รายงานโครงการวิจัย

การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งสูตรน้ำเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว (*Oriza sativa*) ภายใต้สภาวะแล้งในระดับกระถาง

Production of drought tolerant bacterial inoculum for enhance rice (*Oriza sativa*) growth promotion under drought condition in pot experiment

กัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว

ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2561
มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

หัวข้อวิจัย การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งสูตรน้ำเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว (*Oriza sativa*) ภายใต้สภาวะแล้งในระดับกระถาง

ชื่อผู้วิจัย นางสาวกัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว

บทคัดย่อ

แบคทีเรียทนแล้งเป็นหนึ่งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช ซึ่งเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับนำมาใช้เพื่อยกระดับคุณภาพการเพาะปลูกพืชทางการเกษตร แต่เมื่อหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งอยู่ในสภาวะปกติจะมีการอยู่รอดสั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสารเติมแต่งที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งในสารละลายสูตรน้ำ โดยนำเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง 4 สายพันธุ์ มาเก็บรักษาในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต (pH 7) ที่เติมสารเติมแต่ง 5 ชนิด ในอัตราส่วนต่างๆ ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^9 และเก็บรักษาในหลอดเก็บเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดสอบความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียทนแล้งด้วยวิธี spread plate เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 เดือน จนครบ 5 เดือน แล้วนำหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งมาทดสอบการส่งเสริมการเจริญของพืช ผลการทดลองพบว่าสารละลายเติมแต่ง 1 ชนิด 0.1% Starch และ 1% PVP สารละลายเติมแต่ง 2 ชนิด 1% Skim milk+1% PEG6000 เป็นสูตรที่สามารถเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งได้ดีที่สุด โดยสามารถคงจำนวนเซลล์ให้อยู่ในระดับ 10^7-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้นานถึง 5 เดือน แต่เชื้อแบคทีเรียทนแล้ง *Jeotgalicoccus* sp. RA11 ไม่สามารถมีชีวิตรอดจนครบ 5 เดือนได้ จึงไม่เหมาะสำหรับเก็บรักษาในสารละลายเติมแต่งทั้ง 5 ชนิด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญในสารละลายเติมแต่งที่ต่างชนิดกัน และเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง B. *altitudinis* T17 เหมาะสำหรับนำมาเก็บรักษาในสารละลายสูตรน้ำมากที่สุด เนื่องจากมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และยังคงมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืชดีกว่าแบคทีเรียทนแล้งชนิดอื่น

คำสำคัญ: แบคทีเรียทนแล้ง สารละลายสูตรน้ำ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

Research Title Production of drought tolerant bacterial inoculum for enhance rice (*Oriza sativa*) growth promotion under drought condition in pot experiment

Researcher Miss Kansuda Duangsrikaew

Abstract

Drought tolerant bacterial are one of the small organisms to plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) which is a good choice for used to raise the quality of agriculture. but when the drought tolerant bacterial in the normal condition there will be short survival. the purpose of this study is to selection of suitable additive for drought tolerant bacterial storage in liquid formulation. by drought tolerant bacterial were stored in sodium phosphate solution (pH 7) supplemented suitable 5 additives in different ratios. The number of cells is about 10^9 CFU/ml and storage in eppendorf at room temperature. evaluated survival of drought tolerant bacteria by spread plate Day 0, 7, 14, 21 and 28 days. then sample every 1 month until 5 months. drought tolerant bacteria were evaluated for plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). The results showed that 1 additive solution 0.1% Starch and 1% PVP 2 additive solution 1% Skim milk+ 1% PEG6000 is the formula that can storage the best drought tolerant bacteria. can be maintained at 10^7-10^8 CFU/ ml for 5 months but *Jeotgalicoccus* sp. cannot survive until 5 months It is not suitable for storage in 5 additive solutions. The results show that drought tolerant bacteria had the ability to growth in different additive solutions. *B. altitudinis* is suitable for storage in liquid formulation and cell numbers were about 10^7-10^8 CFU/ ml for 5 months and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) better than another drought tolerant bacterial.

Keyword: Drought tolerant bacteria, Liquid formulation

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา ทุกท่านที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาและการทำงานของข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบคุณนางสาวศิรินภา ดุกสี และนางสาวพรรณณิตา ฝีมือช่าง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือเรื่องการเตรียมอุปกรณ์ต่าง ๆ และแรงงานในการทำปฏิบัติการ

กัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว

ธันวาคม พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ		(1)
สารบัญภาพ		(3)
สารบัญตาราง		(4)
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำโครงการวิจัย	1
	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
	ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
	ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่ได้คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	กลไกการทนแล้งของพืช	4
	แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะแห้งแล้ง	5
	การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำ	7
	สารเติมแต่งที่นำมาใช้ในการเก็บรักษาหัวเชื้อ	9
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3	อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	14
	วัสดุและอุปกรณ์	14
	วิธีดำเนินการวิจัย	15
บทที่ 4	ผลและอภิปรายผลการวิจัย	18
	การคัดเลือกสารเติมแต่งที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งในสารละลายสูตรน้ำ	18
	การทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในแบคทีเรียทนแล้ง	24
	ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียภายหลังการเก็บรักษาและการทดสอบการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในระดับกระถาง	25

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	29
บรรณานุกรม		30
ภาคผนวก		
ภาคผนวก ก		33
ภาคผนวก ข		37
ภาคผนวก ค		40
ประวัติผู้วิจัย		44

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	จำนวนของ *B. altitudinis* T17 ที่เก็บรักษาในสารเติมแต่งเพียงชนิดเดียวของสารละลายสูตรน้ำ ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% และ 2%	19
2	จำนวนของ *B. stratospherious* L19 ที่เก็บรักษาในสารเติมแต่งเพียงชนิดเดียวของสารละลายสูตรน้ำ ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% และ 2%	20
3	จำนวนของ *B. thuringiensis* B2 ที่เก็บรักษาในสารเติมแต่งเพียงชนิดเดียวของสารละลายสูตรน้ำ ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% และ 2%	21
4	จำนวนของ *Jeotgalicoccus* sp. RA11 ที่เก็บรักษาในสารเติมแต่งเพียงชนิดเดียวของสารละลายสูตรน้ำ ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% และ 2%	22
5	แสดงลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรียทนแล้ง *B. altitudinis* T17 ภายหลังกา เก็บรักษา 5 เดือน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	23
6	การเจริญของต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105	25
7	น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวภายหลังการเก็บเกี่ยว	27
8	จำนวนรวงข้าวของต้นข้าว	27
9	น้ำหนักสดของเมล็ดข้าว	27

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การทดสอบการผลิตฮอร์โมน IAA การละลายฟอสเฟต และการผลิตเอนไซม์ Catalase ของเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ทั้งก่อนการเก็บรักษาและภายหลังการเก็บรักษา 5 เดือน	24
2	ผลการนับเชื้อของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนปลูกและช่วงเก็บผลผลิตจากรอบรากข้าวในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง	28

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

บทที่ 1
บทนำ

ภัยแล้งเป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรไทยที่ต้องประสบปัญหาในทุกภาคของประเทศไทย ส่งผลให้ เกิดผลกระทบต่อระบบการเพาะปลูกตลอดจนความเป็นอยู่ของเกษตรกร โดยเฉพาะเกษตรกรที่เพาะปลูกข้าว เป็นหลัก เนื่องจากข้าวเป็นพืชที่ต้องใช้น้ำปริมาณมากในการเพาะปลูก และจากผลการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศจากสภาวะโลกร้อนทำให้ปัญหาภัยแล้งมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าความเสียหายกว่า 50% ของผลผลิตทั่วโลกมีผลมาจากปัญหาภัยแล้งที่เกิดขึ้น (Bouman et al., 2005) นอกจากนี้ Kamoshita et al. 2004 รายงานว่า ความเครียดจากสภาวะขาดน้ำจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช และมีผลต่อการติดดอก ปริมาณและคุณภาพผล ตลอดจนการสร้างเมล็ดของพืช ดังนั้นการปลูกข้าวในสภาวะขาดน้ำจะทำให้ข้าวมีการใช้ระยะเวลาการสร้างเมล็ดสั้นลง ทำให้เมล็ดข้าวที่ได้ไม่สมบูรณ์ น้ำหนักของเมล็ดข้าวน้อยลง โดยจากการศึกษาของ (ธวัชชัย, 2526) พบว่าเมื่อต้นข้าวอยู่ในสภาวะการขาดน้ำในระยะที่มีการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบจะทำให้ ผลผลิตลดลงประมาณ 17 % แต่เมื่อต้นข้าวได้รับ สภาวะการขาดน้ำที่ระยะการสร้างรวงอ่อนจนถึงรวงแก่เต็มที่จะส่งผลให้ผลผลิตลดลงถึง 30 % นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาในข้าวสาลี ซึ่งพบว่าผลผลิตของข้าวสาลี มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเกิดการขาดน้ำ โดยเฉพาะในระยะตั้งท้องและระยะเมล็ดน้ำนม มีรายงานว่าการใช้ PGPR ในการเกษตรในรูปหัวเชื้อ และเริ่มมีการศึกษา ใช้กันมากขึ้น ดังเช่นในส่วนของกรมวิชาการเกษตรเอง หรือการใช้ *Azotobacter vinelandii* และ *A. chroococcum* เป็นหัวเชื้อ PGPR ในการปลูกข้าว (Kanungo et al, 1977) โดยพบว่าให้ผลผลิต ของข้าวเพิ่มขึ้น 20% หรือการใช้ *Azospirillum brasilense* ร่วมกับ *A. lipoferum* ทำให้ข้าวสาลี ได้ธาตุไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนได้ถึง 7-12% (Singh et al, 1999) จากรายงานของกรมป้องกันและบรรเทาสาธารณภัย ประจำวันที่ 29 เมษายน 2559 ประเทศไทยมีจังหวัดที่ได้รับผลกระทบและประกาศเขตการให้ความช่วยเหลือ ผู้ประสบภัยพิบัติกรณีฉุกเฉิน (ภัยแล้ง) ทั้งหมด 29 จังหวัด 154 อำเภอ 705 ตำบล 5,679 หมู่บ้าน โดยปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดภาวะภัยแล้ง คือ ปริมาณฝน ซึ่งในปี 2558 มีปริมาณฝนสะสมเฉลี่ยทั้งประเทศเพียง 1,251 มิลลิเมตร น้อยกว่าปกติอยู่ประมาณ 14.73% หรือน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับข้อมูลย้อนหลังตั้งแต่ปี 2524-2557 ซึ่งหมายรวมถึงการมีปริมาณน้ำฝนน้อยกว่าปีที่ประเทศไทยประสบภัยแล้งรุนแรง เช่น ปี 2537 ปี 2542 ปี 2548 ปี 2553 ภัยแล้งถือเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศอีกด้านหนึ่ง ซึ่งปัญหาดังกล่าวนั้นอาจถือได้ว่าเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นเป็นประจำทุกปี ประกอบกับจากปรากฏการณ์เอลนิโญ ในปี 2558 นั้น อาจถือว่ามีความรุนแรงมากที่สุดในรอบหลายๆปีที่ผ่านมา ส่งผลให้ฝนไม่ตกตรงตามฤดูกาล หรือตกมาแต่มีปริมาณน้ำฝนที่น้อยกว่าระดับปกติ ทำให้การกักเก็บน้ำของแหล่งน้ำขนาดใหญ่ๆ สามารถกักเก็บได้ในปริมาณน้อย จึงได้นำพาความเสียหายมาสู่ภาคเศรษฐกิจและ

สังคม ทั้งด้านการขาดแคลนน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภค และด้านการเพาะปลูก ของภาคเกษตร (สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร, 2558-2559) จากปัญหาภัยแล้งเกิดขึ้นแล้วในหลายพื้นที่ของประเทศไทย ได้ส่งผลกระทบต่อประชาชนจำนวนมาก โดยเฉพาะเกษตรกรในหลายจังหวัดที่ไม่สามารถทำการเพาะปลูกได้ และย่อมส่งผลต่อรายได้ของเกษตรกรที่ลดน้อยลงไป ส่งผลให้มีการลดการใช้จ่ายหรือระมัดระวังในการใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น เพราะไม่รู้ว่าปัญหาดังกล่าวจะกินระยะเวลาไปมากน้อยเพียงใด หากเป็นระยะสั้นก็อาจส่งผลกระทบไม่มากนัก แต่หากระยะยาวคาดว่าจะส่งผลกระทบเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะกลุ่มเกษตรกรที่มีรายได้ไม่สูงมาก การประคองตัวด้านรายได้และการใช้จ่ายอาจมีไม่มากเหมือนกลุ่มอื่นๆ (จิรัฐ, 2015) ประกอบกับในปัจจุบันราคาสินค้าไม่ว่าจะเป็นด้าน อุปโภคหรือบริโภคต่างๆ ก็ยังอยู่ในระดับสูง ซึ่งหากยังไม่สามารถทำการเพาะปลูกได้ก็คงส่งผลกระทบต่อรายได้ของเกษตรกรอย่างต่อเนื่อง

