาล	58.00 ± 0.52^{bC}	62.00 ± 1.57^{bB}	75.00 ± 0.21^{bA}	75.00 ± 2.77^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	52.00 ± 0.00^{cB}	52.00 ± 0.00^{cB}	55.00 ± 1.38^{cA}	56.00 ± 0.91^{cA}
Dw	0.00 ± 0.00^{cA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.5 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร พบว่าในอาหารปรับสูตรกากน้ำตาลให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 และ 96 คือมีประสิทธิภาพเท่ากันที่ 75 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารพื้นฐาน LB และอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลังที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากับ 56 และ 53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิดให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากการทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งคาร์บอน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากมันสำปะหลัง	25.00 ± 2.77^{bB}	29.00 ± 3.44^{bA}	29.00 ± 3.96^{cA}	32.00 ± 1.38^{cA}
อาหารกากน้ำตาล	26.00 ± 2.12^{bB}	26.00 ± 2.40^{bB}	37.00 ± 3.27^{bA}	39.00 ± 1.89^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	19.00 ± 2.16^{cB}	20.00 ± 1.41^{cB}	21.00 ± 0.58^{dB}	25.00 ± 1.50^{dA}
Dw	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.6 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากการทดสอบกับสารสกัดจากเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร พบว่า ในอาหารปรับสูตรกากน้ำตาลให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในชั่วโมงที่ 96 สูงที่สุด คือมีประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ที่ 39 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลัง และ LB ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากับ 32 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ยกเว้นอาหารพื้นฐาน LB ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งคาร์บอน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. solani****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากมันสำปะหลัง	43.00 ± 1.25^{dB}	45.00 ± 1.89^{dB}	59.00 ± 1.00^{cA}	58.00 ± 0.28^{dA}
อาหารกากน้ำตาล	55.00 ± 1.00^{cC}	58.00 ± 0.51^{cB}	68.00 ± 3.05^{bA}	66.00 ± 3.05^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	60.00 ± 1.00^{bB}	60.00 ± 0.76^{bB}	65.00 ± 3.53^{bA}	63.00 ± 0.50^{cA}
Dw	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{cA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.7 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร พบว่า ผลของการใช้ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารปรับสูตรกากน้ำตาลให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในชั่วโมงที่ 72 สูงที่สุด คือ 68 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลังที่ให้ผลการยับยั้งที่ 59 เปอร์เซ็นต์ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งคาร์บอน	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. solani**			
	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96
อาหารกากมันสำปะหลัง	24.00±2.02^{cB}	26.00±1.32^{dB}	34.00±0.70^{cA}	32.00±0.68^{cA}
อาหารกากน้ำตาล	31.00±5.50^{bB}	34.00±0.76^{bB}	37.00±0.46^{bA}	38.00±2.57^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	30.00±1.17^{bB}	30.00±0.96^{cB}	34.00±2.00^{cA}	33.00±0.96^{cA}
Dw	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{eA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}
Carbendazim	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.8 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับสารสกัดจากเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร พบว่า การเจริญของเชื้อรา *R. solani* พบว่า ในอาหารปรับสูตรกากน้ำตาลให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในชั่วโมงที่ 96 สูงที่สุด คือ 38 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารพื้นฐาน LB และอาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลังคือ 33 และ 32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิดให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.1.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์

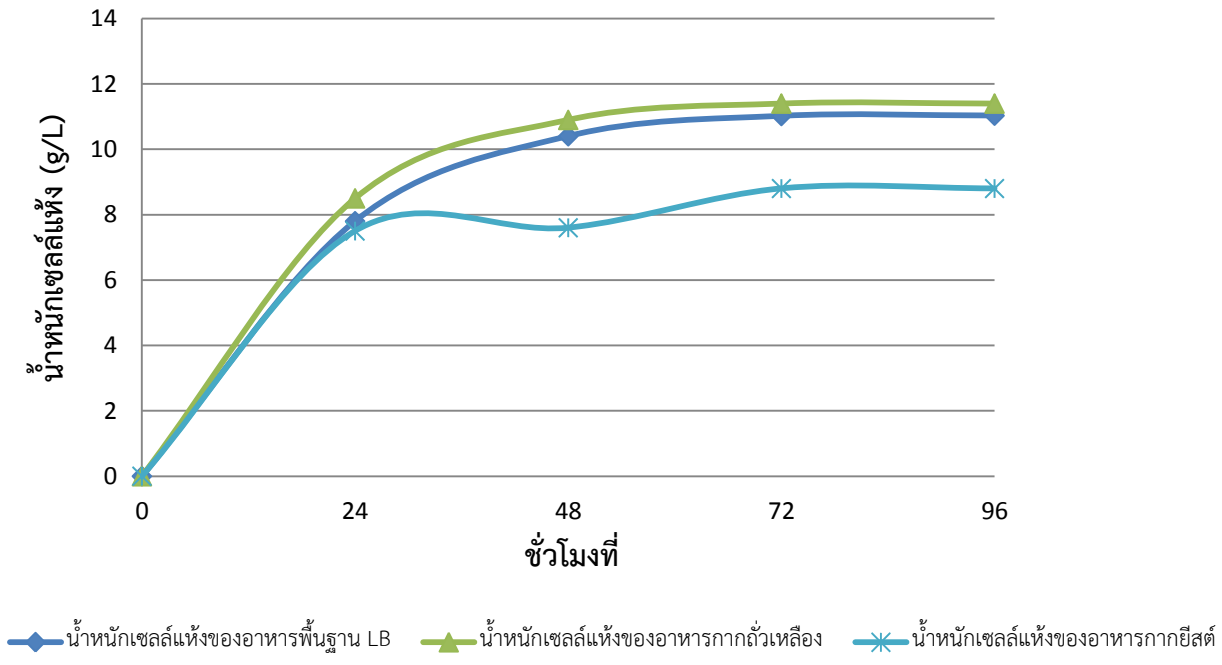
งานวิจัยนี้เลือกวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนจำนวน 2 แหล่ง ได้แก่ กากถั่วเหลือง และกากยีสต์ โดยการเตรียมอาหารปรับสูตร LB ที่เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนใหม่จากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร ในอัตราส่วนเดียวกันกับแหล่งไนโตรเจนเดิม และองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหารยังคงเดิม และทำการเปรียบเทียบกับอาหารพื้นฐาน LB โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ในชั่วโมงที่

