การเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษา *STREPTOMYCES* TM32 เพื่อพัฒนาเป็นสูตรชีวภัณฑ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในดิน

COMPARING METHODS FOR THE PRESERVATION OF *STREPTOMYCES* TM32 TO DEVELOP IT INTO A BIOLOGICAL PRODUCT FOR INHIBITING SOIL-BORNE PLANT PATHOGENS

นารีลักษณ์ นาแก้ว[1,4]* ชุตาภรณ์ เม่นเกิด[1] นภัสวรรณ ปัญญาสา[1] ประภัสสร จอมงาม[1]
บุญเรือง คำศรี[1,4] จวงจันทร์ จำปาทอง[2,4] และไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน[3]
Nareeluk Nakaew[1]*, Chutapom Mengerd[1], Napatsawan Panyasa[1], Parphatson Jomngam[1],
Boonruang Khamsri[1,4], Juangjun Jumpathong[2,4] and Pairote Wongputtisin[3]

บทคัดย่อ

การป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยชีวภัณฑ์จากจุลินทรีย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตรเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีความปลอดภัย ซึ่ง *Streptomyces* TM32 สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลากหลายชนิดและสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคบริเวณรากของพืชจาก *Streptomyces* TM32 โดยเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาเชื้อเพื่อพัฒนาเป็นสูตรชีวภัณฑ์จำนวน 4 สูตร (1. ข้าวสวย, 2. แป้งสาลีและโดโลไมต์ (6:3), 3. ทัลคัมและ CMC (2:1) และ 4. แป้งข้าวเจ้า น้ำมันปาล์ม และ ซูโครส (87:3:10) อัตราส่วนปริมาตรโดยปริมาตร) และทดสอบการมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์

[1]คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
[1]Faculty of Medical Science, Naresuan University, Muang District, Phitsanulok Province 65000
[2]คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
[2]Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Muang District, Phitsanulok Province 65000
[3]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290
[3]Faculty of Science, Maejo University, Sansai District, Chiang Mai Province 50290
[4]สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเห็ดและรา มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
[4]Center of Excellence in Fungal Research, Naresuan University, Muang District, Phitsanulok Province 65000
*corresponding author e-mail: nareelukn@nu.ac.th
Received: 19 February 2024; Revised: 14 June 2024; Accepted: 16 June 2024
DOI: https://doi.org/10.14456/lsej.2024.18

ในแต่ละสูตรในสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 10 และ 35°C นาน 14 28 และ 42 วัน ผลพบว่าสูตรที่ 1 (ข้าวสวย) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 35°C นาน 14 วัน มีปริมาณเชื้อมากที่สุดเท่ากับ 6.71 ± 0.08 log CFU/g ดังนั้นจึงใช้สูตรที่ 1 ในการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อราในพืช โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 4 ชุด คือ ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ไม่มีการเติมชีวภัณฑ์ (ชุดการทดลองที่ 1) และมีการเติมชีวภัณฑ์ (ชุดการทดลองที่ 2) ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ไม่มีการเติมชีวภัณฑ์ (ชุดการทดลองที่ 3) และมีการเติมชีวภัณฑ์ (ชุดการทดลองที่ 4) ทำการทดลองในสภาวะความชื้นสัมพัทธ์ 70% อุณหภูมิ 25°C รดน้ำทุก 2 วัน เป็นเวลา 35 วัน เพื่อเปรียบเทียบอัตราการงอก ความสูงเฉลี่ยของพืช (ต้นพริก) ผลพบว่าชุดการทดลองที่ 2 มีอัตราการงอกสูงสุด (80%) แต่ความสูงเฉลี่ยของต้นพริกหลังจาก 35 วันของชุดการทดลองนี้มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป (ชุดการทดลองที่ 1 และ 3)