ในปัจจุบันจึงได้มีการนำแบคทีเรียทนแล้ง มาผลิตเป็นหัวเชื้อในการกระตุ้นการทนแล้งเนื่องจากแบคทีเรียมีความหลากหลายของสายพันธุ์มากสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้เร็วจึงนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเกษตรภายใต้สภาวะแล้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจมุ่งเน้นที่จะพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบน้ำ ทำให้เซลล์ตั้งต้นมีปริมาณสูง ในขณะเดียวกันมุ่งที่จะพัฒนาสูตรวัสดุพาหะที่ให้ปัจจัยที่เหมาะสมในการคงจำนวนเซลล์ในการเก็บรักษาเชื้อที่เหมาะสมโดยใช้สารป้องกันเซลล์ต่าง ๆ เช่น gum arabic, carboxy methyl cellulose (CMC), PVP และสารละลายซูโครส เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.. เพื่อให้ได้หัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแต่ละสายพันธุ์

2.. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสูตรน้ำภายหลังการเก็บรักษาในการกระตุ้นการทนแล้งของข้าวขาวดอกมะลิ 105

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำในการกระตุ้นการทนแล้งของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ดังนี้ นำแบคทีเรียทนแล้งมาทดสอบความสามารถในการเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium ที่เติมได้แก่ Glycerol, Glycine betaine, แป้งมันสำปะหลัง, Skim milk และ Polyvinyl pyrrollidone (PVP) ในอัตราส่วนระหว่าง 0.5-2.0% เก็บเชื้อแยกแต่ละสายพันธุ์เป็นเวลาอย่างน้อย 5 เดือน ระหว่างการเก็บรักษาจะทำการนับจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตทุกเดือน เมื่อครบกำหนดอายุการเก็บรักษาทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่มีจำนวนแบคทีเรียเหลือรอดมากที่สุดมาทำการทดสอบการปลูกข้าวขาวดอกมะลิ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

105 ในระดับกระถางจะถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยใช้หัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำเป็นปุ๋ยในการส่งเสริมการเจริญเติบโต

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ข้าวเจ้า (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจ ซึ่งการเจริญเติบมีความผันแปรต่อสภาวะแล้ง โดยเฉพาะเมื่อต้นข้าวระยะตั้งท้อง และดอกบาน-ผสมเกสร ประสบกับสภาวะแล้งจะทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ดังนั้นถ้ามีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติช่วยให้ข้าวทนต่อความเครียดจากสภาวะแล้ง เช่น ความสามารถย่อยสลายฮอร์โมนเอทิลีนเพื่อลดการเหี่ยว การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อรักษาน้ำบริเวณราก และการผลิตเอนไซม์คะตะเลสเพื่อลดความเครียดบริเวณรากข้าว ก็คาดว่าจะสามารถส่งเสริมให้ต้นข้าวเจริญต่อไปได้อีกระยะหนึ่ง เมื่อได้น้ำก็จะสามารถฟื้นตัวได้ โดยทั่วไปแบคทีเรียรอบรากพืชจะอยู่ร่วมกันกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย แบคทีเรียบางชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชด้วยกลไกต่าง ๆ และช่วยให้พืชตอบสนองต่อความเครียด อย่างไรก็ดีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญต่อพืชขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้การส่งเสริมการเจริญของพืชไม่ได้ใช้เพียงกลไกเดียว การทำงานเสริมกันของแบคทีเรียหลายชนิดจะช่วยให้พืชเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแล้งได้ดี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แบคทีเรียสูตรน้ำเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาวะแล้ง
2. สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาภัยแล้งโดยการใช้ชีววิธี เพื่อยืดอายุของต้นข้าวเมื่อเจอปัญหาภัยแล้งในระหว่างการหาวิธีการนำน้ำจากแหล่งอื่น ๆ มาให้พืช เช่น การทำฝนเทียม

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิษณุโลก

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 กลไกการทนแล้งของพืช

น้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญในส่วนต่าง ๆ ของพืชและจำเป็นต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชในสภาพธรรมชาติปริมาณน้ำที่มีอยู่ในพืชมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำที่ถูกดูดไปจากดินผ่านต้นพืชและสูญเสียออกไปโดยการคายน้ำสภาพที่น้ำในพืชมีการเปลี่ยนแปลงจนลดลงต่ำกว่าระดับที่เหมะสมจะมีผลทำให้พืชสูญเสียความเต่งของเซลล์ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและสภาวะขาดน้ำเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจะมีผลทำให้พืชเหี่ยวตายได้ ดังนั้นพืชจึงมีกลไกลตอบสนองตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำซึ่งมีหลายกระบวนการขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการขาดน้ำและช่วงเวลาของการขาดน้ำ เช่น การแก่และร่วงของใบ การปิดเปิดของปากใบ และการสังเคราะห์ด้วยแสงและกลไกเหล่านี้ควบคุมด้วยฮอร์โมนหลายชนิด เช่น IAA (indoleacetic acid) มีผลทำให้เกิดการแก่และร่วงของใบซึ่งส่งผลให้พื้นที่ใบลดลง ABA (abscisic acid) มีผลทำให้มีการปิดเปิดปากใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำของพืช CK (cytokinin) ช่วยชะลอการแก่และร่วงของใบ Ethylene ทำให้เกิดการแก่และร่วงของใบเร็วขึ้น GA (gibberellins) สภาวะขาดน้ำของพืชมีผลทำให้ปฏิกิริยาของ GA ในใบพืชลดลงฮอร์โมนพืชเหล่านี้มีปฏิกิริยาสัมพันธ์ในสภาวะขาดน้ำคือ ABA และ ethylene จะถูกสังเคราะห์มากขึ้นในสาวะขาดน้ำแต่ในทางตรงกันข้าม IAA, CK, และ GA มีแนวโน้มลดลงในสภาวะขาดน้ำ อีกกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งของพืชคือการเจริญเติบโตของรากและการทำงานของรากในสภาพที่พืชได้รับน้ำสม่ำเสมอ ระบบรากส่วนใหญ่จะอยู่ที่ผิวดินชั้นบนแต่เมื่อความชื่นที่ผิวดินลดลงพืชจะมีการเจริญของรากชอนไชไปในดินชั้นล่างเพื่อดูดน้ำมารักษาความสมดุลของน้ำในต้นพืชในสภาวะขาดน้ำจึงมีผลในการดูดธาตุอาหารของพืชลดลงด้วย (สายัณห์, 2534)

ผลกระทบของสภาวะแล้งต่อต้นข้าว

ข้าวเป็นพืชที่ไวต่อความเครียดจากสภาวะแล้ง เนื่องจากการมีระบบรากที่เล็ก การตอบสนองสภาวะเครียดจากความแห้งแล้งของข้าวคล้ายกับพืชทั่วไป เช่น ลดกิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสง เกิดการสะสมกรดอินทรีย์และสาร osmolyte และเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Ji et al., 2012) สภาวะแล้งส่งผลต่อการเจริญและการพัฒนาของต้นข้าวในหลายประเด็น ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของข้าวในด้านโครงสร้าง เช่น การงอกของเมล็ดลดลง เกิดการลดการขยายขนาดทั้งในด้านความสูงและด้านข้างลำต้น ชีวมวล จำนวนแขนงของกอข้าว จำนวนใบและขนาดของใบลดลง และเกิดการม้วนตัวของใบมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงของข้าวในด้านชีวเคมี เช่น การเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับของฮอร์โมนต่าง ๆ การสะสมสาร osmoprotectant เช่น โพรลีน น้ำตาลชนิดต่าง ๆ โพลีเอมีน และการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ และการเปลี่ยนแปลงของข้าวในด้านสรีรวิทยา เช่น เกิดการลดลงของค่าคลอโรฟิลล์ ลดกิจกรรมการสังเคราะห์แสง ลดการเปิด-ปิดปากใบ ลดประสิทธิภาพการใช้น้ำ

และลดความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อผลผลิตข้าว พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องการตอบสนองทางสรีรวิทยาที่สำคัญของข้าวได้แก่ อัตราการคายน้ำจากใบ (Transpiration rate) การชักนำการเปิดปิดของปากใบ (stomatal conductance) ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ภายในช่องว่างใบ (intercellular CO2 concentration) กิจกรรมของระบบแสงสอง (photosystem II (PSII) activity) (Pandey and Shukla, 2015)

2.2 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะแห้งแล้ง

จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่อยู่บริเวณรอบรากพืช หรือ (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR) เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลาหลายชนิดที่อาศัยในบริเวณพื้นผิวของรากปกติเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชอาศัย และมีกลไกสนับสนุนการสนับการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยพบได้ในดินทั้งบริเวณรอบรากพืชและเนื้อเยื่อของพืชแบคทีเรียเหล่านี้จะอยู่ร่วมกันกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย (Symbiosis) เพื่อเพิ่มโอกาสการอยู่รอดให้กับพืชและจะอาศัยสารอาหารจากพืชในการเจริญเติบโต แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1.) กลุ่มที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์พืช (endophytes) แบคทีเรียกลุ่มนี้อาศัยอยู่ภายในเซลล์พืชซึ่งอาจแพร่กระจายไปในส่วน ต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อพืชหรืออาศัยบริเวณจำเพาะภายในเซลล์พืชก็ได้ เช่น อาศัยในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากหรือท่อลำเรียงน้ำของพืช (xylem) 2.) กลุ่มของพืชที่ดำรงชีวิตแบบอิสระ (free-living bacteria) จะอาศัยอยู่อย่างอิสระภายนอกเซลล์พืช แต่ยังคงมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ แบคทีเรียสนับสนุนการเจริญภายในพืชอย่างถาวร (obligate endophyte) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะแพร่กระจ่ายสู่พืชต้นอื่นโดยอาศัยพาหะหรือvertically transfer ส่วนแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งจะอาศัยอยู่ภายในพืชแบบชั่วคราว (facultative endophyte) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีช่วงชีวิตหนึ่งที่อาศัยอยู่ภายนอกเซลล์พืชได้ ตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ ที่อยู่ในกลุ่มพีจีพีอาร์ได้แก่ อะโซสไปริลลัม (*Azospirillum* sp.) สเตรปโตมัยสีท (*Streptomyces* sp.) บาซิลลัส (*Bacillus* sp.) ซูโดโมแนส (*Pseudomonas* sp.) และ ไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* sp.) เป็นต้น (หนึ่ง และคณะ, 2548)

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชบางชนิดช่วยดูดซึมสารอาหารประเภทไนโตรเจนละลายฟอสฟอรัสผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) และไซเดอโรเฟอร์ (Siderophore) ให้แก่พืชบางชนิดมีคุณสมบัติในการเพิ่มการกระตุ้นการเจริญของพืชโดยการผลิตฮอร์โมนพืช IAA ผลิตเอนไซม์ ACC Deaminase ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญที่ปลายรากทำให้มีพื้นผิวรากพืชเพิ่มขึ้น การดูซึมสารอาหารดีขึ้นทำให้สามารถอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี (Vardharajula et al., 2010) สำหรับกิจกรรมของแบคทีเรียที่พบว่าสามารถช่วยพืชลดความเครียดเมื่ออยู่ในสภาวะแล้งแล้งหลายชนิด เช่น การผลิตเอนไซม์ ACC Deaminase เพื่อลดระดับเอธิลีนที่ปกติทำหน้าที่ยับยั้งการยืดตัวของรากและยับยั้งการเจริญของพืชการผลิต IAA เพื่อเพิ่มจำนวนรากและปรับกิจกรรมเกี่ยวกับการขนส่งการผลิต abscisic acid ซึ่งควบคุมการปิดเปิดปากใบและเกี่ยวข้องกับกลไกความเครียดของพืชการผลิตเอนไซม์ Catalase เพื่อทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในสภาวะแห้งแล้งและลดความเสียหายจากปฏิกิริยา

ออกซิเดชั่นและการสร้างไบโอฟิล์มโดยโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของไบโอฟิล์มสามารถช่วยเพิ่มปริมาณน้ำรอบ ๆ รากและทำให้ดินจับตัวดีขึ้น (Glick et al., 2013)

แบคทีเรียทนแล้ง (Drought tolerant bacteria)

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือหนึ่งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ซึ่งเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับนำมาใช้เพื่อยกระดับคุณภาพการเพาะปลูกพืชทางการเกษตร โดยเฉพาะในระดับเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าพืช ซึ่งจำเป็นต้องได้รับการดูแลเพื่อมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่แข็งแรงต่อไป แบคทีเรียจะอาศัยอยู่บริเวณรอบ ๆ รากของต้นพืช จึงมีข้อดีที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืชกระตุ้นการยืดตัวและการแบ่งเซลล์ของพืชได้ รวมทั้งสามารถสร้างธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช เช่นการตรึงไนโตรเจน และช่วยย่อยฟอสฟอรัสในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น (ธิดารัตน์, 2560)

กระบวนการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยแบคทีเรีย

การนำแบคทีเรียมาใช้ร่วมกับเมล็ดพันธุ์จำเป็นต้องเข้าใจกระบวนการส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อพืช ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้โดยส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ร่วมกันกับพืช หรืออยู่ในดินบริเวณรอบ ๆ รากพืช จึงมีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งสามารถประยุกต์ได้ 2 ทาง คือ โดยทางตรง และทางอ้อม (วิยะดา, 2554) ได้แก่ กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยทางตรง ได้แก่ ช่วยย่อยธาตุ ฟอสฟอรัสในดิน ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น สร้างปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชผลิตสาร phytohormones เช่น auxin, cytokinin และ gibberellin เป็นต้น ช่วยลดความเข้มข้นของเอทธิลีนในพืช สามารถผลิตซิเดอร์โรฟอร์ (siderophores) ช่วยนำธาตุเหล็กไปให้พืชใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น และกระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและสร้างภูมิ ต้านทานและทางอ้อม ได้แก่ ช่วยในการควบคุมโรคพืช ทั้งโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช ผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ผลิตสาร antifungal metabolites สามารถจำกัดปริมาณธาตุเหล็กที่เป็นประโยชน์ของเชื้อโรคพืชทำให้สามารถป้องกันการแพร่พันธุ์ และการขยายจำนวนของเชื้อโรคพืชได้ (ธนากร, 2557)

ความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันระหว่างพืชและแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับพืชจะเป็นประโยชน์ต่อการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชอย่างมาก เช่น การช่วยยืดขยายลำต้น ราก และการสังเคราะห์แสงของใบเลี้ยง เป็นต้น (วิยะดา, 2554) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชจะสังเคราะห์ Indole-3-acetic acid และส่งออกมานอกเซลล์แบคทีเรีย การต่อต้านเชื้อปฏิปักษ์ให้กับพืชที่อยู่อาศัยแล้วพืชอาศัยจะตอบสนองต่อ Indole-3-acetic acid โดยเกิดการกระตุ้นการขยายตัวของเซลล์สร้างผนังเซลล์มากขึ้น เช่น การทำให้เกิดการขยายตัวของใบ และการยืดยาวของราก เป็นต้น (Gholami, 2009)

ลักษณะทั่วไปของ *Bacillus*

แบคทีเรีย (bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (gram positive bacteria) อยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ *Clostridium* และ *Desulfotomaculum* เคลื่อนที่ด้วย แฟลกเจลล่า (flaggella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) และบางชนิดจะเจริญในภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ (facultative anaerobes) เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) ที่สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) สปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) ของ *Bacillus* จะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี (จิตรมนัส, 2559)

ลักษณะทั่วไปของ *Jeotgalicoccus* sp.

แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปทรงกลม แบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Family *Staphylococcaceae* ได้แก่ *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Salinicoccus* แบคทีเรียในวงศ์นี้สร้างเอนไซม์ catalase เจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic bacteria) และบางชนิดเจริญในภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ (facultative anaerobes) (Lofdahl, 1983)

2.3 การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำ

การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตรมีมาช้านาน เป้าหมายของการใช้งานเพื่อให้แบคทีเรียเหล่านี้ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช คุณสมบัติแบคทีเรียที่ดีต้องใช้งานง่ายและสามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน ใช้ได้ดีกับดินชนิดต่าง ๆ และสภาวะที่แตกต่างกันไป และปล่อยภัยต่อผู้ใช้งาน สูตรการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียสามารถแบบได้เป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ หัวเชื้อสูตรน้ำ, สูตรเข้มข้น, สูตรเม็ดและสูตรผง เป็นต้น โดยได้ทดสอบหาสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม โดยตรวจสอบการ เจริญและการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน การเสริมน้ำตาล glucose ในสูตรอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบใช้ สารที่มีคุณสมบัติในการรักษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (buffer) เติมลงในอาหารเพื่อปรับสภาวะความเป็น กรด- ด่างให้เหมาะสม และช่วยยืดอายุการเก็บรักษา (นันทกร และคณะ, 2552) ในการเคลือบเมล็ดจะมีการใช้สารเติมแต่งที่ไม่เป็นพิษ เพื่อช่วยให้แบคทีเรียยึดเกาะกับผิวเมล็ดได้ดีขึ้น เช่น gum arabic, carboxy methyl cellulose (CMC), สารละลายซูโครส และน้ำมันพืช เป็นต้น (Bashan et al., 2014) นอกจากการเคลือบเมล็ดแล้วยังมีวิธีการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำที่มีการเติมสารเพิ่มความคงตัว ข้อดีของหัวเชื้อสูตรน้ำเมื่อเปรียบเทียบกับหัวเชื้อผสมกับวัสดุตรึงแบบแข็งคือ ใช้งานง่าย สามารถปรับเปลี่ยนปริมาณสารอาหาร และเติมสารป้องกันเซลล์เพิ่มได้ ข้อดีอีกอย่างคือหัวเชื้อสูตรน้ำมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานกว่าการใช้วัสดุแข็ง หัวเชื้อสูตรน้ำสามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 2 ปี ในขณะที่หัวเชื้อตรึงกับวัสดุแข็งจะมีอายุการเก็บรักษาที่ 6-18 เดือน ข้อเสียของหัวเชื้อ

แบคทีเรียสูตรน้ำที่พบในบางกรณีคืออายุการเก็บรักษาสั้น และต้องเก็บในที่เย็นเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาให้นานขึ้น (Bashan et al., 2014)

โดยปกตินักวิทยาศาสตร์สามารถตรวจหาและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่าง ๆ ได้โดยตรงจากแหล่งธรรมชาติทั้งในแปลงปลูกพืช หรือจากส่วนต่าง ๆ ของพืช จุลินทรีย์เหล่านี้มีทั้งชนิดที่อาศัยอยู่รวมกับพืชภายในเนื้อเยื่อพืช (endophytic microorganisms) และชนิดที่อาศัยบริเวณผิวภายนอกพืช (epiphytic microoganisms) รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับพืชในบริเวณรอบ ๆ ราก (rhizosphere microorganisms) หรือบริเวณผิวราก (rhizoplane microorganisms) จุลินทรีย์ดังกล่าวเหล่านี้อาจจะมีความสามารถในการควบคุมโรคพืชจากกลไกต่าง ๆ เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) การแก่งแย่งแข่งขันในการอยู่ร่วมกับพืช (competition) การเป็นปรสิตต่อเชื้อก่อโรค (parasitism) การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting microorganisms) และการกระตุ้นให้พืชมีภูมิต้านทาน (induced systemic resistance) เป็นต้น เมื่อทำการคัดเลือกได้เชื้อที่มีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชตามที่ต้องการแล้ว จำเป็นที่จะต้องดำเนินการพัฒนารูปแบบสูตร (formulation) ที่จะทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้และได้ประสิทธิภาพสูง รูปแบบสูตรหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมพัฒนาและนำไปใช้มี 3 รูปแบบ ได้แก่

1. รูปแบบสูตรน้ำ (liquid formulation) เป็นรูปแบบสูตรที่ผลิตได้ง่ายแต่เก็บรักษาได้ยาก ไม่สะดวกในการขนส่ง การผลิตสูตรน้ำทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ต้องการในอาหารเหลวแล้วนำมาผสมกับน้ำหรือสารละลายที่เหมาะสม

2. รูปแบบสูตรผง (powder formulation) สูตรที่ผลิตได้ง่ายสามารถเก็บรักษาได้ยาวนานกว่าสูตรน้ำ ขนส่งได้สะดวก โดยการผลิตเริ่มจากการเตรียมเชื้อผงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในอาหารแบบเหลวแล้วผสมกับสารป้องกันเซลล์ เช่น กลีเซอรีน น้ำตาล แป้งมัน และสารผง ได้แก่ ทัลคัม (talcum) คาร์บอกซิลเมทธิลเซลลูโลส (carboxyl methyl cellulose) และไดอะตอมไมต์ (diatomite) แล้วนำส่วนผสมมาอบให้แห้งแล้วบดให้เป็นผงละเอียด

3. รูปแบบสูตรเม็ด (granular formulation) เป็นรูปแบบสูตรที่นิยมนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีส่วนประกอบของรูปแบบสูตรคล้ายกับรูปแบบสูตรผง กล่าวคือมีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์และผสมกับสารป้องกันเซลล์ สารผงและสารจับตัวหรือสารยึดเกาะในการทำเม็ด และนำไปทำให้แห้งในรูปของเม็ด เชื้อสูตรเม็ดสามารถใช้ในรูปของการละลายน้ำหรือหว่านลงดิน

หัวเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบสูตรต่าง ๆ จะต้องได้รับการตรวจสอบคุณภาพของรูปแบบสูตร โดยศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ความคงตัวของรูปแบบสูตร การละลายตัวในน้ำ การมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และการศึกษาประสิทธิภาพของรูปแบบสูตรหัวเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง และในสภาพไร่ โดยที่ความสำเร็จของการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ คือการที่เชื้อเหล่านั้นสามารถที่จะเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนประชากรได้อย่างรวดเร็วในพื้นที่เป้าหมาย เช่น ที่ผิวหรือภายในพืช รวมทั้งมีศักยภาพในการต่อต้านหรือลดปริมาณเชื้อโรคได้ด้วยกลไกต่าง ๆ ทั้งนี้ความสำเร็จหรือประโยชน์ที่ได้รับ

จะมากหรือน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทและรายละเอียดของคุณลักษณะต่าง ๆ ทั้งในแง่ของกลไกการเป็นเชื้อปฏิปักษ์หรือช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ ความเข้าใจถึงปัจจัยที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ เช่น ธาตุอาหาร และสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อ จัดเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยให้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีประสบความสำเร็จได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (อนุเทพ, 2558)

รูปแบบการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรคและกระตุ้นภูมิต้านทานพืช

1. การคลุกเมล็ด (seed treatment) สามารถทำได้โดยการคลุกเมล็ดพันธุ์พืชด้วยชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดที่สุด เหมาะสำหรับการใช้ควบคุมโรคในระบบรากและลำต้นส่วนใต้ดิน รวมทั้งยังควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และส่งเสริมหรือกระตุ้นเพิ่มพูนความแข็งแรงของต้นกล้าได้ดี

2. การใส่หรือเติมลงในดิน (soil treatment) เป็นวิธีการที่ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัสกับประชากรของเชื้อโรคพืชในดินอย่างทั่วถึง และมีปริมาณมากพอที่จะเจริญแข่งขันหรือผลิตสารยับยั้งเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้ประชากรเชื้อโรคลดลงอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากต้องใช้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน

3. การพ่นบนพืช (aerial spray) เป็นวิธีการพ่นเชื้อสูตรจุลินทรีย์ลงบนต้นพืช เพื่อควบคุมโรคที่เกิดกับใบและลำต้นส่วนเหนือดิน ซึ่งมีปัจจัยหลายประการเข้ามาเกี่ยวข้องและส่งผลต่อความสำเร็จของการใช้ เช่น ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะเจริญครอบครองบนผิวพืชโดยใช้อาหารและความชื้นบนผิวพืช

4. การใส่ลงบนส่วนขยายพันธุ์และกล้าพืช (propagating material and transplanting treatment) เป็นวิธีการที่ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์ได้สัมผัสกับส่วนของพืชที่จะใช้ขยายพันธุ์ รวมทั้งกล้าพืชก่อนที่เชื้อโรคจะมีโอกาสเข้าทำลายพืช เป็นวิธีที่ได้ผลดี ประหยัดค่าใช้จ่าย และสะดวกต่อการปฏิบัติการพ่น หรือการใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์หลังจากพืชเจริญอยู่ในระยะต้นกล้า และก่อนที่เชื้อโรคพืชจะเข้าทำลายพืชนั้น ยังสามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิต้นทานของพืชได้อีกด้วย (อนุเทพ, 2558)

2.4 สารเติมแต่งที่นำมาใช้ในการเก็บรักษาหัวเชื้อ

สิ่งมีชีวิตต้องการพลังงานจากการสลายสารอาหารเพื่อใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ซึ่งในการสลายสารอาหารนี้ จะเปลี่ยนพลังงานของพันธะเคมีของสารอาหารให้อยู่ในรูปสารประกอบพลังงานสูง เช่น ATP ที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ เรียกกระบวนการนี้ว่า การสลายสารอาหารระดับเซลล์หรือ การหายใจระดับเซลล์ (cellular respiration) สารอาหารที่ลำเลียงเข้าสู่เซลล์และสามารถให้พลังงานแก่เซลล์ได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

1. แป้งมันสำปะหลัง

เป็นแป้งที่ทำมาจากหัวมันสำปะหลัง มีลักษณะสีขาว จับแล้วเนียนลื่นมือ เมื่อทำให้สุกจะมีลักษณะเหลวเหนียวหนืดและใส เมื่อทิ้งให้เย็นจะยังมีความเหนียวคงตัว แป้งมีองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ อะมิโลส (amylose) และอะมิโลเพคติน (amylopectin) (สุนัดดา, 2556)

2. Glyceral

กลีเซอรอล (glycerol หรือ glycerin) เป็นสารที่เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีรสหวานเล็กน้อย มีสมบัติในการละลายในน้ำ และดูดจับน้ำได้ดี (hydroscopic) เป็นสารเก็บความชื้น (humectant) ป้องกันไม่ให้อาหารแห้ง (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2539)

3. Skim milk

นมขาดมันเนย (skim milk หรืออาจเรียกว่า fat free milk) หรือหางนม หมายถึง น้ำนมที่แยกเอาไขมันเนยออกเกือบทั้งหมด ของแข็งที่เหลือเรียกว่า ของแข็งในน้ำนมปราศจากไขมัน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนนม น้ำตาลแล็กโทส (พิมพ์เพ็ญ และคณะ,2539)

4. Polyvinyl pyrrolidone (PVP)

เป็นส่วนประกอบที่ใช้กันทั่วไปในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและความงาม เป็นสารยึดเกาะฟิล์ม สารกันรอยอิมัลชันสารแขวนลอย และตัวทำละลาย Polyvinyl pyrrolidone (PVP) (Kallum, 2015)