Mahasarakham University

0, 24, 48, 72 และชั่วโมงที่ 96 แล้วทำการตรวจวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ได้ผลการทดลองดังนี้

1) ผลของแหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรในอาหารปรับสูตร LB ต่อการเจริญ และการผลิตสารเมทาโบไลท์ของแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09

การศึกษาเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร โดยใช้กากถั่วเหลือง 5 กรัม หรือกากยีสต์ 5 กรัม เติมลงไปเพื่อลงไปทดแทนแหล่งไนโตรเจนเดิมในของสูตรอาหารพื้นฐาน LB ปริมาตร 1 ลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มีการเจริญดีที่สุดในอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อให้มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.4 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือการเพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐาน LB ซึ่งการเจริญของเชื้อดีที่สุดในชั่วโมงที่ 96 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.03 กรัมต่อลิตร และอาหารที่มีการเจริญของเชื้อต่ำที่สุดคือ อาหารปรับสูตรกากยีสต์ ซึ่งมีการเจริญของเชื้อสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.8 กรัมต่อลิตร (ภาพประกอบ 4.2)



ภาพประกอบ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

กากถั่วเหลืองที่เติมลงไปในอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลืองนั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ประมาณ 43-51 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีแคลเซียม 0.25-0.30 เปอร์เซ็นต์

Mahasarakham University

ฟอสฟอรัส 0.5-0.63 เปอร์เซ็นต์ และยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็น (Essential amino acids) อยู่ในปริมาณสูงหลายชนิด ได้แก่ ไลซีน 2.77-3.19 เปอร์เซ็นต์ ทรีโอนีน 1.66-1.91 เปอร์เซ็นต์ และ ทริปโตเฟน 0.54-0.64 เปอร์เซ็นต์ (Krochta and De Mulder-Johnston, 1997) จึงน่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้อาหารปรับสูตรกากถั่วเหลืองให้ผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 สูงกว่าอาหารปรับสูตรกากยีสต์ และอาหารสูตรพื้นฐาน LB

2) ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ของสารเมทาโบไลท์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารพื้นฐาน LB ซึ่งประกอบด้วย ทริปโตน 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนคือ ใช้กากถั่วเหลือง หรือกากยีสต์ โดยทำการเติมลงไปทดแทนสารสกัดยีสต์ แต่องค์ประกอบของอาหารอื่นๆ ยังคงเดิม ทำการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสต์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่าอยู่ที่ 200 รอบต่อนาที ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนาน 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำเอาตัวอย่างที่เก็บได้ในช่วงเวลาต่างๆ มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จะได้เป็นส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย และแบ่งส่วนหนึ่งมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ เทอาหารเก่าทิ้งแล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ ทำเซลล์ให้กระจายตัวในอาหารใหม่ จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonicator แล้วกรองเอาส่วนใสด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จะได้สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำเอาส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย และสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ให้ผลดังตาราง 4.9 – 4.16