คำสำคัญ: ชีวภัณฑ์ การควบคุมโรคพืชด้วยชีวภาพ เชื้อราก่อโรคพืช สเตรปโตมัยสิท

Abstract

Prevention and control of pests by biological products is one option that can reduce or replace the use of agricultural chemicals to produce safe products. *Streptomyces* TM32 can inhibit various types of plant pathogenic fungi and produce substances that promote plant growth. Therefore, this research aims to develop a biological product formula to inhibit the fungal growth that causes disease on plant roots from *Streptomyces* TM32 by comparing the methods of preserving them for development into four biological product formulas (1. Cooked rice, 2. wheat flour and Dolomite (6:3), 3. Talcum and CMC (2:1) and 4. Rice flour, Palm oil and Sucrose (87:3:10) volume-by-volume ratio). The survival of biological products was tested in each formula under temperature storage conditions at 10 and 35°C for 14, 28, and 42 days with the spread plate technique. The results found that formula 1 (Cooked rice), when stored at 35°C for 14 days, had the highest amount of germs remaining, equal to 6.71 ± 0.08 log CFU/g. Therefore, formula 1 was used to test the effectiveness of biological products in inhibiting fungal growth in plants. The experimental set was divided into four sets: unsterilized soil with no added biological agents (Experimental set 1) and with biological products (Experimental set 2); sterilized soil without added biological agents (Experimental set 3) and with biological products added (Experimental set 4). The experiment was performed in a relative humidity condition of 70%, temperature of 25°C and watering every 2 days for 35 days to compare germination percentages and to

compare average height of plant (chili plant). The results showed that the second experimental set had the highest germination rate (80%). However, the average height of chili plants after 35 days in this experimental set was lower than that of the control set that had not been inoculated (Experimental sets 1 and 3).

Keywords: biological products, biological control of plant diseases, plant pathogenic fungi, *streptomyces*

บทนำ

การปนเปื้อนของสารเคมีในผลผลิตทางการเกษตรมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสารเคมีอาจส่งผลกระทบทำให้เกิดปัญหาสุขภาพต่าง ๆ ในร่างกาย แม้จะได้รับสารเคมีในเล็กน้อยก็สามารถสะสมและส่งผลกระทบต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกายได้ เช่น ระบบประสาท การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และระดับเซลล์ของร่างกาย ทำให้สุขภาพร่างกายอ่อนแอและมีความเสี่ยงต่อภาวะที่ไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ (Garvey, 2022) ผู้บริโภคในปัจจุบันมีความตื่นตัวเพิ่มขึ้นในการเลือกซื้อผลผลิตที่ปลอดสารเคมีหรือมีระดับสารพิษต่ำ ซึ่งส่งผลให้ความต้องการในอาหารที่เป็นผลผลิตจากเกษตรปลอดสารเคมีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Lernoud & Willer, 2017) นอกจากนี้ผลผลิตที่มีการปนเปื้อนสารพิษหรือสารเคมีตกค้างเกินค่ามาตรฐานความปลอดภัยทำให้ยากต่อการทำการค้ากับประเทศที่มีมาตรฐานความปลอดภัยสูง เช่น ประเทศในยุโรป ญี่ปุ่น แคนาดา และสหรัฐอเมริกา การไม่ปฏิบัติตามมาตรฐานเหล่านี้อาจทำให้ผลผลิตไม่ได้รับการยอมรับในตลาดนานาชาติ เป็นอุปสรรคในการขายสินค้า (Hu et al., 2022)

การป้องกันและกำจัดศัตรูพืชโดยใช้ชีววิธีโดยการใช้ชีวภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรีย และไวรัสเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม สามารถลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีในการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Bonaterra et al., 2022) ส่วนประกอบที่สำคัญของชีวภัณฑ์ได้แก่ 1) ส่วนผสมสำคัญ ได้แก่ เซลล์ของจุลินทรีย์ และ/หรือสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้น 2) สารพา (carrier) มักทำจากวัสดุที่ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเคมีเพื่อรองรับและปลดปล่อยส่วนผสมสำคัญสู่ตำแหน่งเป้าหมาย และ 3) สารเสริมฤทธิ์ (adjuvants) เช่น สารป้องกันเซลล์ (protectants), สารทำให้คงตัว (stabilizers), สารที่ทำให้เกาะยึด (adherents), สารลดแรงตึงผิว (surfactants), สารอาหารเพิ่มเติม เป็นต้น เพื่อรักษาส่วนผสมที่สำคัญให้สามารถทำหน้าที่ได้โดยไม่ถูกทำลายด้วยอุณหภูมิสูง การสูญเสียน้ำ และรังสีอัลตราไวโอเลต และส่งเสริมให้ส่วนผสมที่สำคัญกระจายไปยังสิ่งแวดล้อมที่ต้องการ ซึ่งสารเสริมฤทธิ์ต้องไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (Teixidó et al., 2022) จุลินทรีย์ที่นำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เพื่อให้การนำไปใช้มีประสิทธิภาพจึงต้องมีการพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่รวมอยู่ในชีวภัณฑ์มีชีวิตรอดและเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมได้ ทั้งนี้ต้องมีปริมาณเพียงพอที่จะทำให้