5. Polyethylene glycol (PEG6000)

เป็นสารเคมีสังเคราะห์เนื่องจากสมบัติที่ดี เช่น มีความชอบน้ำสูง ทำให้สามารถนำไปผสมกับสารอื่น ๆ ให้เพิ่มความชอบน้ำได้ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่เกิดจากสารประกอบดังกล่าว เช่น เครื่องสำอาง ครีม โลชั่น โดย PEG เองมีหลายชนิดแตกต่างไปตามน้ำหนัก เช่น PEG200, PEG300, PEG400 และ PEG600 เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลน้อยทำให้ลักษณะของมันจะใส เปรียบเทียบกับ PEG3350, PEG4500 และ PEG8000 ซึ่งมีลักษณะข้นคล้ายแวกซ์ น้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นนี้จะส่งผลทำให้คุณสมบัติ เช่น ความสามารถในการละลายน้ำ การดูดความชื้น และจุดเยือกแข็ง เปลี่ยนแปลงไปด้วย (พิชญา, 2558)

2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ณัฏฐิมา และคณะ (2551) นำเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีกลม ตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว สีขาวขุ่น มีคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) มาทดสอบวิธีการเก็บรักษาวิธีต่าง ๆ จำนวน 8 วิธี โดยมีวาง แผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ทำการตรวจสอบความอยู่รอดของเชื้อ แบคทีเรียและความบริสุทธิ์ ทุก 3 เดือน บันทึกลักษณะโคโลนี ความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย และอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธี ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E.*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

carotovora จำนวน 10 ไอโซเลท เก็บไว้ด้วยวิธีต่าง ๆ ทั้ง 8 วิธี เป็นเวลา 24 เดือนยังคงมีชีวิตอยู่ทั้ง 10 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงตามเดิมทุกประการ

หนึ่ง (2556) ได้ทดสอบความเป็นพิษของวัสดุพาหะเหลวและการทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบเป็นสูตรอาหารสำหรับเชื้อทั้งสองชนิด ที่มีการเติมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ หลังจากเก็บไว้นาน 12 เดือน นั้น พบว่าปริมาณเชื้อลดลงค่อนข้างมาก โดยเฉพาะ *Azospirillum* sp. ที่มีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^8 CFU/ml เพียงในเดือนแรกเท่านั้น อย่างไรก็ตามการใช้ NFB+แป้งมัน 1.0% สามารถทำให้มีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^8 CFU/ml ได้ถึง 6 เดือน ส่วนวัสดุพาหะชนิดอื่นๆ นั้นไม่สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 6 เดือน เนื่องจากมีปริมาณเชื้อค่อนข้างต่ำ ส่วน *Azotobacter* sp. นั้นพบว่ามีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^8 CFU/ml ถึงเดือนที่ 10 โดย การใช้ LG+PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% ส่วนวัสดุพาหะชนิดอื่นๆ พบปริมาณเชื้อค่อนข้างต่ำ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แป้งมัน ซึ่งเป็น Biopolymer และมีราคาถูกช่วยส่งเสริมให้เชื้อทั้ง สองชนิดมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตสูงกว่า 10^8 CFU/ml หลังจาก 6 เดือน ไปแล้ว ซึ่งเกิดจากการที่แป้งมันมีคอลลอยด์ (colloid) จึงทำให้วัสดุพาหะผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

หนึ่ง (2557) จากงานวิจัยของมหาวิทยาลัยที่ผ่านมามีเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชที่มี ศักยภาพในการต่อยอดสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์จำนวน 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Streptomyces* sp. ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำสำหรับ เพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ ทั้งนี้จากการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 7 สายพันธุ์ พบว่าสูตรอาหาร Yeast extract 0.5 กรัม + Molasses 20 กรัม + K_2HPO_4 0.05 กรัม + KH_2PO_4 0.15 กรัม เป็นสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในสองกลุ่มนี้ได้ดีที่สุด โดยสามารถเพิ่มการเจริญให้อยู่ในระดับ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อพิจารณาต้นทุนการผลิตเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน (Nutrient Broth) พบว่ามีราคาต้นทุนที่ถูกกว่าถึง 28 เท่า และเมื่อทดสอบหาชนิดของสารพอลิเมอร์ที่ เหมาะสมในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ชีวภาพ พบว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความเหมาะสม ของการใช้สารพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน โดยการใช้สาร Polyvinyl pyrrolidone (PVP) หรือ Polyethylene glycol (PEG) เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง สามารถยืดอายุการเก็บรักษาให้มีปริมาณเซลล์ ที่มีชีวิตเหลืออยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้นาน 3-4 เดือน ณ อุณหภูมิห้อง และสามารถใช้ขวดบรรจุ ภัณฑ์ชนิดโพลีเอทธิลีนในการเก็บรักษาได้ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช 2 ชนิด คือ เชื้อรา *Phytophthora* spp. และเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่ามีเพียงเชื้อ *Streptomyces* sp. SHR 103 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด และรองมาคือเชื้อ *Bacillus* sp. BSN301 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้เมื่อเก็บอยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หัวเชื้อ แม้มีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนานถึง 6 เดือน ดังนั้นเชื้อทั้งสองชนิดนี้จึงมี

ศักยภาพในการนำไปผลิตเชิงพาณิชย์ ต่อไปโดยใช้สูตรอาหารที่มีราคาต้นทุนการผลิตต่ำ และมีอายุการเก็บรักษาได้อย่างน้อย 3 เดือน โดยที่ยังคงมี ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในระดับสูง

Marina และคณะ (2018) แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) เป็นกลุ่มเฉพาะของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับพืช ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* และ *Burkholderia pyrrocinia* ได้นำมาทดสอบในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการควบคุมโรคข้าว โดยการทดสอบความอยู่รอดของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิต การจัดจำหน่าย การจัดเก็บ และการเก็บรักษาสายพันธุ์เหล่านี้ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์คือ การพัฒนาสูตรอาหารเหลวโดยผ่านกระบวนการที่เรียบง่าย ช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของแบคทีเรียเหล่านี้ เพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ได้ทดสอบในสูตร 32 สูตร ภายใต้อุณหภูมิการเก็บรักษา 2 อุณหภูมิ คือ 8 และ 28 องศาเซลเซียส เก็บรักษาจำนวน 64 ซ้ำ สำหรับแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งทำการทดสอบเป็นเวลา 180 วัน โดยการเติม : กากน้ำตาล, กลีเซอรอล, NaCl, PVP, $MgSO_4$, K_2HPO_4 และสารสกัดจากยีสต์ ผลการทดสอบพบว่าสูตรที่มีกากน้ำตาลเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ถือว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุด การอยู่รอดของจุลินทรีย์ หลังจากการทดสอบจึงเลือกสูตร 3 สูตร ที่มีการอยู่รอดของจุลินทรีย์มากที่สุด ของ *P. fluorescens* และ *B. pyrrocinia* ใน 10^8 CFU/ml. อย่างน้อย 90 และ 150 วัน ตามลำดับ

Subha และคณะ (2017) ผลของการเติมสารเติมแต่ง 3 ชนิด ได้แก่ polyvinyl pyrrolidone (PVP), gum arabic (GA) และกลีเซอรอล เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และการรอดชีวิต ของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟต (PSB) (*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ P-36) ในช่วงการเก็บรักษา การเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของ PSB มีการเจริญเติบโต และการรอดชีวิตสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่ประกอบด้วย กลีเซอรอล (1%) (8.225 log number of cells) เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovaskaya broth (6.000 log number of cell) หลังจากผ่านไป 30 วัน ของการเจริญเติบโตและการรอดชีวิต เติม gum arabic (GA), polyvinyl pyrrolidone (PVP) และกลีเซอรอล ความเข้มข้น 1% และ 2% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่มีกลีเซอรอล 1% (เติมหลังจากการเจริญเติบโต) การเก็บรักษาที่สูงขึ้นของ PSB พบได้ในโพลิเมอร์ที่เติมด้วย GA (1%, 2%) ตามด้วย PVP (1%, 2%) และกลีเซอรอล (1%, 2%) การรอดชีวิตของ PSB สูงขึ้น (8.879 และ 8.329 log no of cell) ในสารตั้งต้นที่เติมด้วย GA 2% เก็บรักษาภายใต้สภาวะที่มีการแช่เย็นเมื่อเทียบกับอุณหภูมิห้อง (7.784 and 7.304 log namber of cell) ที่เก็บข้อมูล 90 วัน และ 180 วัน ดังนั้นการเติม glycerol และ GA ลงใน Natrient broth (NB) ช่วยยืดรักษาอายุการเก็บรักษาของเชื้อจุลินทรีย์ได้ถึง 6 เดือน และช่วยในการรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินและผลผลิตพืชผลที่เหมาะสม

Sook-Kuan และคณะ(2016) ปุ๋ยชีวภาพสามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพดิน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และรักษาคุณภาพของดิน แบคทีเรียสายพันธุ์ *Rhodopseudomonas palustris* PS3 (PS3) ซึ่งแยกออกจากดินนาของไต้หวัน ไม่เพียงแต่มีผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืชเท่านั้น ยังมีประสิทธิภาพในการดูดซึมสารอาหารจากปุ๋ยได้ดีอีกด้วย การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเลือกสูตรที่

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

เหมาะสม ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในสารเติมแต่ง 6 ชนิด (alginate, polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrididone-40 (PVP), กลีเซอรีน, กลูโคส, และน้ำมันพืช) นำมาใช้ในสูตรที่เป็นของเหลว และทดสอบความสามารถในการปกป้องเซลล์ PS3 ในช่วงการเก็บรักษาในช่วงอุณหภูมิต่ำปานกลาง และสูงได้ ผลจากการทดสอบน้ำมันพืช (0.5%) มีจำนวนการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่สูง นอกจากนี้ผลของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยใช้กะหล่ำปลีจีนโดยเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์สูตรน้ำมีค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของหน่อ มีนัยสำคัญเพิ่มขึ้น 10-27% น้ำมันพืชถือเป็นน้ำมันที่ปลอดภัยต้นทุนต่ำและใช้งานง่าย วัสดุและสูตรนี้จะอำนวยความสะดวกต่อการใช้งานจริงของสายพันธุ์ PS3 ในการเกษตร

Karunya และ Reecha (2014) ในสถานการณ์ปัจจุบันความใส่ใจระหว่างประเทศที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับคุณภาพอาหาร และสิ่งแวดล้อม การใช้จุลินทรีย์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) เพื่อลดปริมาณสารเคมีในการเกษตรเป็นประเด็นที่มีความสำคัญ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ที่ทนต่อความเค็ม ได้แก่ PGPR สายพันธุ์ *Azospirillum brasilense* PA-17 *Bacillus subtilis* PB-15 และ *Pseudomonas fluorescens* PP-15 ถูกค้นพบจากดินแดนชายฝั่งของรัฐทมิฬนาฑู การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ได้เติมสารทดสอบที่แตกต่างกัน ได้แก่ Lignite, pressmud และ vermiculite เป็นระยะเวลา 6 เดือน ในทางเดียวกันการรอดชีวิตของ PGPR ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้รับการทดสอบในสูตรของเหลว ที่มีการปรับปรุงด้วยสารเติมแต่งที่ต่างกัน เช่น PVP, trehalose และ glycerol เป็นระยะเวลา 6 เดือน ผลจากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอด (1×10^8 เซลล์/ml) เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อน้ำเกลือ Lignite, pressmud, vermiculite, PVP อัตราส่วน 1% ช่วยให้จุลินทรีย์ของ PGPR เพิ่มมากขึ้น มีชีวิตรอดเกิน 6 เดือน ของระยะเวลาการเก็บรักษา โดยไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญใดๆ

Leo และคณะ (2013) การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงผลกระทบของพอลิเมอร์ สารเติมแต่ง และสารลดแรงตึงผิว สำหรับความสามารถในการยืดอายุการเก็บรักษา และประสิทธิภาพทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เหลว (*Bacillus megaterium* หรือ *phosphaticum, Azospirilum brazilense* และ *Azotobacter chrococcum*) ที่เติมด้วย 2% polyvinyl pyrollidone (PVP 30 K), 0.1% carboxy methylcellulose (CMC-high density) และ 0.025% Polysorbate 20 ที่ได้รับการส่งเสริมการรอดชีวิตระยะยาวของ *Bacillus megaterium* หรือ *phosphaticum*, *Azospobill* และ *Azotobacter* ที่มีขนาด $5.6\text{x}10^7$, $1.9\text{x}10^8$ และ $3.5\text{x}10^7$ CFU/ml. ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้ 480 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์กับ PSB และ *Azospirillum brasilense* ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการทำงานร่วมกันเมื่อเทียบกับการใช้จุลินทรีย์เพียงอย่างเดียว

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือ เครื่องใช้

3.1.1.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.1.1.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.1.3 ห่วงเขี่ยเชื้อ

3.1.1.4 แท่งแก้วรูปตัววี

3.1.1.5 เครื่องเขย่าสาร

3.1.1.6 หลอดทดลอง (Test Tube) ยี่ห้อ Glassco

3.1.1.7 พาราฟิล์ม

3.1.1.8 หม้อนึ่งความดันไอ Autocclave ยี่ห้อ TOMY SS-325 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) บริษัท ANDREAS Hettich

3.1.1.10 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) บริษัท IKA WORKS (ASIA) SDN

3.1.1.11 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Inclubator) บริษัท CONTHRM SCIENTIFIC LTD.

