การประเมินประสิทธิภาพของการเตรียมและการบรรจุผลิตภัณฑ์ชีวภาพจุลินทรีย์สดเพื่องานเกษตร

โดย

นายณัฐพงษ์ ใยยอง

นายสุรชัย กทิศาสตร์

นายจักรกฤษณ์ เที่ยงธรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวัฒน์ พรหมเด่น

รายงานการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชาการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ศึกษา

สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ปีการศึกษา 2564

การประเมินประสิทธิภาพของการเตรียมและการบรรจุผลิตภัณฑ์ชีวภาพจุลินทรีย์สดเพื่องานเกษตร

โดย

นายณัฐพงษ์ ใยยอง

นายสุรชัย กทิศาสตร์

นายจักรกฤษณ์ เที่ยงธรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวัฒน์ พรหมเด่น

รายงานการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชาการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ศึกษา

สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ปีการศึกษา 2564

หัวข้อวิจัย การประเมินประสิทธิภาพของการเตรียมและการบรรจุผลิตภัณฑ์ชีวภาพจุลินทรีย์สดเพื่องานเกษตร
นักศึกษา นายณัฐพงษ์ ใยยอง นายสุรชัย กทิศาสตร์ และนายจักรกฤษณ์ เที่ยงธรรม
สาขาวิชาและคณะ วิทยาศาสตร์ทั่วไป
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดอกเตอร์ วรวัฒน์ พรหมเด่น
ปีการศึกษา 2564

บทคัดย่อ

การพัฒนารูปแบบการเตรียมและการบรรจุผลิตภัณฑ์ชีวภาพจุลินทรีย์สดและศึกษาอายุของการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ โดยศึกษาการเก็บรักษาเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Trichoderma harzianum* , *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ในขวดบรรจุอาหารข้าวสวยหุงสุกพันธุ์เจ็กเชยเสาไห้ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ซึ่งทำให้เชื้อราทั้ง 3 ชนิด สามารถดำรงชีวิตในขวดอาหารได้นานถึง 3 เดือน และศึกษาการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus thuringiensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 6 ชนิด ได้แก่ LB broth, LB broth เจือจาง 5 เท่า, Normal Saline Solution (NSS), 0.1 M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8, 0.1 M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8 และ น้ำกลั่น พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถดำรงชีวิตอยู่ไดในขวดอาหารทั้ง 6 ชนิด ได้เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วรวัฒน์ พรหมเด่น ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยอย่างดียิ่งตลอดมา และสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องและเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์สำหรับการทดลอง

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 นิยามศัพท์	2
1.6 กรอบแนวคิด	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เชื้อรา	4
2.2 เชื้อแบคทีเรีย	8
2.3 ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีจำหน่ายในท้องตลาดแบบต่างๆ	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 เครื่องมือวิทยาศาสตร์	12
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	12
3.3 จุลินทรีย์	13
3.4 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย และการทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียในอาหาร	13
3.5 การเตรียมเชื้อรา และการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อราในบรรจุภัณฑ์	14

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลอง และการอภิปราย **หน้า**

4.1 ผลการประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด 15

4.1.1 การประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด ในชุดการทดลองที่ 1 15

4.1.2 การประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด ในชุดการทดลองที่ 2 15

บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง 20

5.2 ข้อเสนอแนะ 20

เอกสารอ้างอิง 21

ภาคผนวก 26

ประวัติการศึกษา 32

สารบัญรูปภาพ

ภาพประกอบ **หน้า**

บทที่ 2

ภาพที่ 2.1 *Trichoderma harzianum* 5

ภาพที่ 2.2 Cadaver showing emerging hyphae producing conidia 6

ภาพที่ 2.3 Grasshoppers (Melanoplus sp.) killed by *Beauveria bassiana*. 7

ภาพที่ 2.4 Gram staining of *Bacillus amyloliquefaciens* 8

ภาพที่ 2.5 Microscopic characteristics of *Bacillus thuringiens* 9

บทที่ 4

ภาพที่ 4.1 (ก) *Trichoderma harzianum*

(ข) *Metarhizium anisopliae*

(ค) *Beauveria bassiana* 18

ภาพที่ 4.2 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด 18

ภาพที่ 4.3 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* 19

ภาพที่ 4.4 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* 19

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 4 ชื่อของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 16

ตารางที่ 4.1 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง 16

ตารางที่ 4.2 การศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด ณ อุณหภูมิห้อง 17

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันเกษตรกรไทยต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี เนื่องจากสารเคมีมีผลกระทบต่อสุขภาพ กลุ่มเกษตรกรได้หันมาใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) เป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับว่าใช้ได้ผลดี โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา บทบาทของจุลินทรีย์เหล่านี้จะช่วยปกป้องพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช ด้วยกลไกการเป็นปรสิต ซึ่งจุลินทรีย์หนึ่งสายพันธุ์อาจมีหนึ่งกลไกหรือมากกว่าหนึ่งกลไกที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ตัวอย่าง เช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มา ช่วยรักษารากและโคนเน่า ผลเน่า ใบจุด ใบไหม้ ใบเหี่ยว ราดำ เชื้อราบิวเวอร์เรีย คือจุลินทรีย์ที่จัดเป็นพวก “เชื้อราทำลายแมลง” โดยทำให้เกิดโรคกับแมลง สามารถทำลายแมลงได้หลายชนิดซึ่งได้แก่ แมลงจำพวกเพลี้ยต่างๆ หนอนผีเสื้อ ด้วง จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร สามารถใช้ได้หลายรูปแบบ ได้แก่ การใส่หรือราดดิน การคลุกเมล็ด รวมทั้งการพ่นต้นพืช

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อการจัดจำหน่าย ในปัจจุบันมีจำนวนมากให้เกษตรกรได้เลือกใช้งาน มีทั้งรูปแบบที่เป็นเชื้อสด แบบผง และแบบน้ำที่พร้อมใช้งาน โดยรูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้งานมากที่สุดจะอยู่ในรูปแบบของเชื้อสด เนื่องจากจุลินทรีย์จะช่วยปกป้องพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชได้ทันที อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์สดที่เกษตรกรได้นำมาใช้ ยังขาดเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic Technique) เป็นเทคนิคที่ป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการปนเปื้อนลงไปในเชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังผลิต ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพต่ำ เช่น ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่สั้นลง เนื่องจากมีแบคทีเรียที่ไม่ต้องการเข้าไปมีกิจกรรมร่วมกับกระบวนการผลิตเชื้อที่ต้องการ ส่งผลให้มีการผลิตของเสียที่เพิ่มมากขึ้น และส่งผลให้ปริมาณเชื้อที่ต้องการมีจำนวนลดลง งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งศึกษาการพัฒนารูปแบบบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด ให้มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์สดในอุณหูมิห้องได้ยาวนานยิ่งขึ้น และเพื่อออกแบบบรรจุภัณฑ์ที่สะดวกในการใช้งาน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเตรียมหัวเชื้อ อาหารและรูปแบบบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์สด
2. เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถมีชีวิตได้ในบรรจุภัณฑ์ ที่อุณหภูมิห้อง

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้ทำการศึกษาวิจัยภายในห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ที่ศึกษา ได้แก่ *Trichoderma harzianum, Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae ,Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus thuringiensis* เพื่อศึกษารูปแบบบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์สดและระยะเวลาที่เชื้อสามารถมีชีวิตได้ในบรรจุภัณฑ์ ที่อุณหภูมิห้อง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

บรรจุภัณฑ์มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์สดได้ยาวนาน และสะดวกต่อการนำไปใช้

นิยามศัพท์

จุลินทรีย์ คือ จุลินทรีย์(microorganism) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน มีทั้งแบบเซลล์เดี่ยว และหลายเซลล์ ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจึงจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ แบคทีเรีย-อาร์เคีย รา และ ยีสต์