เกิดผลสัมผัสที่มีประสิทธิภาพในดิน นอกจากนี้ จำเป็นต้องมีรูปแบบที่สะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้งาน (Dagher et al., 2020)

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความหลากหลายและมีความสำคัญทางชีวภาพในระบบนิเวศทางดินและทางน้ำ โดยมีบทบาทที่สำคัญในการเกษตรในหลายด้าน เช่น การควบคุมศัตรูพืช ผลิตสารที่มีประโยชน์หรือช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช โดย *Streptomyces* TM32 เป็นแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด อาทิ เชื้อราก่อโรครากขาวในยางพารา (*Havea brasiliensis*) และ *Alternaria alternata* TISTR 3435 นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชอีกด้วย (Nakaew et al., 2015) จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมของ *Streptomyces* TM32 พบว่ามียีนที่สามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ได้หลากหลายชนิด (Nakaew et al., 2019) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของส่วนประกอบของสารในชีวภัณฑ์ที่มีต่อการรอดชีวิตของ *Streptomyces* TM32 และศึกษาผลของชีวภัณฑ์ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชเพื่อพัฒนาเป็นสูตรชีวภัณฑ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในดิน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* TM32

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* TM32 บนอาหาร Hickey-Tresner Agar (HT agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีและบันทึกผล จากนั้นศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อโดยใช้เทคนิคการปักสไลด์ (Inclined cover slip) ย้อมด้วยสี crystal violet แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

2. การเตรียมเชื้อตั้งต้นของ *Streptomyces* TM32 เพื่อผลิตชีวภัณฑ์

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* TM32 บนอาหาร HT agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ตัดให้เป็นชิ้นทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* project medium 2 (ISP2) โดยใช้ปริมาณเชื้อ 5 ชิ้นต่อปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่อง Shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน นำอาหารเหลวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 นาทีเพื่อแยกเซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาใส่ขวดแก้วใสปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นด้วยวิธี 10-fold serial dilution ที่ระดับความเจือจาง ที่ 10^{-3} – 10^{-7} จากนั้นนำมา spread ลงบนผิวหน้าอาหาร HT agar ความเจือจางละ 2 ซ้ำ

3. ผลของส่วนประกอบของสารในชีวภัณฑ์ที่มีต่อการรอดชีวิตของ *Streptomyces* TM32

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพขององค์ประกอบสำหรับใช้ทำชีวภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรีย *Streptomyces* TM32 โดยเปรียบเทียบทั้งสิ้น 4 สูตรดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1)

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ภายใต้ความดัน 15 lb_f/in^2 เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผสมเชื้อตั้งต้นของ *Streptomyces* TM32 ที่อยู่ในรูปแบบเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้เข้ากับองค์ประกอบแต่ละสูตร โดยกำหนดอัตราส่วนผสม 1 มิลลิลิตร : 20 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งบรรจุของผสมลงในถุงซิปล็อก (polyethylene, PE) ถุงละ 10 กรัม เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (logCFU/g) ของ *Streptomyces* TM32 ในวันที่ 0 14 28 และ 42 ด้วยเทคนิค total plate count บนอาหารแข็งสูตร HT agar ที่เติมยา cycloheximide และ nalidixic ความเข้มข้นสุดท้าย 50 μg/ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C ทั้งนี้เปรียบเทียบการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 และ 35°C และเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อประมวลผลทางสถิติ Minitab version 21 (Minitab Inc., USA)