3.1.1.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar air flow) บริษัท CYAYSON LABORATORY

3.1.1.13 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.1.1.14 หลอดเก็บเชื้อ (Eppendorf)

3.1.1.15 หลอดเซนทริฟิวส์ (Centrifuge)

3.1.1.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) บริษัท ThermoSpectonic

3.1.1.17 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ OHAUS® ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2.1 Trypticase Soy Broth (TSB)

3.1.2.2 Trypticase Soy Agar (TSA)

3.1.2.3 Pikovskaya's Agar (PA)

3.1.2.4 L-tryptophan

3.1.2.5 indole-3-acetic acid

3.1.2.6 สารละลาย Salkovski's

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

3.1.2.7 สารละลาย Sodium phosphate (pH 7)

3.1.2.8 สารละลาย Sodium chlorite ความเข้มข้น 0.85 %

3.1.2.9 แอลกอฮอล์ 70 %

3.1.2.10 แอลกอฮอล์ 95 %

3.1.2.11 3% hydrogenperoxide

3.1.3 สารเติมแต่ง

3.1.3.1 แป้งมันสำปะหลัง (Starch)

3.1.3.2 Skim milk

3.1.3.3 Glyceral

3.1.3.4 Polyvinyl pyrrollidone (PVP)

3.1.3.5 Polyethylene glycol (PEG 6000)

3.1.4 แบคทีเรีย

1.4.1 *Bacillus altitudinis* T17

3.1.4.2 *Bacillus stratospherious* L19

3.1.4.3 *Bacillus thuringiensis* B2

3.1.4.4 *Jeotgalicoccus* sp. RA11

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย และสถานที่ทดลอง/เก็บข้อมูล

ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้นำเชื้อแบคทีเรียทนแล้งมาใช้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. altitudinis* T17, *B. stratospherious* L19, *B. thuringiensis* B2 และ *Jeotgalicoccus* sp. RA11

3.2.1 การเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียระยะยาวในสารเติมแต่งชนิดต่างๆ

3.2.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทนแล้งทั้ง 4 สายพันธุ์ ในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำเชื้อที่เจริญใส่หลอด Centrifuge ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์

3.2.1.2 เทส่วนใสออกแล้วล้างตะกอนเซลล์แต่ละตัวด้วย Sodium phosphate (pH 7) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที

3.2.1.3 เทส่วนใสออกแล้วนำตะกอนเซลล์แต่ละตัวมาเจือจางด้วย Sodium phosphate (pH 7) ในสัดส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร (OD_{625}) เท่ากับ 1

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

3.2.1.4 นำตะกอนเซลล์แต่ละตัวที่วัดค่าดูดกลืนแสงแล้ว มาใส่ในสารเติมแต่ง ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วน 0.1% และ 0.5% ส่วน Skim milk, Glyceral, Polyvinyl pyrrollidone (PVP) และ Polyethylene glycol (PEG6000) อัตราส่วน 1% และ 2%

3.2.2 การคัดเลือกสารเติมแต่งที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ในสารละลายสูตรน้ำ

คัดเลือกสารเติมแต่งที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ในสารละลายสูตรน้ำ จากข้อ 3.2.1 โดยทำการนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตซึ่งใช้วิธี spread plate ตั้งแต่ทำการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียวันที่ 0, 7, 14, 21, 28 วัน และจากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 เดือน จนครบ 5 เดือน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) ด้วยวิธี spread plate ทำการ Dilution ละ 3 ซ้ำ เพื่อหาสารเติมแต่งที่เชื้ออยู่รอดและเจริญได้ดีที่สุด โดยคำนวณเป็น CFU/ml

3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง

ทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในแบคทีเรียทนแล้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. altitudinis* T17, *B. stratospherious* L19, *B. thuringiensis* B2 และ *Jeotgalicoccus* sp. RA11 ทั้งก่อนทำการเก็บรักษา และภายหลังเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 5 เดือน

3.2.3.1 ทดสอบวิเคราะห์การผลิตสาร Indole-3-acetic acid (IAA)

- นำเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง 4 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) ที่เติม L-tryptophan 0.5 กรัมต่อลิตร
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 4,300 รอบ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ส่วนใส (Supernatant)
- เก็บเฉพาะส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Salkowski's reagent 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาพไร้แสง เป็นเวลา 30 นาที
- นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (OD_{530})

3.2.3.2 การทดสอบ Catalast test

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจากอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) ป้ายลงบนแผ่นสไลด์ หยด 3% hydrogenperoxide ลงบนเชื้อ สังเกตการณ์เกิดฟอง

ผลบวก : มีฟองอากาศเกิดขึ้น

ผลลบ : ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

3.2.3.3 ทดสอบการย่อย Phosphate

หยดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Pikovskaya's agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดการย่อย Phosphate และบันทึกผล

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

3.2.4 การทดสอบสูตรอาหารราคาถูกที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มจำนวนแบคทีเรียทนแล้ง

ในขั้นตอนนี้จะพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำภายหลังการเก็บรักษาหัวเชื้อจากข้อ 13.1 โดยใช้กากน้ำตาล (molasses) เพื่อลดต้นทุนการผลิตและสะดวกต่อการนำไปใช้งานของเกษตรกร กากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซูโครส น้ำตาลอินเวิร์ท วิตามินบี 1 วิตามินบี 3 หรือไนอะซิน วิตามินบี 5 วิตามินบี 6 โพแทสเซียม และแคลเซียม (นพพล เล็กสวัสดิ์, 2552) โดยมีน้ำตาลที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ประมาณ 50% (w/v) ดังนั้นจึงสนใจที่จะใช้สูตรอาหาร molasses broth medium ที่เตรียมจากกากน้ำตาลตามรายงานของ Behera และคณะ (2012) เป็นต้นแบบในการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรีย

การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรีย ทำโดยนำแบคทีเรียทนแล้งแต่ละสายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนเซลล์ในสูตรอาหาร molasses broth medium (Behera et al., 2012) ที่แปรผันปริมาณสารละลายกากน้ำตาลตั้งแต่ 0-20% (w/v) และใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน แปรผันปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ตั้งแต่ 0-1% ปรับความขุ่นให้ได้อย่างน้อย 10^5 CFU/มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดปลอดเชื้อตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำหัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำมาตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด เพื่อหาสูตรที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิดสำหรับใช้ในหัวข้อ 3.2.5

3.2.5 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียภายหลังการเก็บรักษาและการทดสอบการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในระดับกระถาง

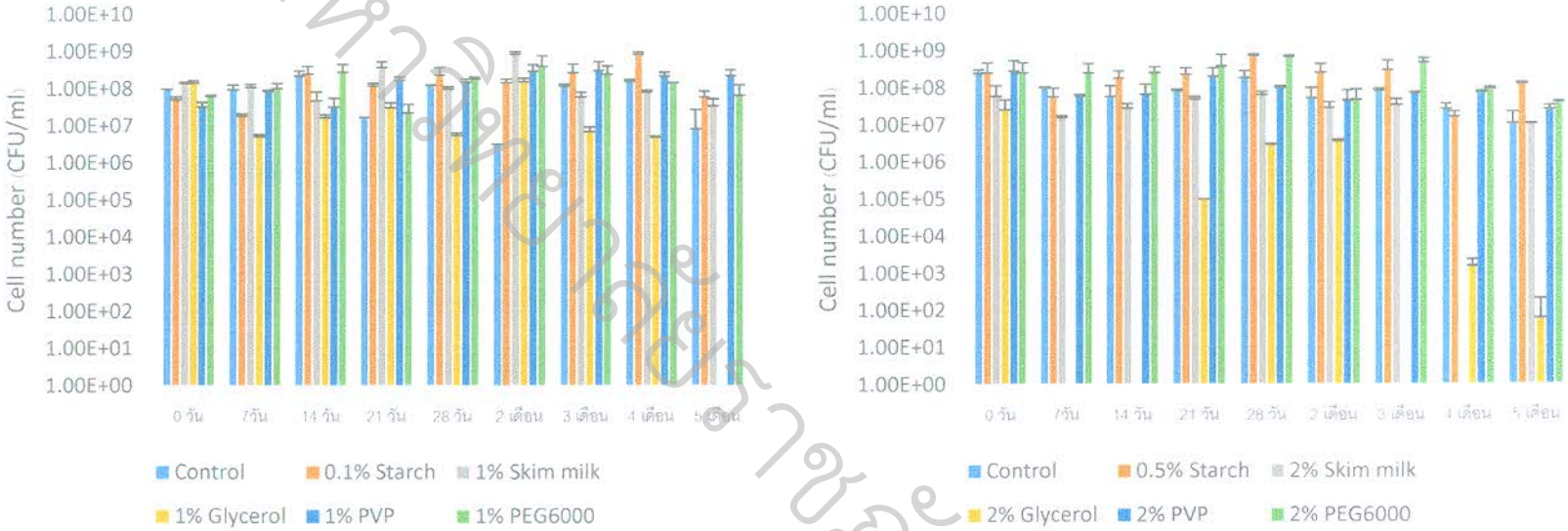
คัดเลือกแบคทีเรียจากหัวข้อ 3.2.3 มาทำการเคลือบเมล็ดข้าวด้วย carboxy methyl cellulose (CMC) ก่อนเพาะในกระบะปลูกให้ได้ต้นกล้าเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เคลือบเมล็ดข้าว เมื่อข้าวมีอายุได้ 7 วัน นำมาข้าวมาวัดความยาวราก วัดรอบลำต้น นับใบ นับจำนวนราก และนับจำนวนแบคทีเรียรอบรากข้าว จากนั้นนำข้าวมาปลูกลงกระถาง กระถางละ 3 ต้น ในระหว่างการเจริญของต้นข้าวจะมีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในระยะข้าวแตกกอ และระยะก่อนปล่อยแล้ง ให้น้ำต้นข้าวจนกระทั่งต้นข้าวเข้าสู่ระยะออกดอก ซึ่งเป็นระยะที่ข้าวไวต่อความแห้งแล้งมากที่สุด จึงหยุดให้น้ำเป็นเวลา 12 วัน หรือจนกว่าต้นข้าวจะมีใบเหลืองซีดจากปลายใบลงมาถึงครึ่งต้นในชุดควบคุม จากนั้นกลับมาให้น้ำแก่ต้นข้าวปกติจนถึงระยะเก็บเกี่ยว นับปริมาณผลผลิตเมล็ดข้าว ความสูงของต้นข้าว นับจำนวนแบคทีเรียรอบรากข้าว และการมีชีวิตรอดของต้นข้าวภายใต้สภาวะแล้งเปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุม

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกสารเติมแต่งที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งในสารละลายสูตรน้ำ

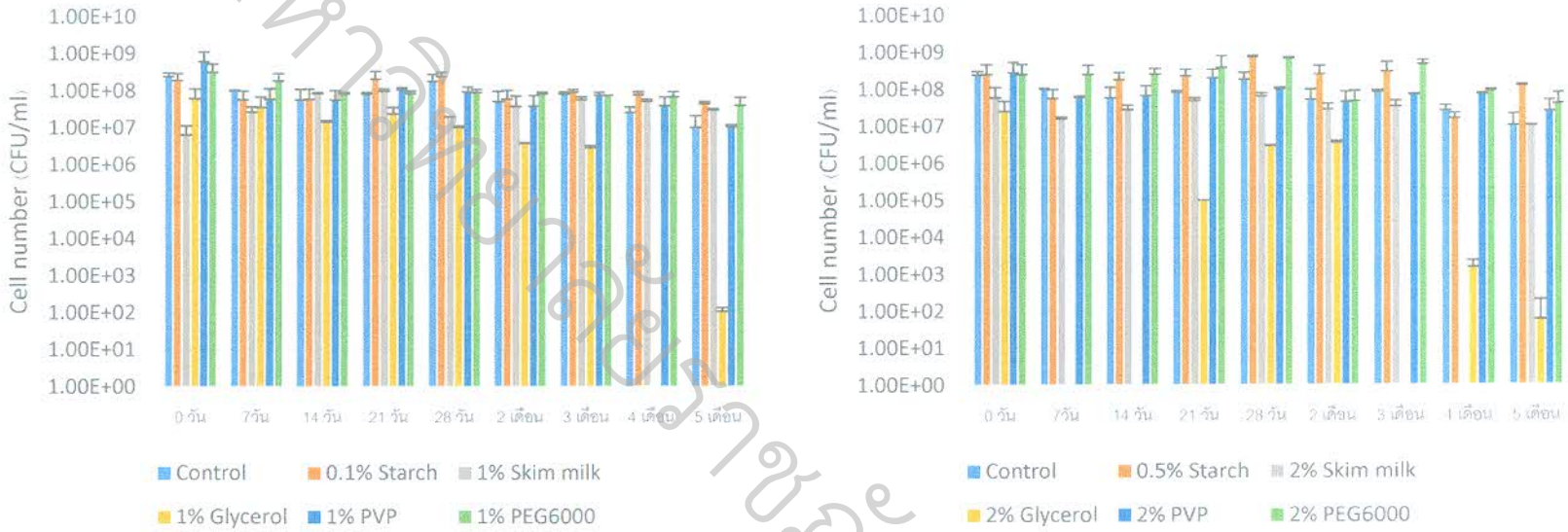
จากผลการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ในสารเติมแต่ง 1 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างกัน ในระยะเวลา 5 เดือน พบว่าสารละลายเติมแต่ง 0.1% Starch และ 1% PVP มีจำนวนของเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียทนแล้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า 0.1% Starch และ 1% PVP มีตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง เมื่อเทียบกับ Control ที่ไม่พบตัวเซลล์ของแบคทีเรียทนแล้ง ส่วนเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่เหมาะสำหรับนำมาเก็บรักษาในสารละลายสูตรน้ำ ได้แก่ *B. altitudinis* T17 เนื่องจาก *B. altitudinis* T17 มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่เริ่มทำการเก็บรักษาจนถึงระยะเวลา 5 เดือน จากผลการวิจัยของ Deaker พบว่าสาร PVP มีค่า water binding capacity สูงจึงสามารถคงความชื้นโดยการยึดเกาะน้ำบริเวณรอบ ๆ เซลล์ได้มากขึ้น จึงทำให้เซลล์สามารถใช้น้ำในกระบวนการต่าง ๆ และยืดอายุการเก็บรักษาได้ ในขณะที่แป้งมันสำปะหลัง มีคุณสมบัติความเหนียวเช่นกัน นอกจากนี้ยังสามารถยึดเกาะเซลล์เข้าไว้ด้วยกันโดยยังสามารถลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในรูปของ colloid ซึ่งทำให้อากาศที่อยู่ในอาหารสามารถเข้าถึงเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีกว่าการที่เซลล์ตกตะกอนอยู่ด้านล่างของภาชนะบรรจุ ดังนั้นจึงอาจเป็นกลไกที่ทำให้เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่รอด และยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น ในขณะที่ Glycerol มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียลดลง จึงไม่เหมาะที่จะนำมาเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง จากรายงานการวิจัยของพูนสุข และคณะ พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถใช้ Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