Mahasarakham University

ตาราง 4.9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งไนโตรเจน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากถั่วเหลือง	47.00 ± 0.52^{bB}	48.00 ± 0.91^{cB}	56.00 ± 4.32^{bA}	54.00 ± 3.71^{bA}
อาหารกากยีสต์	38.00 ± 2.11^{dC}	54.00 ± 3.19^{bB}	58.00 ± 0.90^{bA}	59.00 ± 1.81^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	41.00 ± 2.10^{cB}	42.00 ± 1.05^{dB}	45.00 ± 1.89^{cA}	45.00 ± 3.63^{cA}
Dw	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.9 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทำการทดสอบกับ พบว่า การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* หลังการทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารปรับสูตรกากยีสต์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* ในชั่วโมงที่ 96 สูงที่สุด คือ 59 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารพื้นฐาน LB ที่มีการยับยั้งที่ 45 เปอร์เซ็นต์ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งไนโตรเจน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากถั่วเหลือง	43.00 ± 1.89^{bB}	44.00 ± 1.57^{bB}	$49.00\pm.291^{bA}$	49.00 ± 1.57^{bA}
อาหารกากยีสต์	29.00 ± 1.89^{cB}	29.00 ± 3.27^{bB}	29.00 ± 2.32^{dB}	37.00 ± 0.00^{cA}
อาหารพื้นฐาน LB	29.00 ± 2.56^{cB}	31.00 ± 3.42^{bA}	35.00 ± 3.77^{cA}	36.00 ± 4.51^{cA}
Dw	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{dA}
Carbendazim	100 ± 0.00^{aA}	100 ± 0.00^{aA}	100 ± 0.00^{aA}	100 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.10 พบว่า การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* หลังการทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลืองให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* ในชั่วโมงที่ 96 สูงที่สุด คือ 49 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารปรับสูตรกากยีสต์ และอาหารพื้นฐาน LB ที่มีการยับยั้งที่ 37 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ยกเว้นอาหารปรับสูตรกากยีสต์ ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งไนโตรเจน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phytopthora* sp.***			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากถั่วเหลือง	10.00 ± 2.58^{bB}	16.00 ± 0.40^{cA}	18.00 ± 5.39^{cA}	18.00 ± 3.28^{cA}
อาหารกากยีสต์	20.00 ± 1.69^{bA}	22.00 ± 1.44^{bA}	22.00 ± 0.83^{bA}	23.00 ± 0.74^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	12.00 ± 2.18^{cB}	16.00 ± 2.58^{cA}	16.00 ± 0.69^{cA}	17.00 ± 1.83^{cA}
Dw	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.11 พบว่า การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytopthora* sp. หลังการทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารปรับสูตรกากยีสต์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. ในชั่วโมงที่ 96 สูงที่สุด คือ 23 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลือง และอาหารพื้นฐาน LB คือ 18 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 48, 72 และ 96 ของอาหารทดสอบทั้งหมดให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งไนโตรเจน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phytopthora* sp.***			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากถั่วเหลือง	10.00±1.48^{cA}	16.00±0.57^{cA}	17.00±2.21^{cA}	18.00±2.43^{cA}
อาหารกากยีสต์	12.00±2.58^{cA}	14.00±1.74^{dA}	27.00±1.91^{bA}	24.00±1.20^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	16.00±1.09^{bA}	18.00±0.50^{bA}	19.00±1.50^{cA}	18.00±1.92^{cA}
Dw	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{eA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}
Carbendazim	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตาราง 4.12 พบว่า การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytopthora* sp. หลังการทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารปรับสูตรกากยีสต์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. ในชั่วโมงที่ 72 สูงที่สุด คือ 27 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารพื้นฐาน LB และอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลือง ที่มีการยับยั้งอยู่ที่ 19 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 24 ถึง 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งไนโตรเจน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากถั่วเหลือง	36.00 ± 0.90^{cB}	43.00 ± 1.47^{cA}	43.00 ± 1.23^{cA}	44.00 ± 2.50^{cA}
อาหารกากยีสต์	36.00 ± 2.42^{cB}	39.00 ± 3.50^{cB}	43.00 ± 2.54^{cA}	43.00 ± 1.34^{cA}
อาหารพื้นฐาน LB	52.00 ± 1.80^{bA}	52.00 ± 1.47^{bA}	53.00 ± 3.55^{bA}	56.00 ± 2.24^{bA}
Dw	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}
Carbendazim	100 ± 0.00^{aA}	100 ± 0.00^{aA}	100 ± 0.00^{aA}	100 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.13 พบว่าการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังการทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารพื้นฐาน LB ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในชั่วโมงที่ 96 สูงที่สุด คือ 56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลือง และ อาหารปรับสูตรกากยีสต์คือ 44 และ 43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งไนโตรเจน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากถั่วเหลือง	33.00 ± 0.22^{cA}	33.00 ± 1.34^{dA}	34.00 ± 2.38^{dA}	36.00 ± 1.34^{cA}
อาหารกากยีสต์	34.00 ± 1.34^{cC}	36.00 ± 1.45^{cB}	39.00 ± 0.00^{cA}	36.00 ± 2.24^{cB}
อาหารพื้นฐาน LB	39.00 ± 1.50^{bC}	40.00 ± 0.83^{bC}	43.00 ± 0.54^{bA}	42.00 ± 1.64^{bA}
Dw	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{dA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.14 พบว่าการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังการทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารพื้นฐาน LB ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในชั่วโมงที่ 72 สูงที่สุด คือ 43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารปรับสูตรกากยีสต์และอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลือง ที่มีการยับยั้ง คือ 39 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ยกเว้นอาหารปรับสูตรกากยีสต์ ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งไนโตรเจน	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. solani****			
	ชั่วโมงที่ 24	**ชั่วโมงที่ 48**	**ชั่วโมงที่ 72**	**ชั่วโมงที่ 96**
อาหารกากถั่วเหลือง	53.00±2.36^{cA}	58.00±0.93^{cA}	58.00±6.07^{bA}	56.00±0.52^{cA}
อาหารกากยีสต์	50.00±4.48^{cB}	58.00±0.54^{cB}	67.00±1.37^{bA}	66.00±0.93^{bA}
อาหารพื้นฐาน LB	60.00±0.53^{bC}	60.00±0.00^{bC}	67.00±0.00^{bA}	65.00±0.90^{bB}
Dw	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{dA}
Carbendazim	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.15 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* หลังการทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารปรับสูตรกากยีสต์และอาหารพื้นฐาน LB ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในชั่วโมงที่ 72 เท่ากันและสูงที่สุด คือ 67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลือง ที่มีการยับยั้งที่ 58 เปอร์เซ็นต์ แต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ยกเว้นอาหารพื้นฐาน LB ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Mahasarakham University

ตาราง 4.16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* หลังจากทดสอบกับสารสกัดเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารปรับสูตร LB ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร

แหล่งไนโตรเจน	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. solani**			
	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96
อาหารกากถั่วเหลือง	24.00 ± 0.97^{dA}	24.00 ± 0.87^{dA}	24.00 ± 1.87^{cA}	27.00 ± 0.53^{cB}
อาหารกากยีสต์	31.00 ± 1.37^{bB}	34.00 ± 1.42^{bA}	34.00 ± 1.53^{bA}	38.00 ± 4.48^{bB}
อาหารพื้นฐาน LB	30.00 ± 2.31^{cA}	30.00 ± 1.36^{cA}	33.00 ± 3.38^{bA}	34.00 ± 3.14^{bA}
Dw	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}
Carbendazim	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml)
อักษร a, b, c, ... ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
อักษร A, B, C, ... ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง 4.16 พบว่า การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* หลังการทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียในอาหารปรับสูตรกากยีสต์ ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในชั่วโมงที่ 96 สูงที่สุด คือ 38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารพื้นฐาน LB และอาหารปรับสูตรกากถั่วเหลือง คือ 34 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ของอาหารทดสอบแต่ละชนิด ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