Table 1 Components of each biological formula

Formula	Components
1	Cooked rice 500 g
2	Wheat flour 300 g, Dolomite 150 g
3	Talcum 200 g, CMC 100 g
4	Rice flour 348 g, Palm oil 12 g, Sucrose 40 g

4. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดพริกขี้หนูสวน

คัดเลือกองค์ประกอบชีวภัณฑ์ที่ส่งเสริมการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Streptomyces* TM32 มาทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพริกขี้หนูสวน โดยนำตัวอย่างดินมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ภายใต้ความดัน 15 lb_f/in^2 เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 2 วัน แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้ง จากนั้นชั่งดินน้ำหนัก 100 กรัมใส่กระถาง โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ดังนี้ ชุดที่ 1 และ 2 คือ ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ส่วนชุดการทดลองที่ 3 และ 4 คือ ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จัดชุดการทดลองดังตารางที่ 2 (Table 2) จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อโดยผสมชีวภัณฑ์ 10 กรัมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ Tween 80 ความเข้มข้นเป็น 100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร เติมสารแขวนลอยของเชื้อ 20 มิลลิลิตร ในชุดการทดลองที่ 2 และ 4 ปรับความชื้นให้เท่ากันในทุกชุดการทดลองโดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นเพาะเมล็ดพริกขี้หนูสวนที่มีการระบุอัตราการงอกเท่ากับร้อยละ 70 จำนวน 5 เมล็ดต่อชุดการทดลอง ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ นำแต่ละชุดการทดลองไปบ่มไว้ในตู้ควบคุมสภาวะแวดล้อม โดยควบคุมที่อุณหภูมิ 25°C และความชื้น 70% รดน้ำทุก 2 วัน ทำการทดลองเป็นเวลา 35 วันและบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ อัตราการงอก และ ความสูงของต้นพริก (วัดจากผิวดินจนถึงปลายยอด)

Table 2 Experimental set of efficacy of biological product formula 1 in plants

Experimental set	Non sterile soil + plant	Sterile soil + Plant	Biological product formula 1
1	✓		
2	✓		✓
3		✓	
4		✓	✓

ผลการวิจัย

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* TM32

Streptomyces TM32 ที่เพาะลี้ยงบนอาหาร HT agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน พบว่าโคโลนีมีสีขาว ลักษณะผิวด้าน มีรอยแผ่ขยายคล้ายราแต่แผ่น้อยกว่ามาก ผลการศึกษาลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นสายที่เรียกว่า arthrospore โดยมีจำนวนสปอร์มากกว่า 20 สปอร์ต่อเส้น ดังภาพที่ 1 (Figure 1)

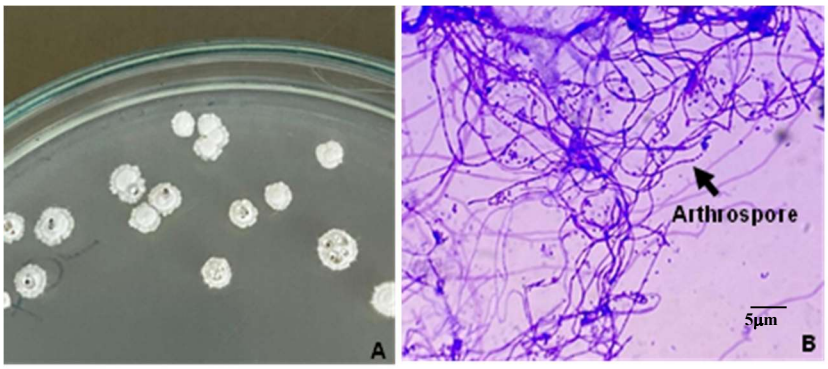

Figure 1 Morphological characteristics of *Streptomyces* TM32 when grown at 30 °C for 5 days (A) Colony appearance (B) Spore appearance