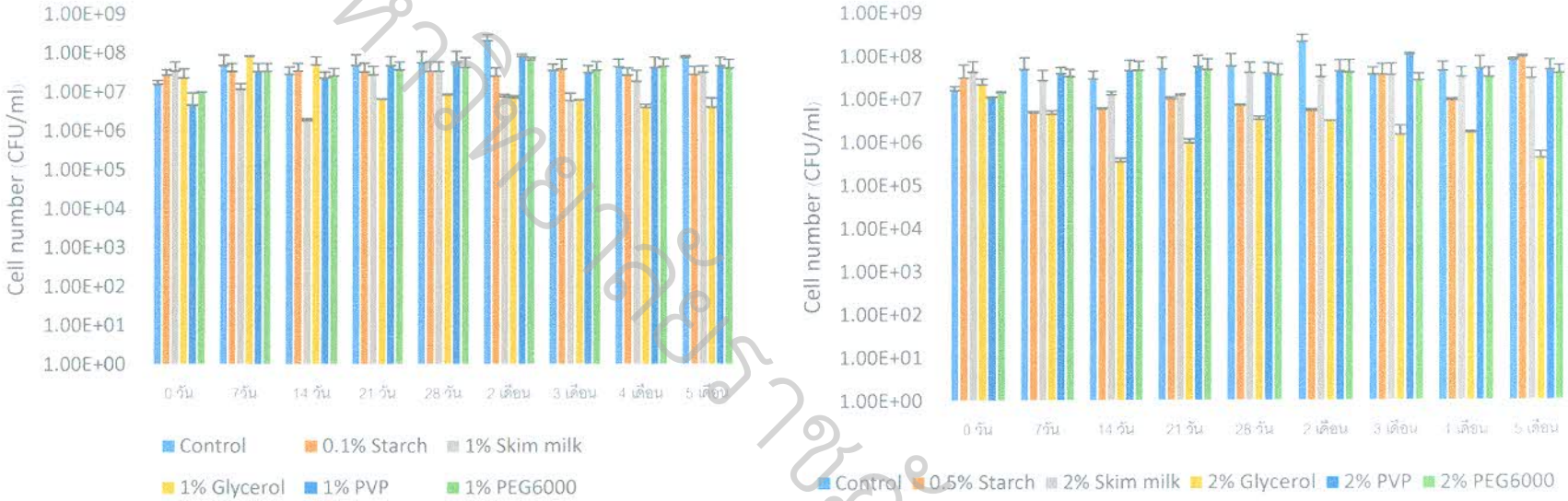
ภาพที่ 1 จำนวนของ *B. altitudinis* T17 ที่เก็บรักษาในสารเติมแต่งเพียงชนิดเดียวของสารละลายสูตรน้ำ ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% และ 2%

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



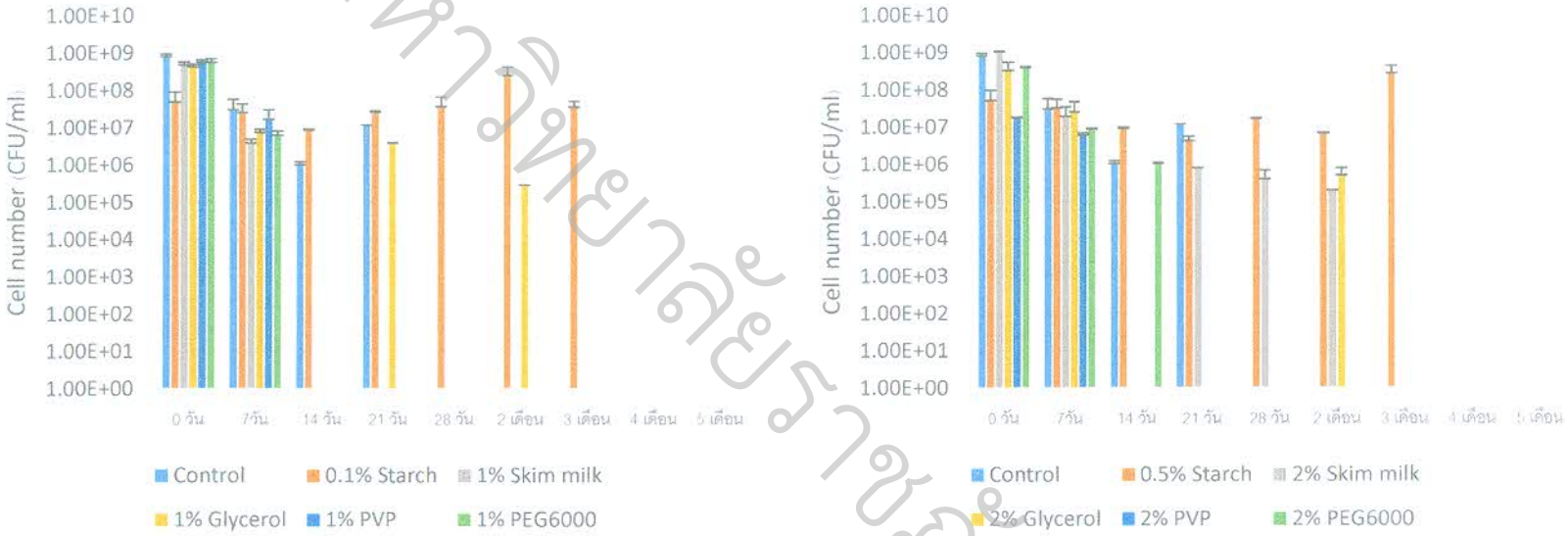
ภาพที่ 2 จำนวนของ *B. stratospherious* L19 ที่เก็บรักษาในสารเติมแต่งเพียงชนิดเดียวของสารละลายสูตรน้ำ ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% และ 2%

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



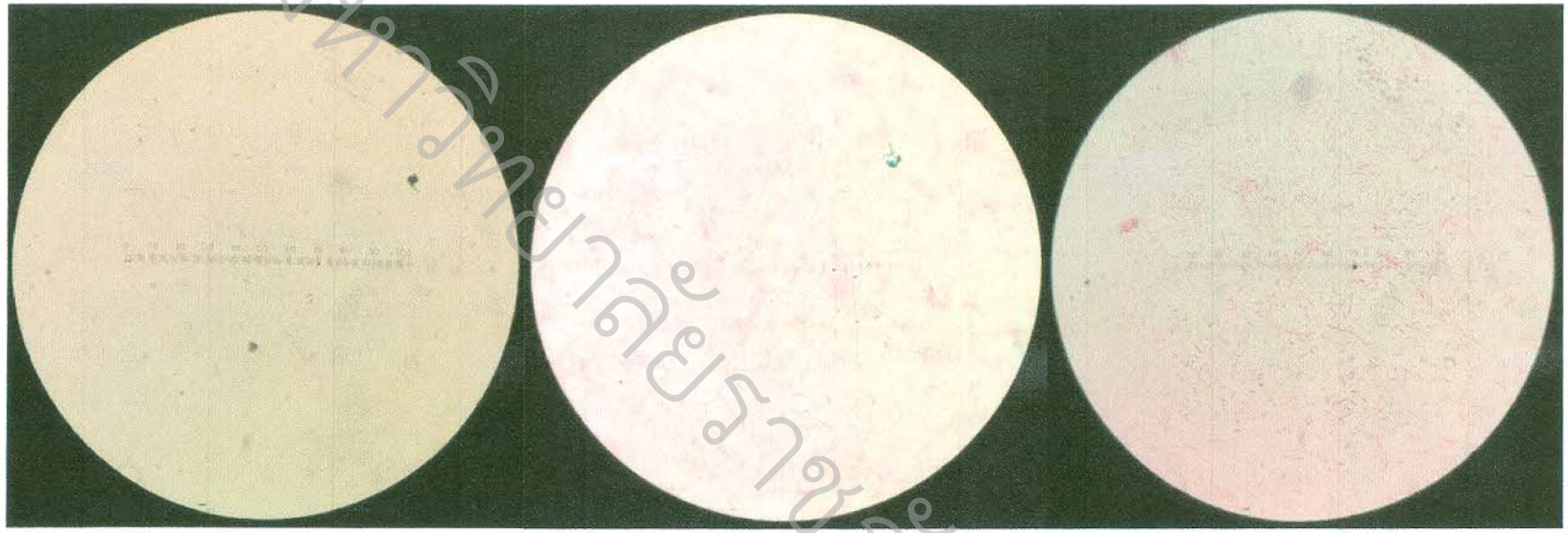
ภาพที่ 3 จำนวนของ *B. thuringiensis* B2 ที่เก็บรักษาในสารเติมแต่งเพียงชนิดเดียวของสารละลายสูตรน้ำ ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% และ 2%

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครพนม



ภาพที่ 4 จำนวนของ *Jeotgalicoccus* sp. RA11 ที่เก็บรักษาในสารเติมแต่งเพียงชนิดเดียวของสารละลายสูตรน้ำ ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% และ 2%

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครพนม



Control 1% PVP 0.1% Starch

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรียทนแล้ง *B. altitudinis* T17 ภายหลังการเก็บรักษา 5 เดือน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

4.2 การทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในแบคทีเรียทนแล้ง

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชมีหลากหลายวิธี ซึ่งมีวิธีการศึกษาที่แตกต่างกัน เนื่องจากข้อจำกัดด้านเวลา งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตฮอร์โมน IAA การละลายฟอสเฟต และการผลิตเอนไซม์ Catalase ทั้งก่อนการเก็บรักษาและภายหลังการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียนทนแล้ง เป็นเวลา 5 เดือน เพราะเป็นวิธีการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก และใช้เวลาสั้น ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งพบว่า *B. altitudinis* T17 หลังจากเก็บรักษาในระยะเวลา 5 เดือน มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูง โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสอยู่ที่ 3.3 มิลลิเมตร ทั้งนี้ความสามารถในการละลายฟอสเฟตจะสัมพันธ์กับการส่งเสริมการเจริญของพืชทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ Catalase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในสภาวะแห้งแล้งและลดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และยังมีความสามารถในการผลิต IAA ได้ดีกว่าแบคทีเรียทนแล้งชนิดอื่น

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบการผลิตฮอร์โมน IAA การละลายฟอสเฟต และการผลิตเอนไซม์ Catalase ของเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ทั้งก่อนการเก็บรักษาและภายหลังการเก็บรักษา 5 เดือน

แบคทีเรียทนแล้ง	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลาง:มม.)		การผลิต Catalase		การผลิต IAA (µM)	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
B. altitudinis T17	4.3	3.5	+	+	20.25	16.824
B. stratosphericus L19	18.0	3.3	+	+	21.25	15.059
B. thuringiensis B2	6.0	4.3	+	+	31.25	0.877
Jeotgalicoccus sp. RA11	1.00	ND	+	ND	51.40	ND