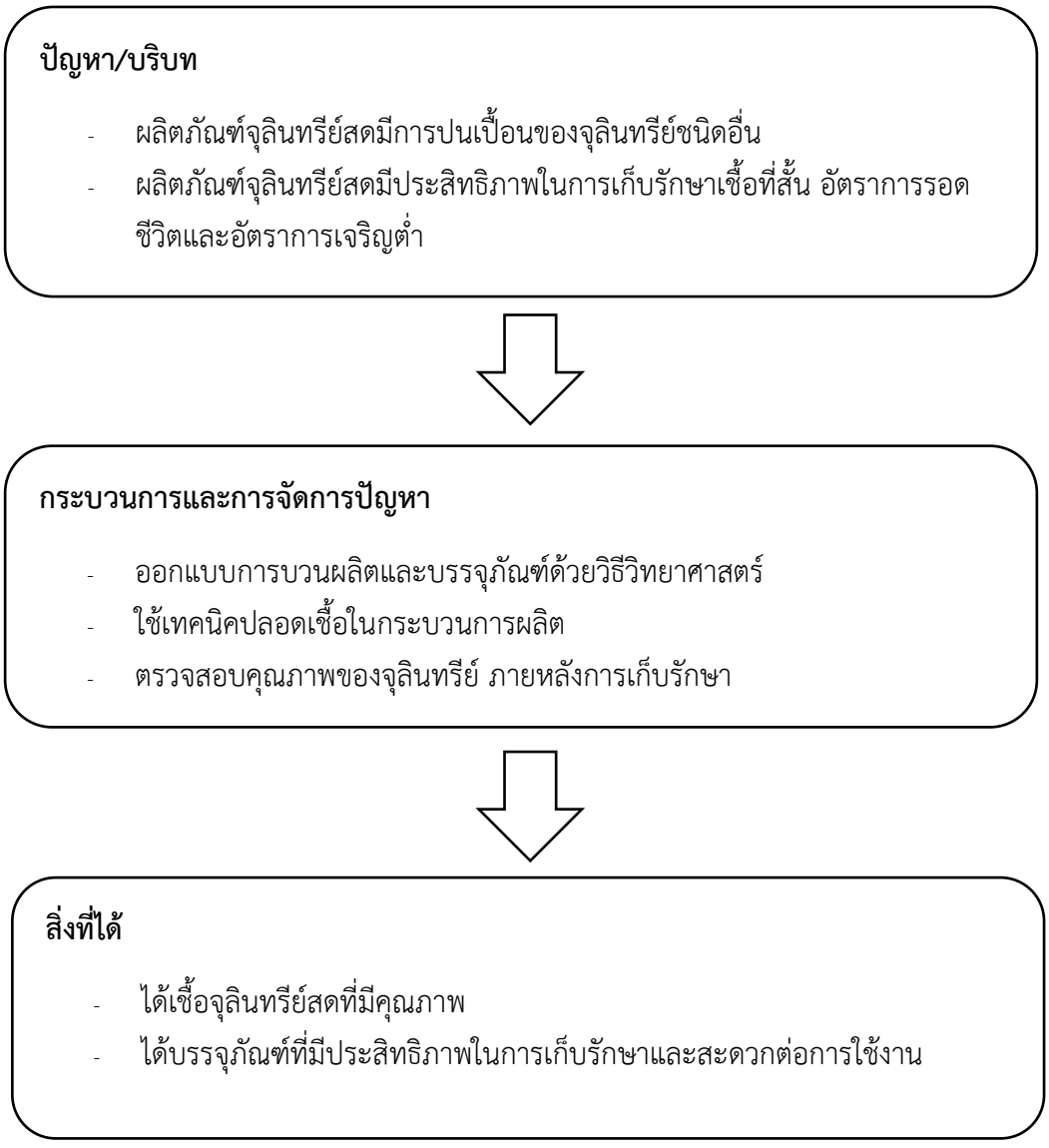
จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ หรือไวรัส ที่มีความสามารถในการควบคุมจำนวนประชากรหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช หรือ แมลงศัตรูพืชได้ รวมทั้งไปลดกิจกรรมของเชื้อก่อโรคพืช

เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic Technique) เป็นเทคนิคที่ป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการปนเปื้อนลงไปในเชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังทำการทดลองอยู่ นอกจากนั้นยังป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังทำการทดลองอยู่ออกมายังสิ่งแวดล้อม

ชีววิธี (biocontrol) คือ การใช้สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคเพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เรียกว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

รูปแบบบรรจุภัณฑ์ คือ ขั้นตอนการเตรียมเชื้อและอาหารลงในบรรจุภัณฑ์ การปิดผนึก การทำให้ปลอดเชื้อ และการเก็บรักษาก่อนจำหน่าย

กรอบแนวคิด



บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยนำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1.เชื้อรา

-เชื้อราไตรโคเดอร์มา *(Trichoderma harzianum)*

-เชื้อราเมธาไรเซียม *(Metarhizium anisopliae)*

-เชื้อราบิวเวอเรีย *(Beauveria bassiana)*

2.เชื้อแบคทีเรีย

- *Bacillus amyloliquefaciens*

- *Bacillus thuringiensis*

3.ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีจำหน่ายในท้องตลาดแบบต่างๆ

- ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบเชื้อสด

- ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบผง

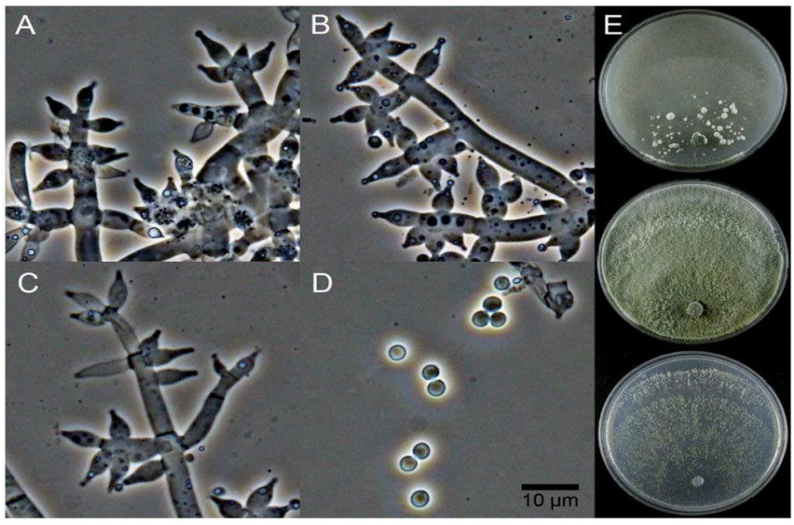
- ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบน้ำ

1. เชื้อรา

เชื้อราไตรโคเดอร์มา *(Trichoderma harzianum)* เป็นเชื้อราที่พบทั่ว ๆ ไป ในดิน เศษซากพืช ซากสัตว์ อินทรียวัตถุ และบริเวณ ระบบรากพืช (Tang *et. al*., 2001; Harman *et al*., 2004; Vinale *et. al*., 2008) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ จากดินธรรมชาติได้ง่าย เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อราหลายชนิด (จิระเดช แจมสว่าง, 2547) มีการเจริญเติบโตเร็ว ผลิตสปอร์ได้มาก เชื้อราชนิดนี้มีหลายสายพันธุ์ ซึ่งมีรายงานมากกว่า 30 ชนิด (Tang *et. al*., 2001) ซึ่งบางสายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช บางสายพันธุ์ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชบางสายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (เกษม สร้อยทอง, 2551) มีรายงานมากมายเกี่ยวกับใช้เชื้อรา ไตรโคเดอร์มา ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ (Zeilinger and

Omann, 2007; Kaewchai *et. al*., 2009) 194 *T. harzianum, T. viride, T. virens and T. polysporum* (Benitez *et. al*., 2004; Tang *et al*., 2001) ในจำนวนนี้ *T. harzianum* มีรายงานการใช้มากที่สุด (Abdel-Fattah *et. al*., 2007)

ไตรโคเดอร์มาเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ (Antagonistic fungus) ที่มีสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อราที่อยู่ในดิน เช่น *Phytophthora spp.* สาเหตุโรคผลร่วง ดอกร่วงของลำใย ลิ้นจี่ โรคดอกร่วงของทุเรียน โรครากเน่า-โคนเน่าของพริก ทุเรียน ส้ม มะนาว พริกไทย แตงโม แตงกวา มะเขือเทศ และโรคไส้เน่าของกล้วย *Pythium spp.* สาเหตุโรคเน่าคอดิน กล้าเน่า โคนเน่า ยอดเน่า ของพืชผัก *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดิน กล้าเน่า โรคใบติด *Fusarium spp.* สาเหตุโรคใบไหมใน ไม้ผล พืชไร่ พืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับ *Sclerotium rolfsi* สาเหตุโรคโคนเน่า โรคกล้าไหม ราเม็ดผัก กาด โรคเหี่ยวในพืชผัก สตรอเบอรี่ และพืชไร *Alternaria spp.* สาเหตุโรคใบจุดเนาใน คะน้า ผักกาดขาว กระหล่ำ-ดอก สตรอเบอรี่ มันฝรั่ง พริก *Colletotrichum spp*. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ในมะม่วง องุ่น มะละกอ พริก หอม กระเทียม มันฝรั่ง *Macrophomina phaseolina* สาเหตุของโรคเมล็ดเน่า และโคนเน่าของพืชตระกูลถั่ว *Mycocentrospora acerina* สาเหตุโรคเนาของแครอท *Botrytis cinerea* สาเหตุโรคไหม (จิระเดช แจมสว่าง, 2547; Tang *et. al*., 2001; Harman *et. al*., 2004; Woo and Lorito, 2007) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ ที่เชื้อราไตรโคเดอร์มาสามารถควบคุมได้ เช่น *Sclerotinia sclerotiorum, Verticillium spp., Bipolaris spp., Penicillium spp., Helminthosporium, Fusarium, Armillaria, Venturia, Endothia, Diaporthe, and Gaeumannomyces* (Tang *et. al*., 2001)