2. ปริมาณเชื้อตั้งต้นสำหรับเตรียมชีวภัณฑ์

จากการนับปริมาณเชื้อตั้งต้นโดยวิธี Spread plate พบว่าเชื้อตั้งต้นสำหรับนำไปเตรียมชีวภัณฑ์มีปริมาณเชื้อ 1.53×10^6 cfu/ml จากนั้นเติมเชื้อลงไปปริมาณ 500 ไมโครลิตร ต่อชีวภัณฑ์ 10 กรัม ดังนั้นในชีวภัณฑ์ 1 ถุงมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 7.65×10^5 เซลล์ หรือ 7.65×10^4 cfu/g (4.88 log CFU/g)

3. ผลของส่วนประกอบของสารในชีวภัณฑ์ที่มีต่อการรอดชีวิตของ *Streptomyces* TM32

จากการเตรียมชีวภัณฑ์ของ *Streptomyces* TM32 จำนวน 4 สูตร และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 และ 35°C ตามลำดับ เป็นเวลา 42 วัน ผลของการตรวจนับเชื้อ *Streptomyces* TM32

ในชีวภัณฑ์แต่ละสูตรพบว่าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C สูตรที่ 1 เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ประมาณ 1 log CFU/g ในขณะที่สูตรอื่น ๆ เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังตารางที่ 3 (Table 3) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบในชีวภัณฑ์แต่ละสูตรแล้ว พบว่าสูตรที่ 1 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Streptomyces* TM32 สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยสูงกว่าสูตรอื่น ๆ ประมาณ 1 log CFU/g ในขณะที่ผลการศึกษาเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 42 วันนั้น พบว่าให้ผลแตกต่างจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C โดยสูตร 1 และ 2 มีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตเล็กน้อย ($p<0.05$) สูตร 3 ไม่พบการรอดชีวิตของ *Streptomyces* TM32 แต่พบการเพิ่มจำนวนขึ้นของ *Streptomyces* TM32 ประมาณ 1 log CFU ในชีวภัณฑ์สูตรที่ 4 ประมาณ 1 log CFU/g อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4 (Table 4) ดังนั้นจึงพบว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 4 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Streptomyces* TM32 สูงที่สุดเมื่อเทียบกับชีวภัณฑ์ทุกสูตร ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามพบปริมาณเชื้อสูงสุดในชีวภัณฑ์สูตร 1 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 14 วัน โดยมีปริมาณเท่ากับ 6.71 ± 0.08 log CFU/g จึงได้นำสูตรที่ 1 ที่เก็บในสภาวะดังกล่าวไปทำการทดลองในต้นพริกขี้หนูสวนต่อไป

Table 3 The change of viable *Streptomyces* TM32 cells in four formulas of the biological products during the storage at 35°C

Formula	Viable cell count (log CFU/g) ± SD			
	Day 0	Day 14	Day 28	Day 42
1	4.88 ± 0.00^{aD}	6.71 ± 0.08^{aA}	5.96 ± 0.08^{aC}	6.07 ± 0.01^{aB}
2	4.88 ± 0.00^{aA}	2.79 ± 0.69^{bC}	3.73 ± 0.06^{bB}	4.90 ± 0.08^{bA}
3	4.88 ± 0.00^{aB}	0 ± 0.00^{cC}	0 ± 0.00^{cC}	4.97 ± 0.06^{bA}
4	4.88 ± 0.00^{aA}	0 ± 0.00^{cB}	0 ± 0.00^{cB}	4.84 ± 0.44^{bA}

Remark Means were calculated from triplicate samples. Different superscript of the lower-case letters indicates significant difference ($p<0.05$) between formulas at each storage time, while those of the uppercase letters indicate significant difference ($p<0.05$) between storage time of each formula.