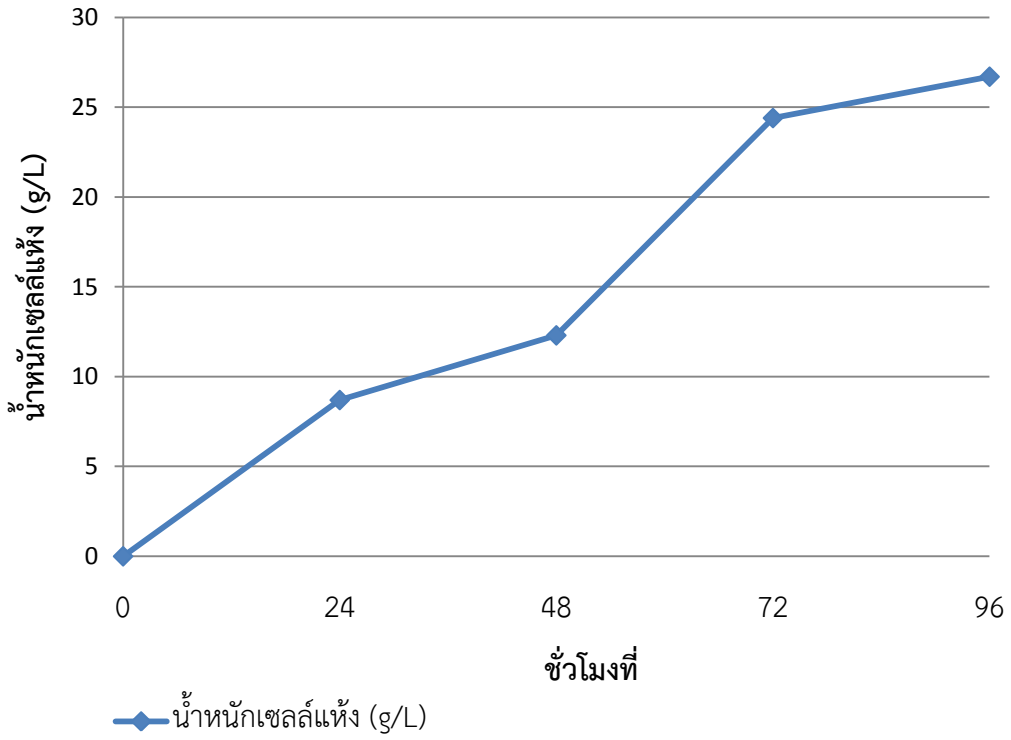
4.2 ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ในถังหมักแบบกะ

4.2.1 ผลการเจริญของแบคทีเรีย *X. stokiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร ในถังหมักแบบกะ

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า แหล่งวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหรรมการเกษตรที่เหมาะสมในการใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เพื่อผลิตสารเมทาโบไลท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งศัตรูพืช คือ กากน้ำตาล และกากยีสต์ ดังนั้นจึงนำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสากรรมเกษตรทั้งสองชนิดนี้มาศึกษาต่อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เพื่อผลิตสารเมทาโบไลท์สูงสุดในถังหมักแบบกะ ได้ผลดังนี้คือ อาหารปรับสูตร LB ที่มีการเติมกากน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร เพื่อลงไปทดแทนแหล่งคาร์บอนเดิม และเติมกากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เพื่อลงไปทดแทนแหล่ง

Mahasarakham University

ไนโตรเจนเดิม จะช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อให้มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ที่ 26.7 กรัมต่อลิตร ดังภาพประกอบ 4.3 ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้นจาก 22.8 กรัมต่อลิตร ได้ถูกเชื้อแบคทีเรียใช้ไปจนถึงชั่วโมงที่ 96 คงเหลือเพียง 1.11 กรัมต่อลิตร



ภาพประกอบ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสม

Mahasarakham University

4.2.2 ผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร

ตาราง 4.17 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชสูงสุดหลังของการทดสอบด้วยสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ทั้งที่เพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ และที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะ

เชื้อราก่อโรคพืช	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในระดับฟลาสก์						เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในถังหมักแบบกะ	
	อาหารพื้นฐาน LB		อาหารปรับสูตรกากน้ำตาล		อาหารปรับสูตรกากยีสต์		อาหารปรับสูตรกากน้ำตาล + กากยีสต์	
	CFS	CE	CFS	CE	CFS	CE	CFS	CE
Fusarium Oxysporum	75.00±2.18	25.00±2.21	85.00±1.90	29.00±3.70	59.00±1.81	37.00±0.00	86.00±0.30	36.00±0.64
Phytophthora sp.	69.00±3.34	19.00±3.21	76.00±2.82	25.00±1.57	23.00±0.74	27.00±1.19	70.00±0.32	29.00±0.62
Colletotrichum gloeosporioides	56.00±0.91	25.00±1.50	75.00±2.77	39.00±1.89	43.00±2.54	39.00±0.00	74.00±1.93	33.00±1.13
Rhizoctonia Solani	65.00±3.53	34.00±2.00	68.00±3.05	38.00±2.57	67.00±1.37	38.00±4.48	60.00±2.24	16.00±2.72

หมาย เหตุ * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; DW = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ; Carbendazim = สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.05 mg/ml); CSF = ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย ; CE = สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย

ตาราง 4.17 การทดสอบผลสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ซึ่งได้จากเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคที่ใช้ทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ พบมีสารเมทาโบไลท์ที่มีประสิทธิภาพสูง คือ สารเมทาโบไลท์ได้จากส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย และมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสูงสุด คือ 86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *F. oxysporum* รองลงมาคือ *C. gloeosporioides, Phytophthora* sp. และ *R. solani* ตามลำดับ

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชของสารเมทาโบไลท์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในถังหมักแบบกะกับการเพาะเลี้ยงใน