ภาพที่ 2.1 *Trichoderma harzianum*

ที่มาของภาพ : Jang, *et. al.* (2018)

เชื้อราเมธาไรเซียม *(Metarhizium anisopliae)* ชื่อไทย : เชื้อราเมธาไรเซียม ชื่อสามัญ : Green muscardine ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Metarhizium anisopliae* วงศ์ : *Moniliaceae* อันดับ : *Moniliales* เชื้อราเมตาไรเซียมหรือเชื้อราเขียว เป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวคล้ำ เจริญได้ดีในที่อุณหภูมิ 27-28 องศา เซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50-90% เชื้อราเมธาไรเซียมสามารถทำลายแมลงศัตรูพืช เช่น ด้วงแรดมะพร้าว แมลงค่อมทอง หนอนเจาะลำต้นอ้อย ตั๊กแตน เพลี้ยกระโดด ปลวกแมลงวันผลไม้ เป็นต้น โดยสปอร์จะงอกเส้นใยแทงทะลุเข้าไปในตัวแมลงไปถึงผิวหนังชั้นใน เจริญเติบโตในตัวแมลง แมลงที่ถูกทำลายในระยะแรกจะเห็นจุดสีน้ำตาลบนผนังลำตัว ต่อมาเห็นเส้นใยสีขาวเจริญเติบโตบนตัวแมลง หลังจากนั้นจะเห็นสปอร์คล้ายฝุ่นสีเขียวปกคลุมทั่วตัวแมลง แมลงที่ตายจะมีลำตัวแข็งและมีอายุอยู่ในดินได้นาน 1 ปี และอยู่ในตัวหนอนได้นานถึง 3 ปี มีรายงานว่าเชื้อราเขียว *(Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin)* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทั้งตัวอ่อนและตัวเต็ม วัยในนาข้าวได้ (จริยา และคณะ, 2529; เพชรหทัย และ คณะ, 2546) สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีความชื้นสูง สอดคล้องต่อสภาพที่อยู่อาศัยของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ราเขียวเมธาไรเซียม (*Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin*) เป็นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อยู่ใน Phylum: *AsComycota* เชื้อราในกลุ่มนี้มักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค “muscadine” ในแมลง โดยใน *M. anisopliae* มีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า “green muscadine” พบแพร่กระจายได้ทั่วไป สามารถใช้ควบคุมแมลงในกลุ่ม *Diptera,Lepidoptera,Orthoptera, Coleoptera, Hemiptera baz Hymenoptera* (LezamaGutierrez และคณะ 2000; Kershaw และคณะ 1999; Rosa และคณะ 2000)

ภาพที่ 2.2 Cadaver showing emerging hyphae producing conidia

ที่มาของภาพ : Gao, *et. al.* (2011)

เชื้อราขาวบิวเวอเรีย *(Beauveria bassiana)* เป็นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ จัดอยู่ใน Subdivision *Deuteromycotina* Class *Hyphomycetes* ซึ่งเชื้อราในกลุ่มนี้มักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค “muscadine” ในแมลง โดยใน *B. bassana* มีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า “white muscadine” พบแพร่กระจายได้ทั่วไป สามารถใช้ควบคุมแมลงในกลุ่ม *Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera* และ *Hymenoptera* (Rosa และคณะ 2000; Tanada and Kaya, 1993)

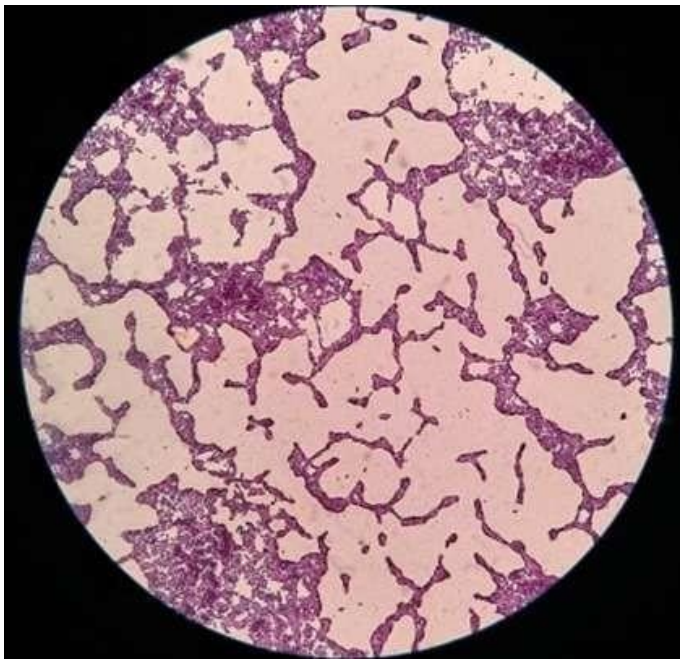
ในเมืองไทยมีการศึกษาการนำเชื้อราขาวมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชมากมาย จากรายงานผลงาน ค้นคว้าวิจัยตั้งแต่ปี 2525 -2539 โดยมลิวัลย์ ปันยารชุน กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา ได้ทำการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราดังกล่าวกับแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ พบว่า สามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และหนอนเจาะขั้วผลเงาะ เป็นต้น

ภาพที่ 2.3 Grasshoppers (*Melanoplus sp.)* killed by *Beauveria bassiana.*

ที่มาของภาพ : Jaronski. (2013)

2. เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens (RBt)* พบครั้งแรกโดยชาวญี่ปุ่นชื่อ Fukumoto และเป็นผู้ให้ชื่อตาม ลักษณะเด่นของเชื้อคือ ผลิตสารเหลวที่เป็นเอนไซม์อะไมเลสที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (Wang *et. al*., 2017) เป็น แบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคแต่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้หลายกลุ่ม (GotorVila *et. al*., 2017) เช่น สาร Difficidin และ Bacilysin ที่สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Erwinia amylovora* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้ (Chen et al., 2009) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคเหี่ยวเขียวในมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ คือ *Fusarium solani* และ *Ralstonia solanacearum* (Ailogba *et. al*., 2013; Tan *et. al*., 2013)



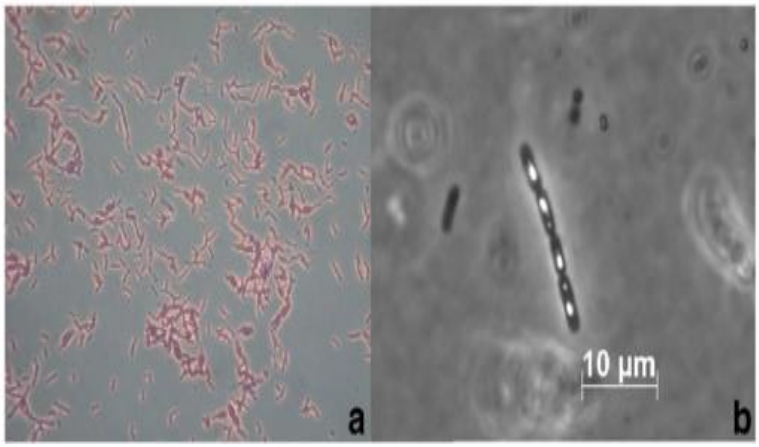
ภาพที่ 2.4 *Bacillus amyloliquefaciens*

ที่มาภาพ : Prihanto, *et. al.* (2018)

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis (Bt)* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง พบแพร่กระจายทั่วไป ในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน ในน้ำ และซากแมลงที่ตาย โดยแบคทีเรียบีที สามารถสร้างโปรตีนสารพิษฆ่าตัวอ่อน แมลง (Insectical crystal proteins, ICPs) ได้หลากหลายชนิด ซึ่งโปรตีนสารพิษที่สร้างขึ้นในรูปของผลึก โปรตีนระหว่างการสร้างสปอร์เรียกว่า Cry toxins (Schepf 1998) นอกจากนี้แบคทีเรียบีที่ยังสามารถสังเคราะห์โปรตีน

ฆ่าแมลงอื่น ๆ ได้ในช่วงการเจริญเติบโต โดยโปรตีนสารพิษนี้จะถูกหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า vegetation insecticidal protein หรือ Vip (Chakroun, *et. al*. 2016) ปัจจุบันโปรตีนสารพิษ จากแบคทีเรียบีที่ถูกนำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพหรือชีวภัณฑ์ธรรมชาติแทนการใช้สารเคมี โดยโปรตีน สารพิษในกลุ่ม Cry นั้นมีความจำเพาะในการฆ่าหนอนแมลงศัตรูที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการ จับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะอาหารในหนอนแมลง

Bacillus thuringiensis (Bt) ถูกพบค้นเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1901 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ชื่อ Systane Ishiwata ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากตัวหนอนไหมที่ตายแล้วจากโรค “sotto disease” โดยตั้งชื่อว่า *Bacillus sotto* โรคนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดการสูญเสียหนอนไหมเป็นจำนวนมากในญี่ปุ่น นอกจากนี้ เขายังพบว่าตัวหนอนหลายตัวเมื่อสัมผัสกับบาซิลลัสนั้นไม่ได้ทำให้เกิดการตายแม้ตัวหนอนจะอ่อนแอและแคระมาก จากการทดลองดูเหมือนจะเกิดจากพิษบางอย่างจากการตายที่เกิดขึ้นก่อนการเพิ่มจำนวนของบาซิลลัสแสดงให้เห็นว่า มีสารพิษบางอย่างที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดโรคของแบคทีเรียบีทีด (Sansinenea, 2012) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยของเขายังไม่ได้มีการจดบันทึกอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นในปี ค. ศ. 1915 นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Ernst Berliner ได้ทำการแยกสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องจากตัวอ่อน Mediterranean flour moth (Anagasta kuehniella) และตั้งชื่อว่า *Bacillus thuringiensis* ตามชื่อเมืองที่พบเชื้อคือ เมืองThuringia ประเทศเยอรมนี ต่อมาในปี ค.ศ. 1953 Christopher Hannay ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบีทีในระยะที่กำลังสร้างสปอร์และพบโครงสร้างอย่างหนึ่งในเซลล์คือ parasporal body และได้ให้ข้อสังเกตว่าโครงสร้างที่พบน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของแมลง



ภาพที่ 2.5 *Bacillus thuringiens*
ที่มาภาพ : Hollensteiner, *et. al.* (2017)

3.ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีจำหน่ายในท้องตลาดแบบต่างๆ

ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบเชื้อสด

ผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบเชื้อสด เป็นผลิตภัณฑ์ที่บรรจุเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตพร้อมกับสารอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ในรูปแบบนี้ไปใช้งานเชื้อจุลินทรีย์จะสามารถควบคุมโรคพืชได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว

ผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบเชื้อสดเกษตรกรสามารถผลิตได้ด้วยตนเอง เนื่องจากขั้นตอนในการผลิตไม่สับซ้อนและอุปกรณ์ที่ใช้สามารถหาได้ทั่วไป เช่น การผลิตเชื้อจุลินทรีย์สดด้วยข้าวสุกที่สามารถศึกษาได้โดยทั่วไปในอินเตอร์เน็ต และทางหน่วยงานราชการได้มีเปิดสอนให้กับเกษตรกรที่มีความสนใจอยู่เป็นประจำและมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณภาพที่มีขายในท้องตลาดขนาด 20 กรัม (ประมาณ 200 บาท) สามารถผลิตเชื้อจุลินทรีย์สดได้มากถึง 15 กิโลกรัม ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สด 1 กิโลกรัม เมื่อนำมากรองจะสามารถนำไปผสมน้ำได้มากถึง 100 ลิตร เพื่อนำไปฉีดพ่นหรือรดลงในดินแปลงเพาะปลูก

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบเชื้อสดมีข้อจำกัด คือมีระยะเวลาในการเก็บรักษาที่สั้น หลังการขยายเชื้อจุลินทรีย์ได้ 7 วัน หากใช้ไม่หมดจะสามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำได้เพียง 7-15 วันเท่านั้น แต่หากไม่เก็บในในอุณหภูมิต่ำ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้งานได้จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากความไม่สะดวกในการเก็บรักษา จึงทำให้เกษตรกรมีความกังวนที่จะนำเชื้อไปเก็บในตู้เย็นให้ปนกับอาหาร

เมื่อต้องการใช้เชื้อจุลินทรีย์สดต้องวางแผนการผลิตให้ดีจึงทำให้เสียเวลา ซึ่งไม่สะดวกเท่าที่ควรเนื่องจากสถานที่ในการผลิตต้องเหมาะสมต่อการขยายเชื้อจุลินทรีย์สด ส่งผลให้เกษตรกรบางท่านไม่มีพื้นที่และเครื่องมือในการขยายเชื้อจุลินทรีย์สดให้บริสุทธิ์ได้

ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบชนิดผง (ผงสปอร์แห้ง)

ลักษณะเชื้อราในรูปผงสปอร์แห้ง สามารถใช้ผสมน้ำตามอัตราส่วนแนะนำฉีดพ่นลงแปลงปลูก ใช้ผสมปุ๋ยหมักปุ๋ยคอก แล้วหว่านลงแปลงปลูก ใช้ผสมดินปลูก ดินเพาะเมล็ด เพื่อป้องกันและกำจัดเชื้อราก่อโรคในดิน

ผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบชนิดผงมีข้อดี คือ มีความสะดวกในการใช้งาน เชื้อในรูปผงสามารถผสมน้ำแล้วฉีดพ่นหรือนำไปใช้ได้ทันที ต่างจากผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบเชื้อสดที่ต้องนำมากรองเอาเชื้อก่อนจึงนำไปใช้งานได้

อย่างไรก็ตามเชื้อราในรูปผงสปอร์แห้งยังมีข้อจำกัด คือ ต้องรอให้เชื้อเจริญก่อนถึงจะสามารถทำงานได้ แตกต่างจากเชื้อสดที่กรองแล้วสามารถนำไปใช้งานได้ทันที เนื่องจากต้องใช้เวลาประมาณ 2 วัน สปอร์จึงจะเจริญพร้อมที่จะใช้งาน แต่น้ำที่กรองได้จากการขยายเชื้อสดนั้นมีสารที่เชื้อราได้ผลิตออกมาซึ่งมีอยู่ในน้ำที่ใช้ล้างเชื้อสด สารนั้นสามารถควบคุมเชื้อราได้ทันที และยังช่วยเร่งการเติบโตให้กับพืช เชื้อชนิดผงที่ไม่เติมสารยืดอายุเชื้อ

(สารที่ช่วยรักษาสปอร์ให้มีอายุอยู่ได้นานขึ้น) เมื่อนำมาใช้จึงไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร เนื่องจากมีสปอร์ที่สามารถเจริญได้อยู่น้อยมาก

ดังนั้นการเลือกซื้อเชื้อแบบผง จึงต้องตรวจสอบด้วยว่ามีกระบวนการผลิตแบบใด ถ้าเป็นการเลี้ยงขยายเชื้อบนธัญพืชแล้วนำมาบดโดยไม่มีขั้นตอนของการเติมสารยืดอายุเชื้อ โดยปรกติแล้วเชื้อ 1 เดือนหลังการผลิตเชื้อที่อยู่ในบรรจุภัณฑ์จะเหลือเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่น้อยมาก วันที่ผลิตนั้นจึงสำคัญมากในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ชนิดผง เพราะเชื้อราเป็นสารชีวภัณฑ์นั่นหมายความว่า เชื้อยังมีชีวิต จากงานวิจัยพบว่าเชื้อราที่ผ่านขั้นตอนเติมสารช่วยยื้ออายุจะเก็บได้นานที่สุดประมาณ 1 ปี

ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพแบบชนิดน้ำ

ลักษณะของผลิตภัณฑ์ เป็นเชื้อราสำเร็จรูปแบบน้ำ สามารถนำมาผสมน้ำแล้วรดหรือฉีดพ่นได้ทันที ในปัจจุบันสามารถหาซื้อได้ทั่วไป แต่สิ่งที่ต้องคำนึงเกี่ยวกับเชื้อชนิดน้ำเหมือนกับเชื้อแบบผง นั่นคืออายุของเชื้อและขั้นตอนการผลิตนั้นสำคัญมาก เพราะเมื่อผลิตแล้วเก็บไว้นานมากเท่าไร ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ก็ยิ่งลดลง (ระยะเวลาการเก็บรักษาจะอยู่ได้นานหรือไม่นั้นก็ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต)

ผลิตภัณฑ์แบบชนิดน้ำมีข้อดี คือ ใช้งานได้สะดวก ผสมน้ำใช้ได้ทันทีตามต้องการ เชื้อแบบชนิดน้ำที่ผลิตโดยใช้วิธีล้างเชื้อที่ขยายบนธัญพืช จะมีสารที่มีความสามารถควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการก่อให้เกิดโรคพืชอยู่ด้วยจึงสามารถมีผลในทันทีต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคพืช และยังมีสารที่ช่วยเร่งการเจริ ญเติบโตอยู่ด้วยสารนี้ช่วยให้เร่งการแตกยอด เร่งการเติบโตในพืชได้เช่นกัน
แต่มีข้อจำกัด คือ เก็บรักษาได้ไม่นาน ต้องเก็บรักษาในตู้เย็น สำหรับเชื้อที่ไม่ผ่านขั้นตอนการผลิตที่ช่วยยืดอายุของเชื้อ ต้องใช้ให้หมดหลักจากเปิดใช้งาน

ประเภทของผลิตภัณฑ์ชีวภาพทั้งแบบผงและน้ำ ต่างก็มีข้อจำกัดเหมือนกัน นั่นคือ คุณภาพของเชื้อที่ขึ้นอยู่กับคุณภาพของวิธีที่ผลิต การผลิตเชื้อที่ไม่ผ่านการยืดอายุเชื้อ ผลิตภัณฑ์ลักษณะนี้ วันที่ผลิตสำคัญมาก เพราะมีผลต่อคุณภาพของเชื้อโดยตรง มีงานวิจัยเรื่อง อายุของเชื้อราที่มีขายในท้องตลาด พบว่า ส่วนใหญ่มีเชื้อที่ใช้งานได้น้อย ดังนันเมื่อเกษตรกรนำไปใช้ จึงได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร (Bio Green, 2020)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
2. ปิเปต ขนาดต่างๆ
3.ขวดบรรจุภัณฑ์ แบบขวดแก้ว
4. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 °C สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและความดัน
6. ตู้ปลอดเชื้อ
7. เครื่องวัดความชื้น