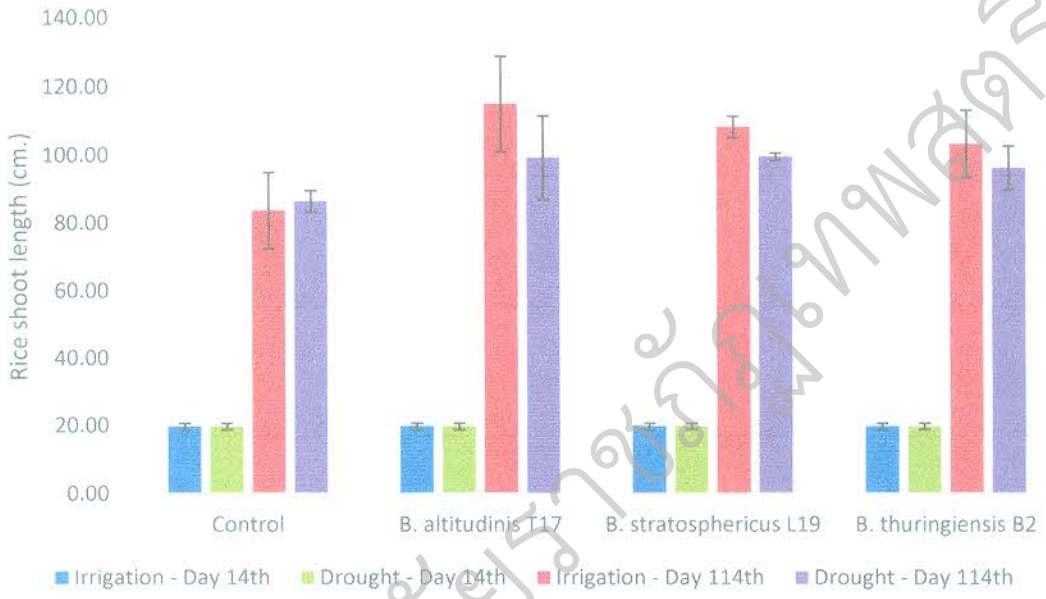
ND = NOT Detected

\+ = เกิดฟองอากาศ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียภายหลังการเก็บรักษาและการทดสอบการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในระดับกระถาง

เนื่องจากการทดลองเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ทำให้พบว่า *Jeotgarilcoccus* sp. RA11 ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึงเดือนที่ 5 ของการเก็บรักษา ดังนั้นในการทดสอบประสิทธิภาพภายหลังการเก็บรักษาเชื้อ จึงมีเพียงการทดสอบของเชื้อที่เหลืออยู่ 3 ชนิด ได้แก่ *B. altitudinis* T17, *B. stratosphericus* L19 และ *B. thuringiensis* B2 ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 6



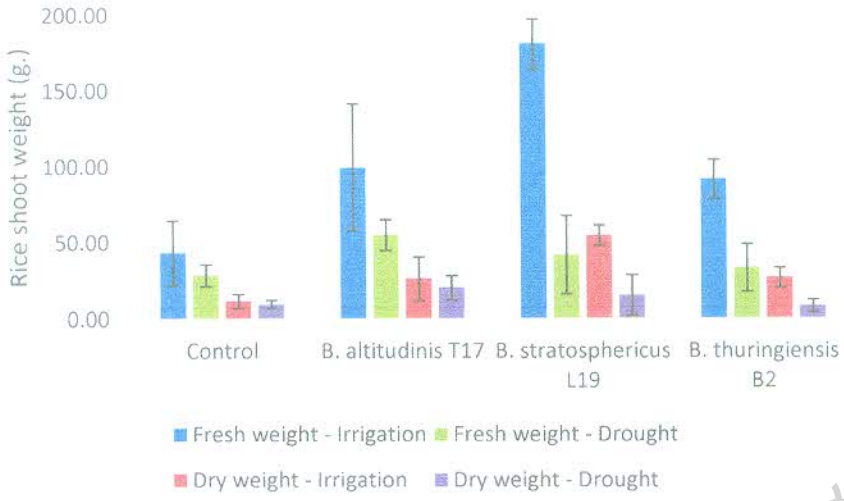
ภาพที่ 6 การเจริญของต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105

จากการทดลองปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยแบคทีเรียทนแล้ง ทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย พบว่าภายหลังจากการงดให้น้ำเป็นเวลา 12 วัน ต้นข้าวมีอาการใบเหลืองซีด และใบเหี่ยว โดยเฉพาะในชุดควบคุม เมื่อกลับมาให้น้ำอีกครั้งพบว่าต้นข้าวสามารถฟื้นสภาพขึ้นมาได้ทั้งชุดควบคุมและชุดทดลอง แต่ลักษณะของต้นในชุดทดลองแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด สามารถฟื้นได้เร็วกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ในช่วงเวลาที่งดให้น้ำนั้น ลักษณะของใบข้าวของชุดทดลองยังมีความสดมากกว่าชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ชุดทดลองแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีสภาวะการเจริญหลังจากปล่อยแล้งได้ดีเท่า ๆ กัน ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปอาจมีการนำเชื้อทั้ง 3 ชนิดมาผสมในอัตราส่วนที่เท่า ๆ กันก่อนทำการปลูกข้าว จากรายงานของ Timmusk และคณะ (2014) ได้คัดแยกแบคทีเรียรอบรากพืชตระกูลหญ้าที่ขึ้นบนภูเขาในพื้นที่แห้งแล้ง คือ *B. thuringiensis* AZP2 พบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวสาลีภายใต้สภาวะแล้งจากการขาดน้ำได้ดี เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทั้งยังเพิ่มกระบวนการสังเคราะห์แสงและมวลชีวภาพของต้นข้าวสาลี โดยตรวจสอบจากการวัดการเปลี่ยนแปลง

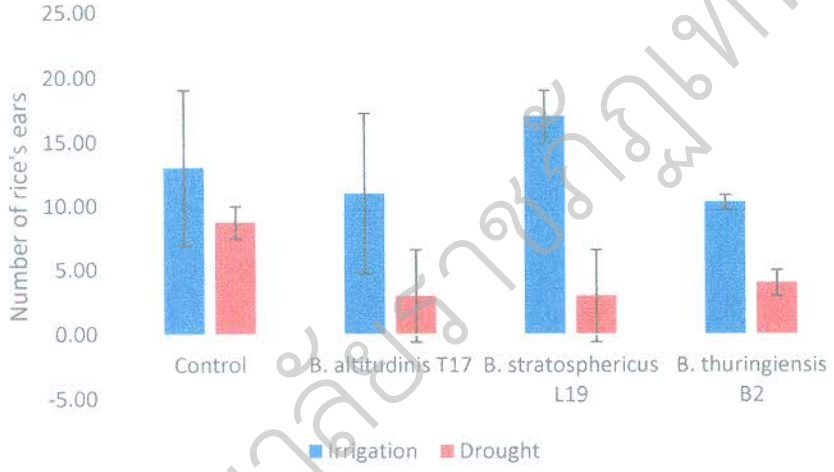
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

องค์ประกอบของสารระเหยและอัตราการปลดปล่อยของสารระเหยจากใบข้าวสาลี ด้วยวิธีการวิเคราะห์ GC-MS ซึ่งเป็นวิธีการใหม่สำหรับตรวจสอบพืชที่ทนต่อสภาวะเครียดที่มีประสิทธิภาพ ทั้งยังสามารถอธิบายประสิทธิภาพของแบคทีเรียแต่ละชนิดในการส่งเสริมให้พืชทนต่อสภาวะเครียด โดยผลการทดลองพบว่าต้นข้าวสาลีที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียลงไปสามารถลดการปลดปล่อยสารระเหยที่นำมาเปรียบเทียบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ benzaldehyde, geranyl acetone และ β-pinene เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวสาลีที่ไม่ได้เติมเชื้อแบคทีเรียเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะแล้ง และนอกจากนี้อัตราการปลดปล่อยของสารระเหยที่มากขึ้น ส่งผลต่อการรอดชีวิตของของข้าวสาลีลดลงในสภาวะแล้ง

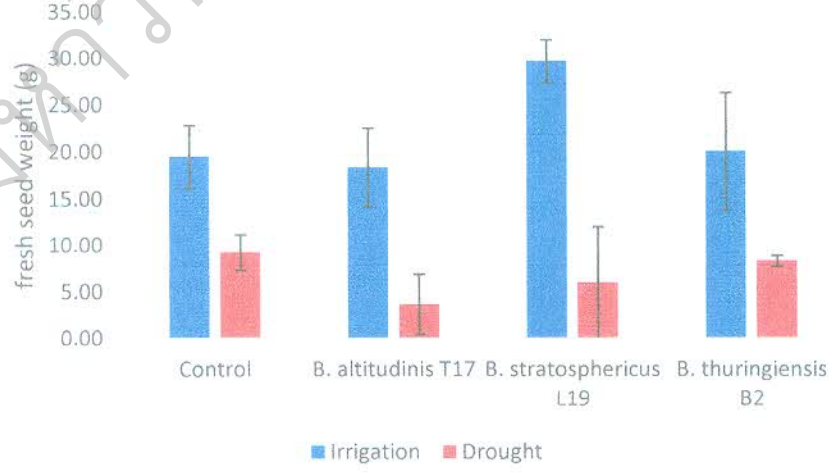
มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี



ภาพที่ 7 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวภายหลังการเก็บเกี่ยว



ภาพที่ 8 จำนวนรวงข้าวของต้นข้าว



ภาพที่ 9 น้ำหนักสดของเมล็ดข้าว

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ตารางที่ 2 ผลการนับเชื้อของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนปลูกและช่วงเก็บผลผลิตจากรอบรากข้าวในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง

ชุดทดสอบ	ผลการนับเชื้อของรากข้าว (CFU/g)		
	เมล็ดก่อนปลูก	บริเวณรอบรากวันสุดท้าย	
		สภาวะปกติ	สภาวะแล้ง
ชุดควบคุม	$5.4\times10^{9}\pm 0.8\times10^{9}$	$7.15\times10^{6}\pm 0.53\times10^{6}$	$4.50\times10^{6}\pm 1.35\times10^{6}$
B. altitudinis T17	$5.4\times10^{9}\pm 0.8\times10^{9}$	$7.00\times10^{6}\pm 2.31\times10^{6}$	$4.50\times10^{6}\pm 1.05\times10^{6}$
B. stratosphericus L19	$5.4\times10^{9}\pm 0.8\times10^{9}$	$6.00\times10^{6}\pm 0.70\times10^{6}$	$6.04\times10^{6}\pm 0.68\times10^{6}$
B. thuringiensis B2	$5.4\times10^{9}\pm 0.8\times10^{9}$	$4.00\times10^{6}\pm 0.82\times10^{6}$	$3.20\times10^{6}\pm 0.78\times10^{6}$

จากการทดลองพบว่าผลผลิตที่ได้จากการปลูกข้าวด้วย *B. stratosphericus* L19 ให้ผลผลิตดีที่สุด จำนวนเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากของต้นข้าวก็มีปริมาณไม่ต่างกัน อยู่ในช่วง 10^{6} CFU/g ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตที่เกาะบนผิวรากข้าวโดยทั่วไปก็อยู่ในช่วงนี้ แต่ชนิดของแบคทีเรียที่เกาะอาจมีผลต่อการเจริญและการกระตุ้นการทนแล้งของต้นข้าวได้ดีกว่าก็เป็นได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สรุป

จากการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่เติมสารเติมแต่ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างกัน ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต (pH 7) ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^9 และเก็บรักษาในหลอดเก็บเชื้อ (eppendorf) เป็นระยะเวลา 5 เดือน ระหว่างการเก็บรักษาจะทำการนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตซึ่งใช้วิธี spread plate และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ตั้งแต่วันที่ 0, 7, 14, 21 และ28 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 เดือน จนครบ 5 เดือน พบว่าการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ในสารละลายเติมแต่ง 1 ชนิด 0.1% Starch และ 1% PVP มีจำนวนของเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียทนแล้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า 0.1% Starch และ 1% PVP มีตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง เมื่อเทียบกับ Control ที่ไม่พบตัวเซลล์ของแบคทีเรียทนแล้ง และการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง ในสารละลายเติมแต่ง 2 ชนิด ที่นำมาผสมเข้าด้วยกัน 1% Skim milk+1% PEG6000 มีจำนวนของเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียทนแล้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า 1% Skim milk+1% PEG6000 มีตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียอยู่ เมื่อเทียบกับ Control ที่ไม่พบตัวเซลล์ และเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง *B. altitudinis* T17 เหมาะสำหรับนำมาเก็บรักษาในสารละลายสูตรน้ำมากที่สุด เนื่องจากมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และยังคงมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืชดีกว่าแบคทีเรียทนแล้งชนิดอื่น

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญในสารละลายเติมแต่งที่แตกต่างกัน และสารเติมแต่งเหล่านี้สามารถเป็นตัวเลือกที่ดีในการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งในระยะยาวได้

2. ข้อเสนอแนะ

ควรนำงานวิจัยนี้ไปพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น และควรจะได้ทดลองหาสูตรที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรีย *Jeotgarilcoccus* sp. RA11 ต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

เอกสารอ้างอิง

โชคชัย วนภู. 2556. การพัฒนาหัวเชื้อ PGPR เพื่อการเก็บรักษาระยะยาว. ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2550. เข้าถึงจาก 203.158.6.11:8080/sutir/bitstream/ 123456789/4605/2/Fulltext.pdf. เข้าถึงเมื่อ 5 กุมภาพันธ์ 2560.

ธวัชชัย ณ นคร. 2526. ความสัมพันธ์ระหว่างดิน น้ำและพืช. วารสารวิชาการเกษตร 1:186-194.

นพพล เล็กสวัสดิ์. 2552. กระบวนการ R-phenylacetylcarbinol ไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นแบบสองเฟสที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพชนิดเซลล์รวมในสภาวะเขย่า. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

นันทกร บุญเกิด, หนึ่ง เตียอำรุง, กมลลักษณ์ เทียมไธสง. 2552. การพัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ย อินทรีย์ชีวภาพในเชิงธุรกิจ. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สายัณห์ สดุดี 2534 สภาวะขาดน้ำในการผลิตพืช ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ.

หนึ่ง เตียอำรุง 2549 การรวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์ Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., and Hernandez, J.P. 2014. Advances in plant growth- promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant Soil. 378:1–33.