Mahasarakham University

ระดับ ฟลาสก์ พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช หลังจากการทดสอบด้วยสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ซึ่งได้จากเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าเมื่อทดสอบกับเชื้อ *F. oxysporum* และ *C. gloeosporioides* และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารพื้นฐาน LB แล้ว เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในสารเมทาโบล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงถังหมักแบบกะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum, Phytophthora sp.* และ *C. gloeosporioides* สูงกว่า

Mahasarakham University

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (กากมันสำปะหลัง และกากน้ำตาล) และแหล่งไนโตรเจน (กากถั่วเหลือง และกากยีสต์) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มาเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงในอาหารเชื้อพื้นฐาน LB และทำการปรับเปลี่ยนสูตรโดยที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอน หรือแหล่งไนโตรเจนเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร พบว่าอาหารปรับสูตร LB ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 14.3 กรัมต่อลิตร เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลสูง อีกทั้งยังมีสารประกอบไนโตรเจนต่างๆ อีกด้วย (คมเดช งามสมจิตร, 2553) ส่วนในอาหารปรับสูตร LB ที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ที่ 11.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐาน LB ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 11.03 กรัมต่อลิตร

ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 จากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรต่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. oxysporum*, *Phytophthora* sp, *C. gloeosporioides* และ *R. solani* พบว่า ในส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารปรับสูตร LB ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* สูงสุดที่ 85.00±1.90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น คือ การเจริญของเชื้อมีสูงจะส่งผลให้สารเมทาโบไลท์ที่ผลิตได้สูงตามไปด้วย ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งสูง คือ สารเมทาโบไลท์จากส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียของเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่ทำการเพาะเลี้ยงอาหารปรับสูตร LB ที่มีกากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ถึง 67±1.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงพื้นฐาน LB คือ 65.00±3.53 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า แหล่งวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหรรมเกษตรที่เหมาะสมในการใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เพื่อผลิตสารเมทาโบไลท์ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งอาจจะเป็นสาร Xenocumycin 1 หรือที่เรียกสั้นๆ ว่า สาร Xcin 1 ที่สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยเชื้อราได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อลิตร

Mahasarakham University

ยับยั้งการสร้าสปอร์ได้ 92.63 เปอร์เซ็นต์ภายใต้ห้องปฏิบัติการ และในแปลงทดลองยับยั้งได้ 80.27 เปอร์เซ็นต์ (Xiufen *et al*., 2011) และสารเมทาโบไลท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช คือสารเมทาโบไลท์ที่ได้จากอาหารปรับสูตรกากน้ำตาล และกากยีสต์ ดังนั้นจึงนำเศษวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรทั้ง 2 ชนิดนี้ มาศึกษาต่อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เพื่อผลิตสารเมทาโบไลท์สูงสุดในถังหมักแบบกะ และจากการทดลองพบว่า สารเมทาโบไลท์ที่ได้จากส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ถึง 86.00±0.30 เปอร์เซ็นต์ จากผลของประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราจะมีเปอร์เซ็นต์สูงในชั่วโมงที่ 72 และยังพบอีกว่า ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิ และขับออกมานอกเซลล์ และเมื่อทำการวิเคราะห์ต้นทุนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียของแต่ละสูตรเปรียบเทียบกัน โดยคำนวณจากราคาวัสดุเหลือทิ้งทางจากอุตสาหกรรมการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัย (3.3.1) ร่วมกับราคาสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร (3.1.2) พบว่า อาหารพื้นฐาน LB มีต้นทุนสูงสุด คือมีต้นทุนการผลิตเฉลี่ยแล้ว 65.10 บาทต่อการเตรียมอาหาร 1 ลิตร อาหารปรับสูตรกากน้ำตาลมีต้นทุน 38.72 บาท อาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลัง 40.44 บาท อาหารปรับสูตรกากถั่วเหลืองและกากยีสต์มีต้นทุนเท่ากันคือ มีราคา 27.67 บาท อาหารปรับสูตรที่ใช้กากน้ำตาลร่วมกับกากยีสต์มีต้นทุนต่ำที่สุด คือมีต้นทุนลดลงเหลือเพียง 1.29 บาทเท่านั้น

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารเมทาโบไลท์จากเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 อาจมีสารต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 โดยใช้อาหารจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรยังพบว่าให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสูง และยังมีต้นทุนต่ำอีกด้วย จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมทางชีวภาพต่อไปในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 สารเมทาโบไลท์จากเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เป็นสารที่ผลิตภายในเซลล์ และขับออกมานอกเซลล์ จะเป็นการดีหากใช้สารเมทาโบไลท์ที่ได้จากทั้งสองส่วนมาใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใย ซึ่งน่าจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสูงขึ้น

5.2.2 เนื่องจากการศึกษาสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตจากเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ด้วยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชสายพันธุ์ *F. oxysporum* จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมอย่างจำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *F. oxysporum*

Mahasarakham University

เอกสารอ้างอิง

Mahasarakham University

เอกสารอ้างอิง

กิตฑามาศ ศิริไชย. (2555). การ*ผลิตไบโอเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยยีสต์ที่แยกได้ในประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คมเดช งามสมจิตร. (2553). *การศึกษาจลนพลศาสตร์การหมักเอทานอลจากน้ำอ้อย และกากน้ำตาล*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จินันทนา จอมทอง, สุมาฬี หรหมรุกขชาติ. (2558). *การใช้ชีวภัณฑ์ทดแทนสารเคมีป้องกันจำกัดโรคเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนในการผลิตข้าวที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารเสริมสุขภาพ*. งานวิจัยทางการศึกษา. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

จิรายุ สาอุตม์. (2557). *การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับแบคทีเรีย Xenorhabdus sp. และประสิทธิภาพของสารเมทาโบไลท์ในการควบคุมไรเห็ดและจุลินทรีย์บางชนิด*. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ชลดา ทองเจริญ. (2553). *ประสิทธิภาพของเชื้อ Pseudomonas spp. ในน้ำหมักชีวภาพเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา Fusarium oxysporum, Fusarium sp., lycopersici.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. (2552). แนววิธีวินิจฉัยโรคพืชให้เกษตรกร. *เกษตรธรรมชาติ*, 12 (9), 40-48.