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth
2. LB broth เจือจาง 5 เท่า
3. LB Agar
4. PDA
5. ข้าวหุงสุกพันธุ์เจ็กเชยเสาไห้
6. Normal Saline Solution (NSS)
7. 0.1M sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8
8. 0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8
9. น้ำกลั่น

จุลินทรีย์

1.แบคทีเรีย

1.1. *Bacillus amyloliquefaciens*

1.2. *Bacillus thuringiensis*

2.เชื้อรา

2.1. *Trichoderma harzianum*

2.2. *Beauveria bassiana*

2.3. *Metarhizium anisopliae*

การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย และการทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียในอาหาร

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหาร LB Agar ให้เชื้อขึ้นเต็ม จากนั้นนำเชื้อมา streak plate ให้ได้เชื้อบริสุทธ์ จากนั้นเขี่ยเชื้อลงไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหาร LB Broth นำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 °C 24 ชม.จากนั้น ปิเปตเชื้อ 100 ไมโครลิตร จากขวดอาหาร LB Broth ไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารที่ต้องการทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียทั้งหมด 6 ชนิด ดังนี้

1. LB broth
2. LB broth เจือจาง 5 เท่า
3. Normal Saline Solution (NSS)
4. 0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8
5. 0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8
6. น้ำกลั่น

จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 °C 24 ชม. จากนั้นนำเชื้อจากขวดอาหารมา streak plate เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ ทุกๆ 7 วัน ทำทุกขั้นตอนกับเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด (*Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus thuringiensis*) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

การเตรียมเชื้อรา และการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อราในบรรจุภัณฑ์

การเตรียมเชื้อรา

เตรียมเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Trichoderma harzianum , Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* โดยการนำเชื้อแต่ละชนิดเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA จนเชื้อขึ้นเต็มจากนั้นจึงนำไปใช้ในการทดลอง

การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อรา

การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยการนำข้าวสารพันธุ์เจ๊กเชยเสาไห้ บรรจุในขวดแก้วแบนขนาด 190 ml. เติมน้ำลงไปจนถึงอัตราส่วนที่ต้องการ จากนั้นนำขวดอาหารไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำข้าวที่นึ่งเสร็จแล้วมาวัดความชื้น การเตรียมขวดอาหารแบ่งเป็น 3 ชุด ที่มีอัตราส่วนของข้าวและน้ำแตกต่างกัน ดังนี้

ชุดที่ 1. ข้าวสาร 25 กรัม ต่อน้ำ 24 กรัม

ชุดที่ 2. ข้าวสาร 25 กรัม ต่อน้ำ 21 กรัม

ชุดที่ 3. ข้าวสาร 25 กรัม ต่อน้ำ 18 กรัม

การทดสอบการเก็บรักษาเชื้อราในบรรจุภัณฑ์

ทดสอบกับเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Trichoderma harzianum , Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* นำเชื้อราที่เตรียมไว้ลงเพาะเลี้ยงในขวดอาหารโดยการตัดชิ้นวุ้นอาหารที่มีเชื้อราขึ้นอยู่ใส่ลงไปในขวดอาหารด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำขวดเชื้อราไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในห้องที่มีแสงสว่างส่องทั่วถึง

การตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อราที่ผ่านการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์

ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Trichoderma harzianum , Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ที่ผ่านการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ โดยการสังเกตการณ์สร้างสปอร์ของเชื้อราทุกๆ 7 วัน

บทที่ 4
ผลการทดลอง และการอภิปราย

ในการทดลองนี้ใช้จุลินทรีย์ทั้งหมด 2 ประเภท ตารางที่ 4.1 การทดลองได้แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยการประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด ในชุดการทดลองที่ 1 ได้นำข้าวสารไปบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วชนิดขวดแบนและนำไปหุงในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปเป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อประเภทที่ 1 การประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด ในชุดการทดลองที่ 2 ได้เตรียมอาหารเหลว 6 ชนิด เพื่อเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย

ผลการประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด

การประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด ในชุดการทดลองที่ 1

การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อราที่ถูกเลี้ยงในขวดแก้วแบน ณ อุณหภูมิห้อง ที่มีความชื้นที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ชนิด สามรถมีชีวิตอยู่รอดได้ในอุณหภูมิห้องได้มากว่าเวลา 3 เดือน(ตารางที่ 4.2) โดยการสร้างสปอร์ขึ้นมาใหม่อยู่ตลอดเวลา จากการศึกษาพบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 1 เชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วที่สุด ส่วนเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* และเชื้อรา *Beauveria bassiana* จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 3 จาการทดลองยังพบว่าการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 ชนิดในขวดแก้วเชื้อราจะเจริญเติบโตได้ดีที่บริเวณผิวนอกเนื่องจากเป็นบริเวณที่เมล็ดข้าวไม่อัดกันแน่นและยังเป็นบริเวณที่มีช่องว่างของอากาศ เชื้อราจึงสามารถสร้างเส้นใสในบริเวณนี้ได้ ซึ้งตรงกันข้ามกับบริเวณที่เมล็ดข้าวทับกันหนาแนน เชื้อรามีการสร้างเย็นใยที่น้อยเนื่องจาก บริเวณที่มีความหนาแน่นทำให้ไม่มีช่องว่างให้เชื้อราสร้างเส้นใย และยังเป็นบริเวณที่มีอากาศอยู่น้อยจึงไม่เหมาะแก่การมีชีวิตของเชื้อรา

การประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์จุลินทรีย์สด ในชุดการทดลองที่ 2

การศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวต่างชนิดกัน ณ อุณหภูมิห้อง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในอาหารเหลวทั้ง 6 ชนิด ณ อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลามากที่สุด 2 สัปดาห์ โดยสัปดาห์ที่ 3 เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดไปตรวจสอบการมีชีวิตรอด พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด(ตารางที่ 4.3)

ตาราง 4.1 ชื่อของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ที่	ประเภท	ชื่อ
1	เชื้อรา	*Trichoderma harzianum*
		Metarhizium anisopliae
		Beauveria bassiana
2	แบคทีเรีย	*Bacillus amyloliquefaciens*
		Bacillus thuringiensis

ตาราง 4.2 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง

เชื้อรา	อัตราส่วนข้าว:น้ำ g	ความชื้นเฉลี่ยของอาหาร %	ระยะเวลาที่เชื้อรามีชีวิตรอด (สัปดาห์)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Trichoderma harzianum	25:18	26.87	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	25:21	25.63	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	25:24	38.98	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Metarhizium anisopliae	25:18	26.87	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	25:21	25.63	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	25:24	38.98	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Beauveria bassiana	25:18	26.87	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	25:21	25.63	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	25:24	38.98	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

หมายเหตุ ✓ หมายถึงเชื้อรายังมีชีวิตรอด และ - หมายถึงเชื้อราไม่มีชีวิตรอด

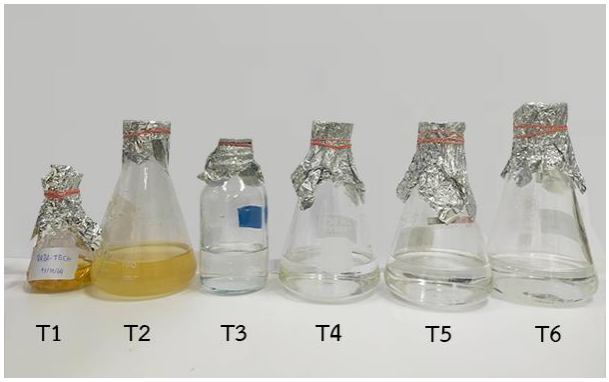
ตารางที่ 4.3 การศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด ณ อุณหภูมิห้อง

แบคทีเรีย	**ประเภทของอาหาร**	**ระยะเวลาที่แบคทีเรียมีชีวิตรอด**		
		สัปดาห์ที่ 1	**สัปดาห์ที่ 2**	**สัปดาห์ที่ 3**
Bacillus amyloliquefaciens	LB broth	✓	✓	-
	LB broth เจือจาง 5 เท่า	✓	✓	-
	Normal Saline Solution (NSS)	✓	✓	-
	0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8	✓	✓	-
	0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8	✓	✓	-
	น้ำกลั่น	✓	✓	-
Bacillus thuringiensis	LB broth	✓	✓	-
	LB broth เจือจาง 5 เท่า	✓	✓	-
	Normal Saline Solution (NSS)	✓	✓	-
	0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8	✓	✓	-
	0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8	✓	✓	-
	น้ำกลั่น	✓	✓	-