Table 4 The change of viable *Streptomyces* TM32 cells in four formulas of the biological products during the storage at 10°C

Formula	Viable cell count (logCFU/g) ± SD			
	Day 0	Day 14	Day 28	Day 42
1	4.88 ± 0.00^{aA}	4.34 ± 0.43^{aAB}	3.87 ± 0.07^{aB}	4.26 ± 0.13^{bB}
2	4.88 ± 0.00^{aA}	3.12 ± 0.97^{aB}	3.51 ± 0.04^{aB}	3.12 ± 0.25^{cB}
3	4.88 ± 0.00^{aA}	0 ± 0.00^{bB}	0 ± 0.00^{bB}	0 ± 0.00^{dB}
4	4.88 ± 0.00^{aB}	0 ± 0.00^{bD}	3.96 ± 0.57^{aC}	5.91 ± 0.04^{aA}

Remark Means were calculated from triplicate samples. Different superscript of the lower-case letters indicates significant difference ($p<0.05$) between formulas at each storage time, while those of the uppercase letters indicate significant difference ($p<0.05$) between storage time of each formula.

4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดพลิกขี้หนูสวน

จากผลการทดลองข้อที่ 3 พบว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 14 วัน ดังนั้นจึงได้นำชีวภัณฑ์มายืนยันว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces* TM32 โดยใช้เทคนิค Cross streak บนอาหาร HT Agar และดูความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อรา ผลพบว่าในชีวภัณฑ์มี *Streptomyces* TM32 อยู่ โดยสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อและความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนในชีวภัณฑ์ ดังภาพที่ 2 (Figure 2) ผลของชีวภัณฑ์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นพริกพบว่าในชุดการทดลองที่ 2 (ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ + ชีวภัณฑ์) มีอัตราการงอกของต้นพริกมากที่สุดถึงร้อยละ 80 ดังภาพที่ 3 (Figure 3)

Figure 2 The results of the survival test of *Streptomyces* TM32 in biological product formula 1 by using the Cross streak technique on HT agar

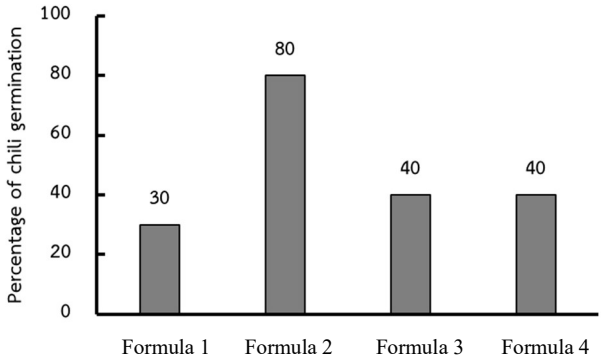

Figure 3 Percentage of chili plant germination in biological product formula 1

ผลของชีวภัณฑ์ต่อความสูงของพืชโดยวัดความสูงของต้นพริกในวันที่ 35 ในดินที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อและฆ่าเชื้อ พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 และ 3 (ดินฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อที่ไม่ได้เติมชีวภัณฑ์) มีความสูงเฉลี่ยสูงกว่าดินที่เติมชีวภัณฑ์โดยมีค่าเท่ากับ 5.0±0.2 และ 7.1 ± 2.8 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-5 (Figure 4-5)

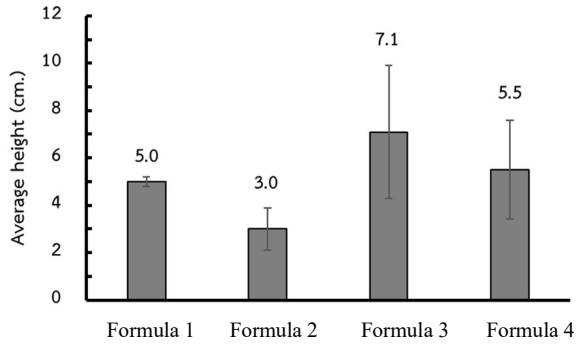

Figure 4 Average height of chili plants on day 35 of the experiment

1 **2** **3** **4**

Figure 5 Chili plants in different sets of experiments on day 35 of the experiment