ประพันธ์ โอสถาพันธ์. (2553). *การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลในการควบคุมเชื้อรา Phytophthora sp. สาเหตุโรคเน่าเข้าไส้ของกล้วยไม่เอื้องแซะหอม*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยวิทยาลัยแม่โจ้.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2551). *การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศด้วยกล้าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท.* งานวิจัยทางการศึกษา. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

พุทธพร แสงเทียน, ไท แสงเทียน, วรัญญา จันทร์สุข, อภิชา ชินศิริ. (2559). การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางและเอนไซม์เพื่อการผลิตไบโอเอทธานอล ใน: ประเสริฐ ตปนียางกูร, วันเพ็ญ วิโรจนกูฎ, พวงรัตน์ ขจิตวิชยานุกูล, ชาติ เจียมไชยศรี, วงศ์พันธ์ ลิมปเสนีย์ (บรรณาธิการ) *เอกสารการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 15 สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย*. 11-13 พฤษภาคม 2559, กรุงเทพฯ. หน้า 5-6.

รพีพร คำรัตน์. (2542). *การดูดซับโลหะหนักโดยการใช้กากยีสต์จากโรงงานเบียร์*.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหิดล.

รุ่งทิพย์ สังข์เผือก. (2557). *การศึกษาชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสุรนารี.

สมใจ ศิริโภค. (2540). *เทคโนโลยีการหมัก*. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.

Mahasarakham University

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. (2547). *แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์*. นครปฐม: สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซี่ยน.

Akhurst R.J. (1980). Morphological and functional dimorphism in Xenorhabdus spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes Neoplectana and Heterorhabditis. *Journal of General Microbiology,* 121, 303-309.

Bode HB. (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology,* 13 (2), 224-230.

Bussaman P, Sermswan RW and Grewal PS. (2006). Toxicity of the entomopathogenic bacteria *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* to the mushroom mite *(Luciaphorus sp.;* Acari*: Pygmephoridae). Biocontrol Science and Technology*, 16 (3), 245-256.

Chang CJ, Tanksley TD, Knabe DA and Zebrowski T. (1987). Effects of different heat treatments during processing on nutrient digestibility of soybean meal in growing swine. *Texas A&M University College Station*, 65, 1273–1282.

Church DC. (1991). Livestock Feeds and Feeding, 3rd ed Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.

Fang XL, Feng JT, Zhang WG, Wang YH and Zhang X. (2010). Optimization of growth medium and fermentation conditions for improved antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* TB using a statistical approach. *African Journal of Biotechnology,* 47 (9), 8068-8077.

Fang XL, Li ZZ., Wang YH and Zhang X. (2011). In vitro and in vivo antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *Jurnal of Application Microbiol*, 111 (1), 145–154.

Forst S, Dowds B, Boemare N and Stackebrandt E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. *bugs that kill bugs*. *Annual Review of Microbiology,* 51 (1), 47-72.

Heidi GB and Carke DJ. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus:* two roads to the same destination. *Molecular Microbiology*. 64 (2), 260-268.

Krochta JM and De Mulder-Johnston C. (1997). *Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities*. *Food Technology*, 51 (2), 61–74.

Mahasarakham University

Lang G, Kalvelage T, Peters A, Wiese J and Imhoff JF. (2008). Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of Natural Products,* 71 (6), 1074-1077.

Li JX, Chen GH and Webster JM. (1997). Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Canadian* Journal of Microbiology*,* 43, 770-773.

McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, Akhurst RJ and Gregson RP. (1991). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus spp.,* Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *Journal of Natural Product,* 54, 785-795.

Michael J. and Pelezar J. (1995). Hydrolysis of polysaccharide protein and lipid. In laboratory exercises in microbiology. *New York: MC Grow-Hill*. pp. 126-188.

Monod J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology***,** 3 (1), 371–394.

Mounts TL, Warner K, List GR., Friedrich JP and Koritala S. (1987). Effect of altered fatty acid composition on soybean oil stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65 (4**)**, 624–628.

Paul VJ, Frautschy S, Fenical W and Nealson KH. (1981). Antibiotics in microbial ecology, isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect–symbiotic bacteria *Xenorhabdus spp*. *Journal Chemistry Ecology,* 7 (3), 589–597.

Wang JX and Bedding RA. (1996). Poppulation development of Heterorhabditis bacteriophora and Steinernematis carpocapsae in the larvae of *Galleria mellonella*. *Fundamental of Applied Nematology*, 19, 363-367.

Wang YH, Li YP, Zhang Q and Zhang X. (2008). Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by medium optimization. *Bioresource Technology,* 99 (6), 1708-1715.

Wang YH, Fang XL, Li YP and Zhang X. (2010). Effects of constant and shifting dissolved oxygen concentration on the growth and antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila*. *Bioresource Technology,* 101 (19), 7529-7536

Webster JM, Li J and Chen G. (2001). Heterocyclic compounds with antibacterial and antimycotic properties. United States.

Mahasarakham University

Xiufen Y, dewen Q, Huaiwen Y, Zheng L, Hongmei Z and Jingjing Y. (2011). Activity *Xenorhabdus nematophilus var. pekingensis* against *Phtophthora infestans*. *Journal of Microbiol Biotechnol,* 27, 523-528.