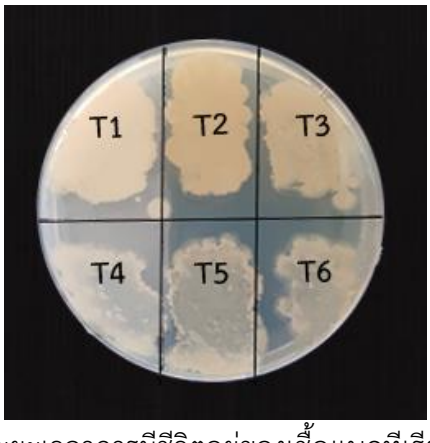
หมายเหตุ ✓ หมายถึงแบคทีเรียยังมีชีวิตรอด และ – หมายถึงแบคทีเรียไม่มีชีวิตรอด

ก ข ค

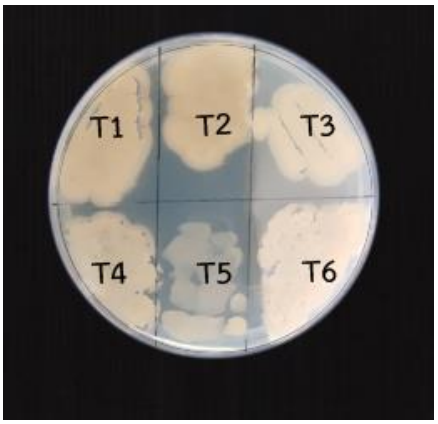
ภาพประกอบ 4.1 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ณ อุณหภูมิห้อง
(ก) *Trichoderma harzianum* , (ข) *Metarhizium anisopliae* ,
(ค) *Beauveria bassiana*



ภาพประกอบ 4.2 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ LB broth (T1), LB broth เจือจาง 5 เท่า (T2), Normal Saline Solution (NSS) (T3), 0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8 (T4), 0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8 (T5) และ น้ำกลั่น (T6) ณ อุณหภูมิห้อง



ภาพประกอบ 4.3 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด ได้แก่LB broth (T1), LB broth เจือจาง 5 เท่า (T2), Normal Saline Solution (NSS) (T3), 0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8 (T4), 0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8 (T5) และ น้ำกลั่น (T6) ณ อุณหภูมิห้อง



ภาพประกอบ 4.4 การศึกระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด ได้แก่LB broth (T1), LB broth เจือจาง 5 เท่า (T2), Normal Saline Solution (NSS) (T3), 0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8 (T4), 0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8 (T5) และ น้ำกลั่น (T6) ณ อุณหภูมิห้อง

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการประเมินคุณภาพบรรจุภัณฑ์ เพื่อศึกษารูปแบบบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์สด และศึกษาระยะเวลาที่เชื้อสามารถมีชีวิตได้ในบรรจุภัณฑ์ ที่อุณหภูมิห้อง ได้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการวิทยาศาศตร์ โดยได้แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 ได้ศึกษาเชื้อรา *Trichoderma harzianum* *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วชนิดขวดแบนที่มีความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน และการทดลองชุดที่ 2 ได้ศึกษา *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus thuringiensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว จำนวน 6 ชนิด ซึ่งได้แก่ 1. LB broth, 2. LB broth เจือจาง 5 เท่า, 3. Normal Saline Solution (NSS), 4. 0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8, 5. 0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8 และ 6. น้ำกลั่น

การศึกษาชุดการทดลองที่ 1 พบกว่า เชื้อราทั้ง 3 ชนิดสามารถเจริญเติบโตในขวดแก้วแบน ณ อุณหภูมิห้อง ที่มีความชื้นของอาหารอยู่ที่ 26.873 % 25.628 % และ 38.982 % ตามลำดับ และไม่มีการบนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเกิดขึ้น เป็นระยะ 3 เดือน และการทดลองชุดที่ 2 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวได้ทุกชนิด โดยไม่มีการบนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า เชื้อราที่เลี้ยงในขวดแก้วแบนด้วยเทคนิคปลอดเชื้อสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ณ อุณหภูมิห้องโดยไม่มีเชื้อราชนิดอื่นปนเปื้อนได้เป็นระยะเวลา 3 เดือน ส่วนอาหารเหลวทั้ง 6 ชนิด สามารถนำมาเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus thuringiensis* ได้ โดยแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยอาหารที่เหมาะและใช้ต้นทุนต่ำที่สุดได้แก่ น้ำกลั่น

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองที่ได้จะสามรถนำไปประยุกต์ในกระบวนการออกแบบผลิตภัณฑ์ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อยับยังการเกิดโรคพืชที่มีคุณภาพและสามารถมีชีวิตรอดได้ในบรรจุภัณฑ์เป็นระยะเวลาที่นานขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Abdel-Fattah, M.G., Shabana, M.Y., Ismail, E.A. & Rashad, M.Y., (2007). ***Trichoderma harzianum*** : a biocontrol agent against Bipolaris oryzae. Mycopathologia, 164, 81-89.

Ajilogba, C.F., Babalola, OO., and Ahmad, F., (2013). **Antagonistic effects of Bacillus species in biocontrol of tomato Fusarium wilt**. Ethno Medicine. 7(3): 205-216.

Benitez, T., Rincon, M.A., Limon, M.C. & Codon, C.A., (2004). **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains**. International microbiology, 7(4), 249-260.

Bio Green. (2020). **ไตรโคเดอร์มาแบบผง ชนิดน้ำและไตรโคเดอร์มาชนิดเชื้อสด ข้อดี ข้อเสีย เลือกอย่างไรได้ของคุณภาพ.** Retrieved 26 กุมภาพันธ์ 2565, from https://kasetlove.com/trichoderma-type/

Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., & Ferre, J., (2016). **Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria**. Microbiol Mol Biol Rev, 80(2), 329-350. doi:10.1128/MMBR.00060-15

Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., and Borriss, R., (2009). **Deification and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease**. Journal of Biotech. 140(1-2): 38-44. Fungal Diversity, 38, 25-50.

Gotor-Vila, A., Teixido, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., and Mari, M., (2017). **Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry**. Food Microbiology. 64: 219225.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M., (2004). ***Trichoderma* species opportunistic,avirulent plant symbionts**. Nature Reviews Microbiology, 2, 43-56.

Hollensteiner, Jacqueline & Poehlein, Anja & Spröer, Cathrin & Bunk, Boyke & Sheppard, Anna & Rosentstiel, Philip & Schulenburg, Hinrich & Liesegang, Heiko. (2017). **Complete Genome sequence of the nematicidal Bacillus thuringiensis MYBT18246**. Standards in Genomic Sciences. 12. 48. 10.1186/s40793-017-0259-x.

Jang, Seokyoon & Kwon, Sun Lul & Lee, Hanbyul & Jang, Yeongseon & Park, Myung Soo & Lim, Young Woon & Kim, Changmu & Kim, Jae-Jin. (2018). **New Report of Three Unrecorded Species in *Trichoderma harzianum* Species Complex in Korea**. Mycobiology. 46. 1-8. 10.1080/12298093.2018.1497792.

Jaronski , S. (2013). **Grasshoppers (*Melanoplus sp.)* killed by the fungus *Beauveria bassiana***. Agricultural Research Service, the research agency of the United States Department of Agriculture.

Kaewchai, S., Soytong, K. & Hyde, K.D., (2009). **Mycofungicides and fungal biofertilizers**. Fungal Diversity, 38, 25-50.

Kershaw, M.J., E.R. Moorhouse, R. Bateman, S.E. Reynolds and A.K. charnley., (1999). **The role of destruxins in pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect**. J. Invertebr. Pathol. 74: 213-223.

Lezama-Gutiérrez , R., A. Trujilo-De la Luz, J. Molina-Ochoa, O. Rebolledo Dominguez, A.R. Pescador, M. López-Edwards and M. Aluja., (2000). **Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on Anastrepha ludens (Diptera: Tephritidae): Laboratory and Field Trials**. J. Econ. Entomol. 93: 1080-1084.

Mohammed Ibrahim Elbashir Ali. (2014). **Investigation of Entomopathogenic Fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*) for Control of Bactrocera dorsalis (Hendel) (Diptera: Tephritidae), and Development of Formulation**. Doctor of Philosophy in Emtomology. 2014.

Prihanto, Asep & Nurdiani, Rahmi & Muyasharoh, Hidayatun & Afifah, Jauharotul. (2020). **Identification of Protease-Producing Halophilic Bacteria Isolated from Salt-Pond Soil**. Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan. 12. 181. 10.20473/jipk.v12i1.14725.