อภิปรายผล

จากการพัฒนาชีวภัณฑ์จำนวน 4 สูตร โดยศึกษาผลของส่วนประกอบของสารในชีวภัณฑ์ที่มีต่อการรอดชีวิตของ *Streptomyces* TM32 พบว่าสูตรที่ 1 (ข้าวสวย) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 14 วันมีปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นและมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือสูตรที่ 4 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 42 วัน โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 6.71 ± 0.08 และ 5.91 ± 0.04 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 ซึ่งมีเพียงข้าวสวย ข้าวสวยประกอบไปด้วยอะมัยโลส (amylose) และอะมัยโลเพกติน (amylopectin) เป็นหลัก ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียสามารถย่อยสลายโดยสร้างเอนไซม์อะมัยเลสและนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Al-Dhabi et al., 2020) ทำให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนได้มากกว่าสูตรอื่น ๆ และถึงแม้ว่า สูตร 2 (แป้งสาลีและโดโลไมต์) และ 4 (แป้งข้าวเจ้า น้ำมันปาล์ม และ ซูโครส) มีแป้งซึ่งมีอะมัยโลสเป็นองค์ประกอบเช่นกันแต่อยู่ในรูปแบบเม็ดแป้ง (Starch granule) ซึ่งจุลินทรีย์นำไปใช้ได้ยากกว่าเนื่องจากเอนไซม์อะมัยเลสไม่สามารถเข้าไปทำลายพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic Bond) ได้ ยิ่งไปกว่านั้นข้าวสวยผ่านการให้ความร้อนซึ่งมีผลทำให้เกิดการเจลลาติไนซ์ (Gelatinization) เนื่องจากความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเม็ดแป้ง ทำให้เกิดการคลายตัวของอะมัยโลสและอะมัยโลเพกทินที่อัดแน่นอยู่ในเม็ดแป้งทำให้เอนไซม์อะมัยเลสเข้าไปทำลายพันธะไกลโคซิดิกได้ง่ายกว่าแป้งซึ่งไม่ผ่านความร้อน อย่างไรก็ตามสูตรที่ 4 มีซูโครสเป็นส่วนประกอบซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้ง่ายกว่าอะมัยโลส แต่เนื่องด้วยมีแป้งข้าวเจ้าเป็นองค์ประกอบอาจทำให้มีความชื้นต่ำกว่าสูตรที่ 1 ทำให้ไม่เหมาะสมกับการเจริญของแอคติโนแบคทีเรียเท่าสูตรที่ 1

ผลการศึกษาเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 42 วัน พบว่าสูตร 3 (ทัลคัมและ CMC) ไม่พบการรอดชีวิตของ *Streptomyces* TM32 เลย อาจะเนื่องด้วยปริมาณและอัตราส่วนของทัลคัมและ CMC ที่ใช้ในการทดลองนี้อาจจะไม่เหมาะสมกับการรักษาชีวิตของเชื้อที่ใส่ลงไปเนื่องจากอุณหภูมิและความชื้นไม่เหมาะสมกับการเจริญ และทัลคัมเป็นสารอนินทรีย์ (Inorganic substance) เป็นแร่ประเภทไฮเดรท แมกนีเซียม ซิลิเกตที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (Non – biodegradable) (Tamreihao et al., 2016)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในต้นพริก พบว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 มีผลต่ออัตราการงอก คือ เมื่อเพาะเลี้ยงต้นพริกเป็นเวลา 35 วัน พบว่าความสูงเฉลี่ยของต้นพริกในชุดการทดลองที่ 2 และ 4 ซึ่งมีการเติมชีวภัณฑ์ลงในดินกลับมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป (ชุดการทดลองที่ 1 และ 3) อาจเป็นเพราะสภาวะแวดล้อมในดินมีผลต่อการเจริญและสร้างสารเมแทบอไลต์ มีรายงานว่า *Streptomyces* TM32 มีคุณสมบัติในการสร้างกรดอินโดล-3-แอซีติก (ndole-3-acetic acid: IAA) เป็นฮอร์โมนพืช ในกลุ่มออกซิน ซึ่งมีส่วนกระตุ้นการงอก ความยาวยอด และความยาวราก (Nakaew et al., 2015) ซึ่งการเติมชีวภัณฑ์ลงในดินจะมีผลกระตุ้นการงอกของเมล็ด แต่เมื่อทำการเพาะปลูกไป