Mahasarakham University

ภาคผนวก

Mahasarakham University

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Mahasarakham University

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH	7	

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. อาหารพื้นฐาน LB (Lauria Bertani broth)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extracts	5	กรัม
Nacl	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. อาหารปรับสูตรกากน้ำตาล

กากน้ำตาล	10	กรัม
Yeast extracts	5	กรัม
Nacl	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Mahasarakham University

4. อาหารปรับสูตรกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังปรับสภาพ	10	กรัม
Yeast extracts	5	กรัม
Nacl	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. อาหารปรับสูตรกากถั่วเหลือง

Tryptone	10	กรัม
กากถั่วเหลือง	5	กรัม
Nacl	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. อาหารปรับสูตรกากน้ำตาล

Tryptone	10	กรัม
กากยีสต์	5	กรัม
Nacl	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

7. สูตรอาหาร potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Ager	17	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

Mahasarakham University

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Mahasarakham University

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

Mahasarakham University

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซค์ 3 โมลาร์

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซค์ 16.833 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) จากนั้นถ่ายใส่ใน Duran แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารละลายไฮโดรคลอริก 3 โมลาร์

ตวงสารไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 11.46 โมลาร์ ปริมาตร 26.17 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) จากนั้นถ่ายใส่ใน Duran แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Percent inhibition of radial growth : PIRG)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา} = \frac{(R2-R1) \times 100}{R2}$$

โดย

R1 = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

R2 = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดเมทาโบไลท์จากแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

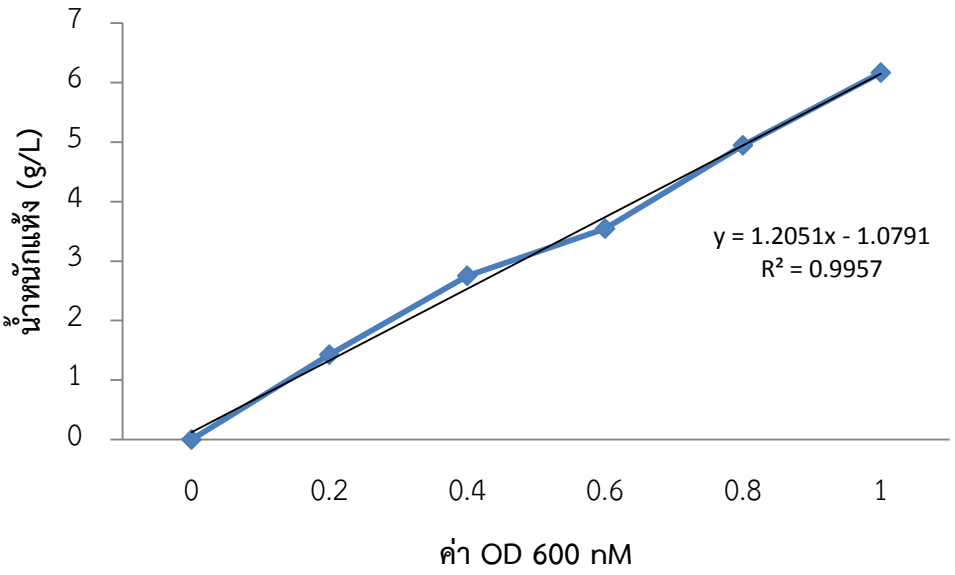
การประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75 เปอร์เซ็นต์	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61 – 75 เปอร์เซ็นต์	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51 – 60 เปอร์เซ็นต์	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
< 50 เปอร์เซ็นต์	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

Mahasarakham University

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

Mahasarakham University



ภาพประกอบ ค.1 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่เวลาการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง

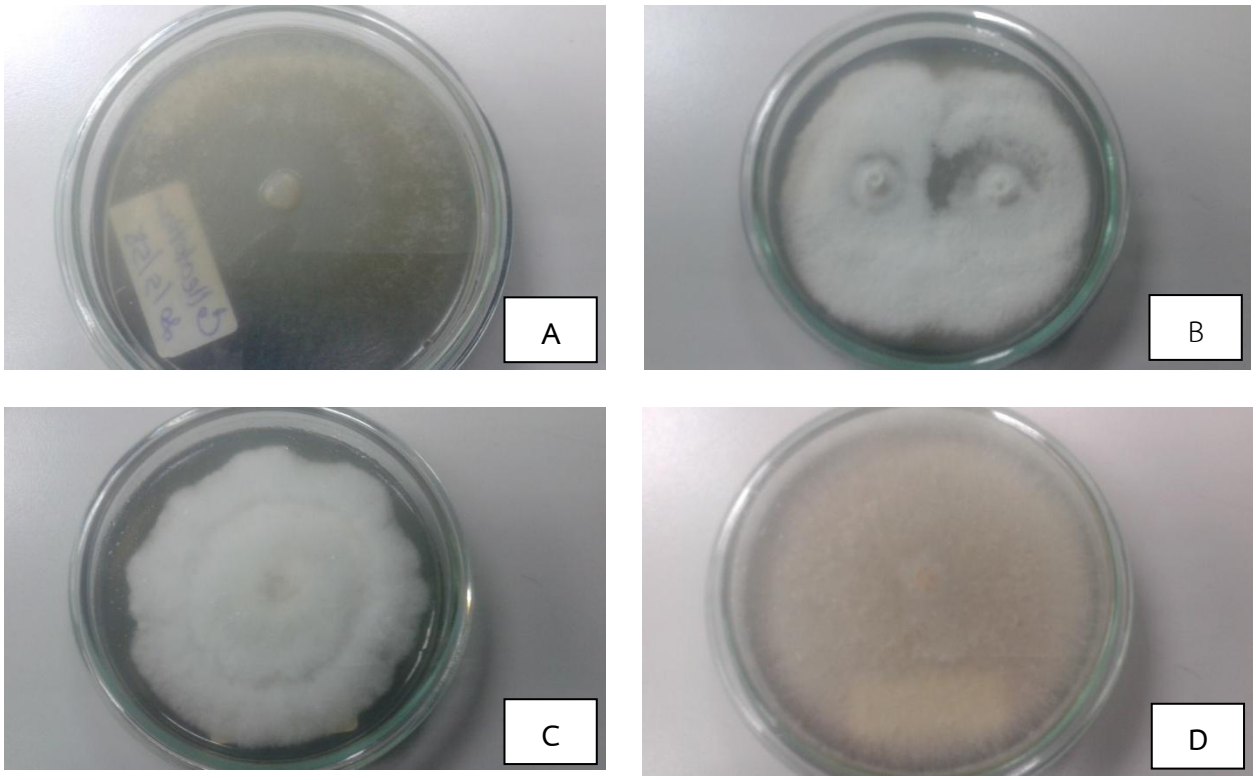
Mahasarakham University

ภาคผนวก ง

ลักษณะเชื้อราก่อโรคหลังจากได้รับสารเมทาโบไลท์ที่ผ่านการกรองเซลล์

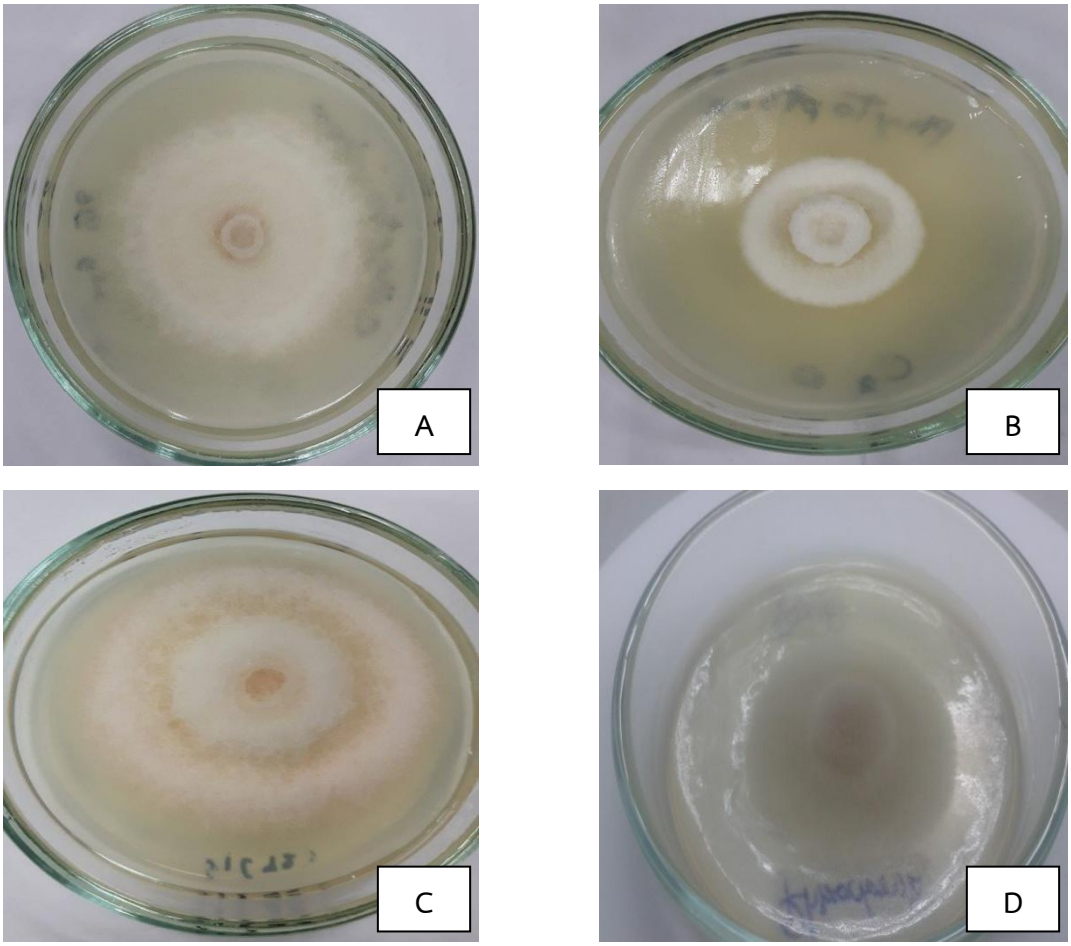
แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

Mahasarakham University



ภาพประกอบ ง1 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum gloeosporioides* (A), *Phytopthora* sp. (B), *Fusarium oxysporum* (C) และ *Rhizoctonia solani* (D)

Mahasarakham University



ภาพประกอบ ง2 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราก่อโรคแต่ละชนิดเมื่อทดสอบกับสารเมทาโบไลท์ *Colletotrichum gloeosporioides* (A), *Phytopthora* sp. (B), *Fusarium oxysporum* (C) และ *Rhizoctonia solani* (D)

Mahasarakham University

ประวัติย่อผู้วิจัย

Mahasarakham University

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล	นายเอกสิทธิ์ อ่อนนางใย
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2523
จังหวัด และประเทศที่เกิด	จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2536 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสารคามพิทยาคม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2541 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสารคามพิทยาคม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2547 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2561 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้	บ้านเลขที่ 482 หมู่ 1 ตำบลท่าขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

ผลงานวิจัย

On-nangyai A., Sa-uth C., Bussaman P., and Rattanasena P. (2015) Efficacy of *Xenorhabdus stockiae. PB09 metabolites against plant-infecting fungal pathogens*. in The 2nd international of postgraduate Symposium on food, Agriculture and biotechnology “IPSFAB2015”August 17-18, 2015. Mahasarakham, Thailand. pp. 33-37

Mahasarakham University