Qiang Gao, Kai Jin, Sheng-Hua Ying, Yongjun Zhang, Guohua Xiao, Yanfang Shang, Zhibing Duan, Xiao Hu, Xue-Qin Xie, Gang Zhou, Guoxiong Peng, Zhibing Luo, Wei Huang, Bing Wang, Weiguo Fang, Sibao Wang, Yi Zhong,Li-Jun Ma, Raymond J. St. Leger, Guo-Ping Zhao, Yan Pei, Ming-Guang Feng, Yuxian Xia, Chengshu Wang. (2011). **Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and M. acridum**. PLOS Genetics 7(1): e1001264. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264

Rosa, W. DE LA, R. Alatorre, J.F. Barrera and C. Toriello., (2000). **Effect of *Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions**. J. Econ. Entomol. 93: 1409-1414.

Sansinenea, E., (2012). **Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis***. In (pp. 3-18).

Schepf E., Crickmore, N. Van Rie, J. Lereclus, D. Baum, J. Feitelson, J. Zeigler, D.R. & Dean, D.H., (1998). ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crytal proteins Microbiol**. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806.

Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., and Xu, Y., (2013). **Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing Ralstonia solanacearum and promoting tomato plant growth**. Crop Protection.43: 134-140.

Tang, W., Yang, H. & Ryder, M., (2001). **Research and Application of *Trichoderma spp.* In Biological Control of Plant Pathogens. In: Bio-Exploitation of Filamentous Fungi (eds.Pointing, S.B. and Hyde, K.D.)**, Fungal Diversity Research Series, 6, 403-435.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., & Lorito, M., (2008). **Trichoderma plant pathogen interactions**.Soil Biology & Biochemistry, 40,1-10.

Wang, J., Zhang, Y., Zhang, C., Lu, J., Quan, C., (2017). **Effect of the environmental factors on diketopiperazine cyclo (Pro-Phe) production and antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426**. Annals of Biological Sciences. 5(1): 47-53.

Zeilinger, S. & Omann, M. (2007). ***Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction PathwaysInvolved in Host Sensing and Mycoparasitism**. Gene Regulation and Systems Biology, 1, 227-234.

เกศิณี แก้วมาลา และสมบัติ ศรีชูวงศ์. (2552). ประสิทธิผลของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma spp*. ต่อการควบคุมแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองในระยะต้นอ่อน. วารสารเกษตร, 25(3), 229-236.

เกศินี จันทรโสภณ. (2561). การใช้เชื้อ Bacillus amyloliquefaciens KJ720206 จากทางเดินอาหารปลานิลต่อเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำและโรคแคงเกอร์ The use of *Bacillus amyloliquefaciens KJ720206* from gastro-intestinal tract of Nile tilapia on fish pathogens and canker disease.//วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 12(2), 23. สืบค้นจาก http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/Journal_FT_Attach/AbstractFile/P21-30-V12-2-Y2561.pdf วันที่สืบค้น 22 กุมภาพันธ์ 2565.

เกษม สร้อยทอง. (2551). **เทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.** พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 213 หน้า.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ อิศเรส เทียนทัด และวิไลวรรณ เวชยันต์. (2556). การคัดเลือกและพัฒนาการเลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรีย(white muscardine fungus); *Beauveria bassiana* (Balsamo) เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช Selection and development on techniques for mass production of white muscadine fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) to control insect pests. (รายงานผลการวิจัย).กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ อิศเรส เทียนทัด และวิไลวรรณ เวชยันต์ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา (2556). การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม; *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin เพื่อป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก; Phyllotreta sinuata (Stephens) Efficacy Test of a Green Muscadine Fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin to Control Phyllotreta sinuata (Stephens).(รายงานผลการวิจัย).กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กนกพร ศรีสุจริตพานิช. (2562). การประเมินความปลอดภัยของโปรตีน Vip3Aa Biosafety assessment of Vip3Aa (รายงานผลการวิจัย).

จิระเดช แจ่มสว่าง. (2547). **การควบคุมโรคผักโดยชีววิธี.** เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตรการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีในการปลูกผักระบบไม่ใช้ดินและภายในโรงเรือน จัดโดย สำานักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.) (ชุดโครงการ-การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน) และคณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2547 ณ. อาคารเจ้าคุณทหารคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.ธรรมศาสตร์. 213 หน้า.

ประพฤติ อำขำ, พัฒน์ โกจินอก. (2563). การวิจัยและพัฒนาการผลิตเชื้อราแบบผงจากวัสดุในท้องถิ่นเพื่อใช้ประโยชน์ในระบบเกษตรอินทรีย์ Research and Development of Simplicity Production of Fungal Spores Power by Local Materials for use in Organic Agriculture Benefit.

วาสนา ฤทธิ์ไธสง วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และชวลิต ฮงประยูร. (2548). การควบคุมโรคเน่าระดับดินและโรครากเน่าของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา Pythium aphanidermatum ด้วยการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma spp*. ร่วมกับธาตุแคลเซียมและซิลิกอน. วิทยาสารกำแพงแสน, 3(1),8-17.

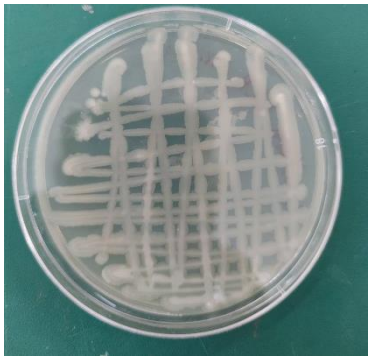
สังวร สุขสามัคคี พิสิฐศักดิ์ ทัศศิริ และเกตุอร ทองเครือ. (2540). การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคเหี่ยวของพริก .แผ่นปลิวเผยแพร่ที่ 119. กรมส่งเสริมการเกษตรชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

สายทอง แก้วฉาย Ph.D. (2555). การใช้ไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช Application Of *Trichoderma spp*. for Plant Disease Control. Princess of Naradhiwas University Journal, 4(3), 109.สืบค้นจากhttps://li01.tcithaijo.org/index.php/pnujr/article/view/53748/44582 วันที่สืบค้น 22 กุมภาพันธ์ 2565.

ภาคผนวก ก

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

Bacillus thuringiensis



Bacillus thuringiensis

Bacillus amyloliquefaciens

การเตรียมหัวเชื้อรา

ตัดชิ้นวุ้นเชื้อราถ่ายลง plate อาหาร

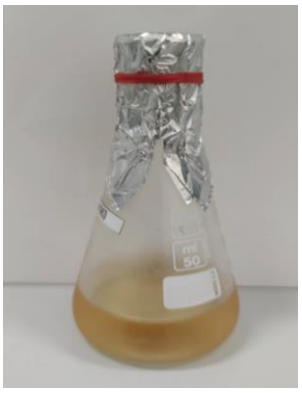
Beauveria bassiana

Trichoderma harzianum

Metarhizium anisopliae

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ Subculture

LB Agar

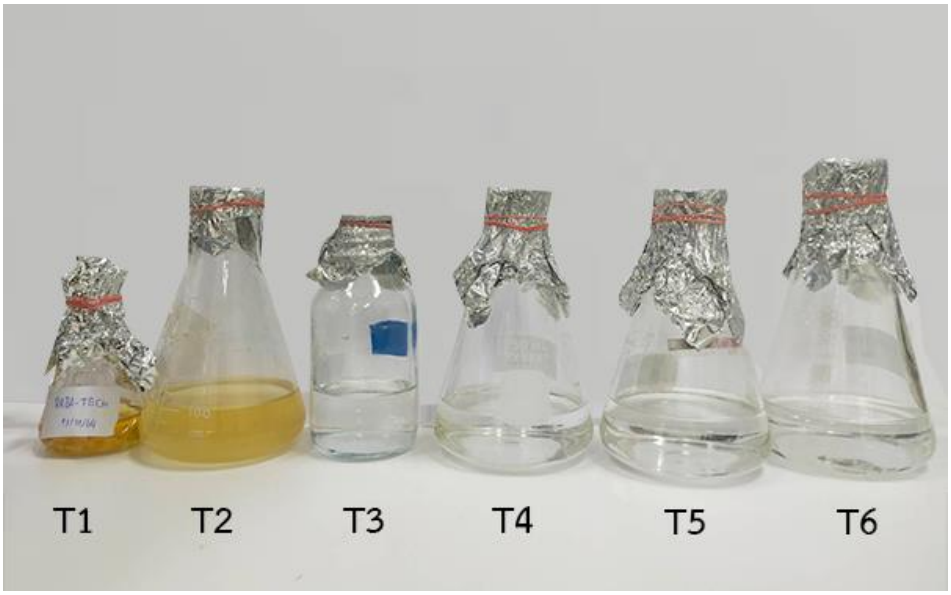


LB Agar broth

PDA

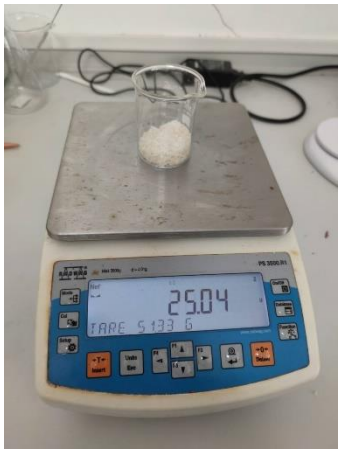
การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