ระยะเวลาหนึ่งเชื้อที่เติมลงไปอาจจะมีปริมาณลดลงจนปริมาณสารส่งเสริมการเจริญที่เชื้อสร้างมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นการเจริญและมีผลต่อความสูงเฉลี่ยของต้นพริก ซึ่งความสูงของพืชอาจจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น ดิน ซึ่งขนาดอนุภาคของดินซึ่งส่งผลต่ออากาศและความชื้น อีกทั้งยังมีปัจจัยเรื่องของสารอาหารของพืชในดิน ซึ่งควบคุมให้มีความเหมือนกันในชุดการทดลองได้ยาก การผลิตชีวภัณฑ์ที่ใช้จุลินทรีย์นั้นต้องพิจารณาถึงส่วนผสมที่ใช้ เชื้อปฏิปักษ์ ต้นทุน และความเป็นไปได้ที่สามารถนำไปใช้ได้ในอนาคต เชื้อปฏิปักษ์ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการจัดจำแนกชนิดแล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces sioyaensis* (Nakaew et al., 2019) ซึ่งมีความปลอดภัยในการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัย

จากการพัฒนา *Streptomyces* TM32 เป็นชีวภัณฑ์ พบว่าสูตรที่ 1 (ใช้ข้าวสวยเพียงอย่างเดียว) มีปริมาณเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่สูงสุดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 14 วัน โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 6.71± 0.08 log CFU/g เมื่อนำชีวภัณฑ์ไปทดสอบในต้นพริก โดยผสมกับดินที่ใช้ปลูก พบว่าช่วยทำให้เกิดการงอกของเมล็ดพริกได้ดีขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญในด้านความสูงของต้นพริก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชาวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี โดยได้รับความเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ ตลอดจนอุปกรณ์ต่าง ๆ และงบประมาณสนับสนุนจากภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

Al-Dhabi NA, Esmail GA, Ghilan AKM, Arasu MV. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. Saudi Journal of Biological Sciences 2020;27(1):474–479.

Bonaterra A, Badosa E, Daranas N, Francés J, Roselló G, Montesinos E. Bacteria as biological control agents of plant diseases. Microorganisms 2022;10:1759. doi: 10.3390/microorganisms10091759.

Dagher F, Olishevska S, Philion V, Zheng J, Déziel E. Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. Heliyon 2020;6(10):e05222. doi:10.1016/j. heliyon. 2020.e05222.

Garvey M. Bacteriophages and food production: biocontrol and bio-preservation options for food safety. Antibiotics 2022;11:1324. doi: 10.3390/antibiotics11101324.

Hu R, Yu C, Jin Y, Pray C, Deng H. Impact of government policies on research and development (R&D) investment, innovation, and productivity: Evidence from pesticide firms in China. Agriculture 2022;12(5):709. doi: 10.3390/agriculture12050709.

Lernoud J, Willer H. Current statistics on organic agriculture worldwide: area, operators, and market. In Willer H, Lernoud J. (Eds.), The world of organic agriculture. statistics and emerging trends. FiBL & IFOAM – Organics International. Rheinbreitbach: Medienhaus Plump; 2017:36-74.

Nakaew N, Lumyong S, Sloan TW, Sungthong R. Bioactivities and genome insights of a thermotolerant antibiotics-producing *Streptomyces* sp. TM3 2 reveal its potentials for novel drug discovery. MicrobiologyOpen 2019;8:1-7.

Nakaew N, Rangjaroen C, Sungthong R. Utilization of rhizospheric *Streptomyces* for biological control of *Rigidoporus* sp. causing white root disease in rubber tree. European Journal of Plant Pathology 2015;142:93-105.

Tamreihao K, Ningthoujam DS, Nimaichand S, Singh ES, Reena P, Singh SH, Nongthomba U. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3 - 1 6 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. Microbiological Research 2016;192:260-270.

Teixidó, N, Usall, J, Torres, R. Insight into a successful development of biocontrol agents: production, formulation, packaging, and shelf life as key aspects. Horticulturae 2022;8(4):305. doi: 10.3390/ horticulturae8040305.