อาหารสำหรับทดสอบเชื้อแบคทีเรีย



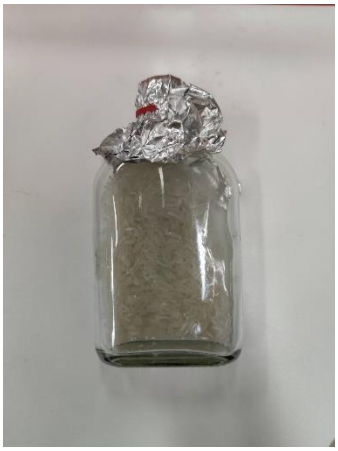
LB broth (T1), LB broth เจือจาง 5 เท่า (T2), Normal Suline Solution (NSS) (T3), 0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH 6.8 (T4), 0.1M Potassium Phosphate Buffer (KPB) pH 6.8 (T5) , น้ำกลั่น (T6)

อาหารสำหรับทดสอบเชื้อรา



ตวงข้าว

ตวงน้ำ



บรรจุข้าวและน้ำใส่ขวด วางในแนวนอน

นำขวดอาหารมานึ่งฆ่าเชื้อ

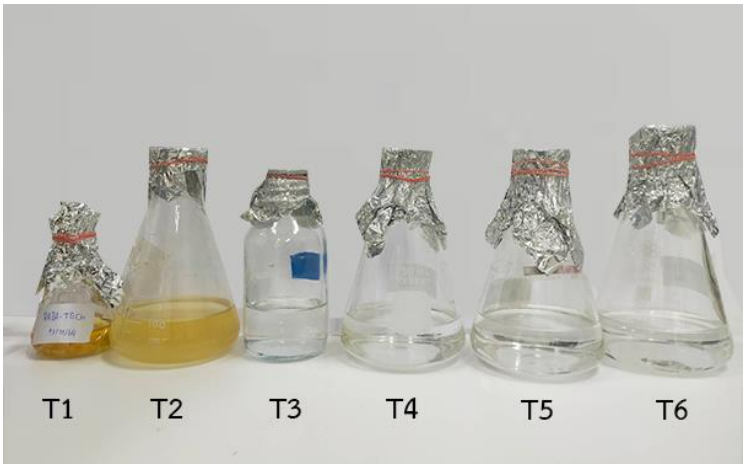
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและแรงดัน

ภาคผนวก ข

การถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การถ่ายเชื้อแบคทีเรีย

ปิเปตหัวเชื้อแบคทีเรียใส่ขวดอาหาร



ขวดอาหาร 6 ชนิด

การถ่ายเชื้อแบคทีเรีย

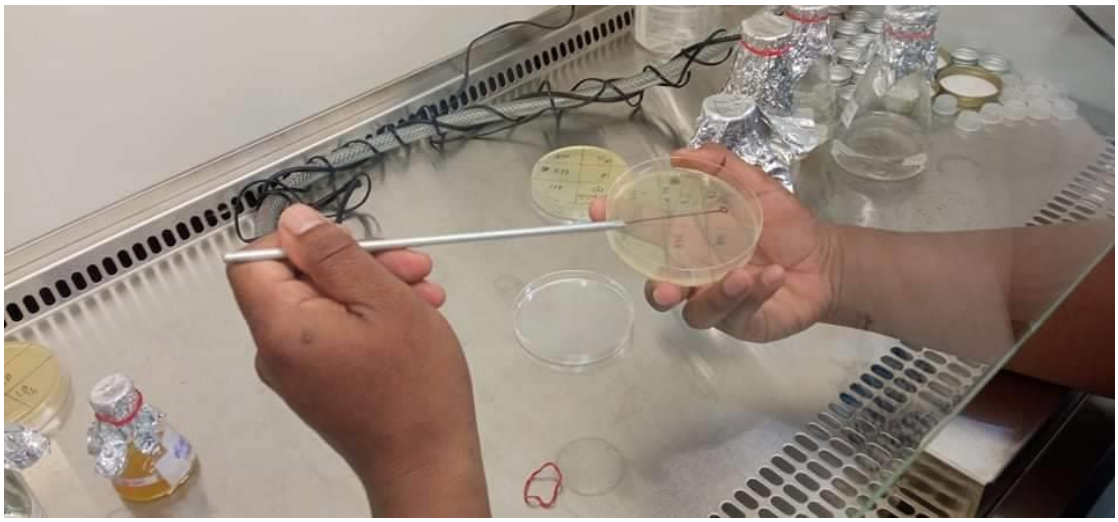
ตัดชิ้นวุ้นเชื้อราใส่ขวดอาหาร

ขวดอาหารที่ใส่ชิ้นวุ้นเชื้อราแต่ละชนิด

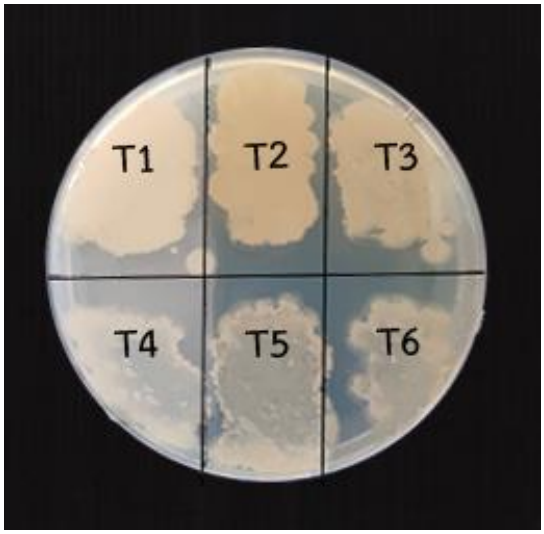
ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

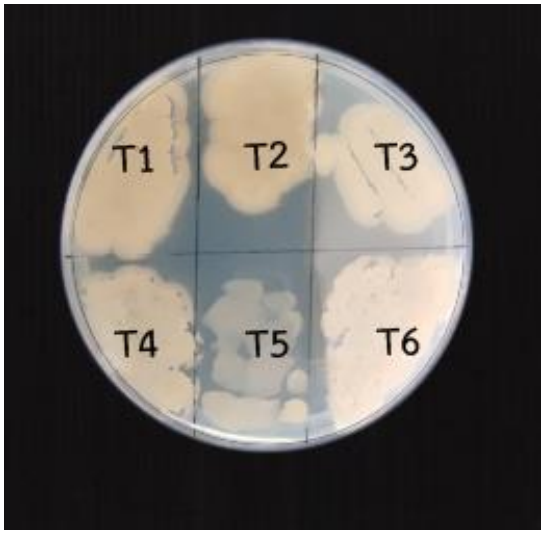
การทดสอบการมีชีวิตของแบคทีเรีย



Streak plate



Bacillus amyloliquefaciens



Bacillus thuringiensis

การทดสอบการมีชีวิตของเชื้อรา

Trichoderma

Beauveria bassiana

Metarhizium anisopliae

ประวัติการศึกษา

ชื่อ-สกุล นายณัฐพงษ์ ใยยอง

วัน เดือน ปีเกิด 6 ตุลาคม 2542

ภูมิลำเนา 141/1หมู่ 6 บ้านหนองแวง ตำบลโนนเจริญ อำเภอบ้านกรวด จังหวัดบุรีรัมย์ รหัสไปรษณีย์ 31180

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	**สถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
ระดับประถมศึกษา	โรงเรียนบ้านหนวงแวง	พ.ศ.2554
ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนโนนเจริญพิทยาคม	พ.ศ.2557
ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนโนนเจริญพิทยาคม	พ.ศ.2560
ระดับอุดมศึกษา	มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์	พ.ศ.2561-ปัจจุบัน

ชื่อ-สกุล นายจักรกฤษณ์ เที่ยงธรรม

วัน เดือน ปีเกิด 2 มกราคม 2542

ภูมิลำเนา 17 หมู่ 14 บ้านโคกลอย ตำบลไทยเจริญ อำเภอปะคำ จังหวัดบุรีรัมย์ รหัสไปรษณีย์ 31220

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	**สถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
ระดับประถมศึกษา	โรงเรียนบ้านโคกลอย	พ.ศ.2554
ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนนางรอง	พ.ศ.2557
ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนนางรอง	พ.ศ.2560
ระดับอุดมศึกษา	มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์	พ.ศ.2561-ปัจจุบัน

ชื่อ-สกุล นายสุรชัย กทิศาสตร์

วัน เดือน ปีเกิด 16 กรกฎาคม 2542

ภูมิลำเนา 153 หมู่ 1 บ้านนาสวน ตำบลช่างปี่ อำเภอศีขรภูมิ จังหวัดสุรินทร์ รหัสไปรษณีย์ 32110

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	**สถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
ระดับประถมศึกษา	โรงเรียนบ้านตะคร้อ	พ.ศ.2554
ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนบ้านช่างปี่	พ.ศ.2557
ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนรามวิทยา รัชมังคลาภิเษก	พ.ศ.2560
ระดับอุดมศึกษา	มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์	พ.ศ.2561-ปัจจุบัน