Behera, S., Mohanty, R.C. and R. R.C, Ray. 2012. Ethanol fermentation of sugarcane molasses by Zymomonas mobilis MTCC 92 immobilized in Luffa cylindrica L. sponge discs and Ca- alginate matrices. Brazilian Journal of Microbiology. 1499-1507.

Bouman, B.A.M., S. Peng, A.R. Castaòeda and R.M. Visperas. 2005. Yield and water use of irrigated tropical aerobic rice systems. Agricultural Water Management 74(2): 87-105.

Glick, B.R. 2013. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiologyical Research. 169:30-39.

Gholami, A., S. Shahsavani, and S. Nezarat. (2009). The effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. World Acad. Sci. Technol. 49: 19-24.

Ji, K., Wang, Y., Sun, W., Lou, Q., Mei, H., Shen, S. and Chen, H. 2012. Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. Journal of Plant Physiology 169: 336– 344.

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

Kamoshita, A., R. Rodriguez, A. Yamauchi and L. Wade. 2004. Genotypic variation in response of rainfed lowland to prolonged drought and rewatering. Plant Production Science 7(4): 406- 420.

Kanungo, P. K., Ramakrishnan, B. and Rao, V. R. (1997). Placement effect of organic sources on nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria in flooded rice soils. Biology and Fertility of Soils 25, 103-108.

Pandey, V. and Shukla, A. 2015. Acclimation and tolerance strategies of rice under drought stress. Rice Science. 22: 147-161.

Singh, M. S., Devi, R. K. T. and Singh, N. I. (1999). Evaluation of methods for *Azotobacter* application on the yield of rice. Indian Journal of Hill Farming 12, 22-24.

Tavassoli, M., Javadi, S., Naem, S. and Vahed, G. 2009. Effects of different concentrations of DMSO and glycerol on cryopreservation of *Trichomonas gallinae*. International Journal of Veterinary Science and Research. 3: 83-86.

Vardharajula, S., Ali, Z.S., Grover, M., Reddy, G and Bandi, V. 2011. Drought-tolerant Plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. Journal of Plant Interactions 6:1-14.

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมตัวทำละลายชนิดต่างๆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

- Tryptic soya broth 30 กรัม
- Agar 15 กรัม
- น้ำ 1,000 มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

- Tryptic soya broth 30 กรัม
- น้ำ 1,000 มิลลิลิตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar

- Pikovskaya's agar 31.30 กรัม
- น้ำ 1,000 มิลลิลิตร

4. Normal saline 0.85 %

- Normal saline 8.5 กรัม
- น้ำ 1,000 มิลลิลิตร

5. 3% hydrogenperoxide

- 6% hydrogenperoxide 100 ml.
- น้ำ 100 ml.

6. การเตรียม Salkovski's reagent

1. 0.5 M $FeCl_3$

- $FeCl_3$ 13.52 กรัม
- conc HCL 20 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

*เก็บใส่ขวดสีชา แล้วแช่ตู้เย็น

2. 35% $HCLO_4$

- $HCLO_4$ 35 มิลลิลิตร
- น้ำ 65 มิลลิลิตร (เทกรดใส่น้ำ)

*เก็บใส่ขวดสีชา แล้วแช่ตู้เย็น

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

7. Stock IAA 10 mM.

- IAA 0.752 กรัม
- 50% Methanol 100 มิลลิลิตร

* เก็บในขวดสีชา และแช่ตู้เย็น

8. การเตรียมตัวอย่าง IAA

ความเข้มข้นของ IAA 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400

50 $C_1V_1 = C_2V_2$

$(1\times10^{-3}\ m)\ V_1 = (50\times10^{-6}\ m)(10\ ml)$

$V_1 = (50\times10^{-6}m)(10\ ml)/(1\times10^{-3}m)$

$= 50\times10^{-3}m(10\ ml)$

$= 50\times10^{-2}\ m$

V_1 = 0.5 ml/met 9.5 ml

100 $C_1V_1 = C_2V_2$

$(1\times10^{-3}\ m)\ V_1 = (100\times10^{-6}\ m)(10\ ml)$

$V_1 = (100\times10^{-6}\ m)(10\ ml)/\ (1\times10^{-3}\ m)$

$= 100\times10^{-3}\ m\ (10\ ml)$

$= 100\times10^{-2}\ m$

V_1 = 1 ml/met 9 ml

150 $C_1V_1 = C_2V_2$

$(1\times10^{-3}\ m)\ V_1 = (150\times10^{-6}\ m)(10\ ml)$

$V_1 = (150\times10^{-6}\ m)(10\ ml)/\ (1\times10^{-3}\ m)$

$= 150\times10^{-3}\ m\ (10\ ml)$

$= 150\times10^{-2}\ m$

V_1 = 1.5 ml/met 8.5 ml

200 $C_1V_1 = C_2V_2$

$(1\times10^{-3}\ m)\ V_1 = (200\times10^{-6}\ m)(10\ ml)$

$V_1 = (200\times10^{-6}\ m)(10\ ml)/\ (1\times10^{-3}\ m)$

$= 200\times10^{-3}\ m\ (10\ ml)$

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

$= 200\times10^{-2}$ m

V_1 = 2 ml/met 8 ml

250 $C_1V_1 = C_2V_2$

$(1\times10^{-3}\ m)\ V_1 = (250\times10^{-6}\ m)(10\ ml)$

$V_1 = (250\times10^{-6}\ m)(10\ ml)/\ (1\times10^{-3}\ m)$

$= 250\times10^{-3}$ m (10 ml)

$= 250\times10^{-2}$ m

V_1 = 2.5 ml/met 7.5 ml

300 $C_1V_1 = C_2V_2$

$(1\times10^{-3}\ m)\ V_1 = (300\times10^{-6}\ m)(10\ ml)$

$V_1 = (300\times10^{-6}\ m)(10\ ml)/\ (1\times10^{-3}\ m)$

$= 300\times10^{-3}$ m (10 ml)

$= 300\times10^{-2}$ m

V_1 = 3 ml/met 7 ml

350 $C_1V_1 = C_2V_2$

$(1\times10^{-3}\ m)\ V_1 = (350\times10^{-6}\ m)(10\ ml)$

$V_1 = (350\times10^{-6}\ m)(10\ ml)/\ (1\times10^{-3}\ m)$

$= 350\times10^{-3}$ m (10 ml)

$= 350\times10^{-2}$ m

V_1 = 3.5 ml/met 6.5 ml

400 $C_1V_1 = C_2V_2$

$(1\times10^{-3}\ m)\ V_1 = (400\times10^{-6}\ m)(10\ ml)$

$V_1 = (400\times10^{-6}\ m)(10\ ml)/\ (1\times10^{-3}\ m)$

$= 400\times10^{-3}$ m (10 ml)

$= 400\times10^{-2}$ m

V_1 = 4 ml/met 6 ml

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเติมแต่งที่ความเข้มข้นต่างๆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

1. Phosphate buffer (pH 7)

Stock A

- Dibasic sodium phosphate 12.48 กรัม
- น้ำ 1,600 มิลลิลิตร

Stock B

- Monobasic sodium phosphate 8.90 กรัม
- น้ำ 1,000 มิลลิลิตร

จากนั้นนำ Stock A ปริมาตร 1,525 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock B ปริมาตร 975 มิลลิลิตร

2. การเตรียม Stock สารเติมแต่ง

- Starch 0.1%
  - Starch 0.25 กรัม
  - Phosphate buffer (pH 7.0) 250 มิลลิลิตร
- Starch 0.5%
  - Starch 1.25 กรัม
  - Phosphate buffer (pH 7.0) 250 มิลลิลิตร
- Skim milk 1%
  - Skim milk 4 กรัม
  - Phosphate buffer (pH 7.0) 40 มิลลิลิตร
- Skim milk 2%
  - Skim milk 6.6 กรัม
  - Phosphate buffer (pH 7.0) 60 มิลลิลิตร
- PVP 1%
  - PVP 4 กรัม
- Phosphate buffer (pH 7.0) 40 มิลลิลิตร
- PVP 2%
  - PVP 8 กรัม
- Phosphate buffer (pH 7.0) 40 มิลลิลิตร
- PEG6000 1%
  - PEG6000 4 กรัม
- Phosphate buffer (pH 7.0) 40 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

- PEG6000 2%

    - PEG6000 8 กรัม

- Phosphate buffer (pH 7.0) 40 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ภาคผนวก ค

การย้อมสปอร์แบคทีเรีย วิธีการย้อมสปอร์แบคทีเรีย ผลการย้อมสปอร์แบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

1. การย้อมสปอร์แบคทีเรีย

วัสดุ-อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย
2. น้ำกลั่น
3. Malachite green
4. Safranin-O
5. แผ่นสไลด์
6. Loop
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์

2. วิธีการย้อมสปอร์แบคทีเรีย

1. ทำความสะอาดแผ่นสไลด์ และเช็ดให้แห้งแล้วมาหยดน้ำกลั่นลงกลางแผ่นสไลด์

2. เผา Loop ให้ร้อน รอจน Loop เย็นแล้วแตะเชื้อแบคทีเรียมา smear ตรงกลางแผ่นสไลด์ที่หยดน้ำกลั่นไว้ แล้วตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

3. เติมสี Malachite green ลงบนแผ่นสไลด์จนท่วมบริเวณที่มีแบคทีเรีย

4. ใช้ไอน้ำลนใต้สไลด์เป็นเวลา 15 นาที ระวังอย่าให้สีย้อมแห้ง คอยเติมสีย้อมเมื่อสีใกล้แห้ง

5. ทิ้งสไลด์จนเย็น ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง

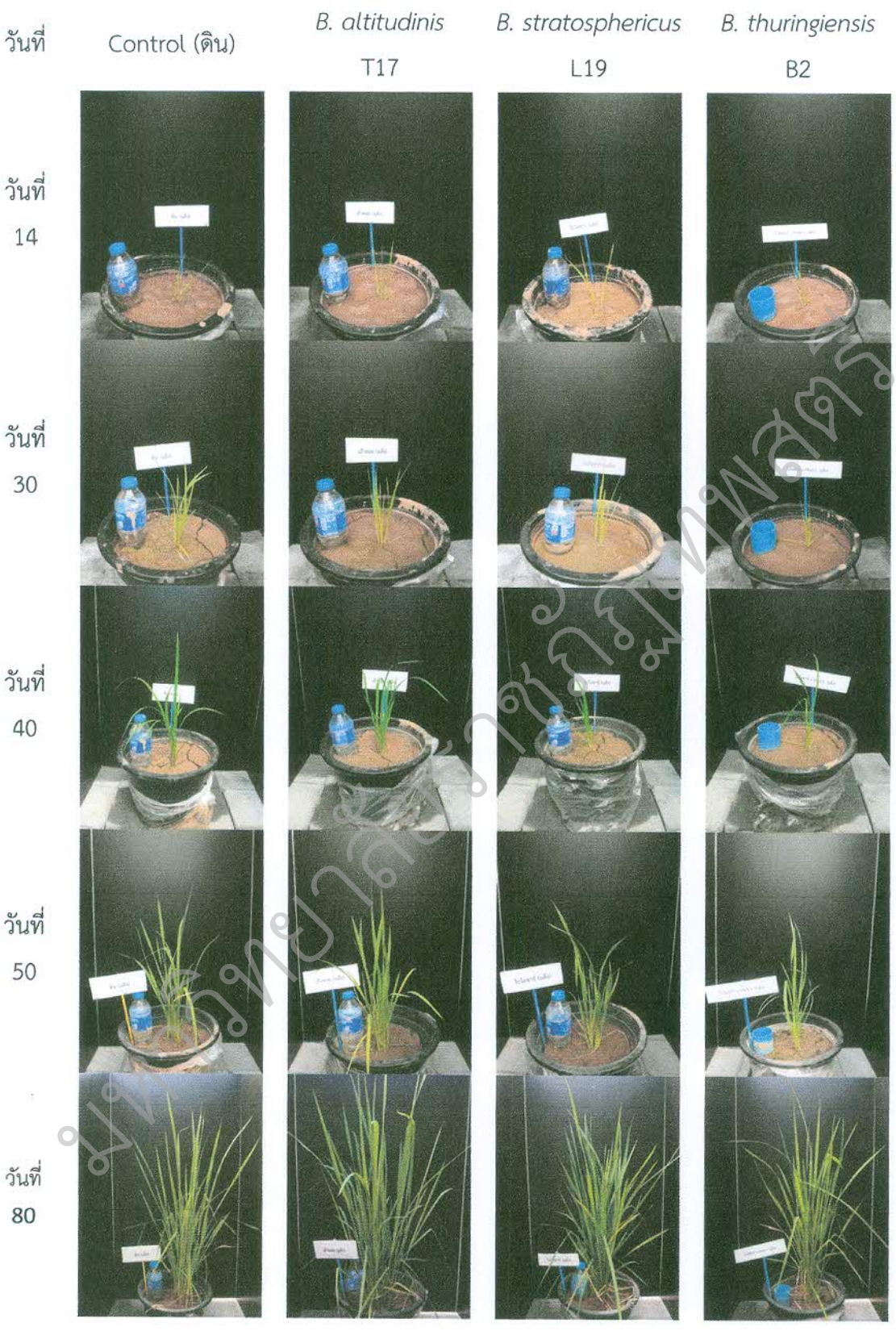
6. เติมสี safranin-o ลงไป ทิ้งไว้นาน 30-60 วินาที ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง

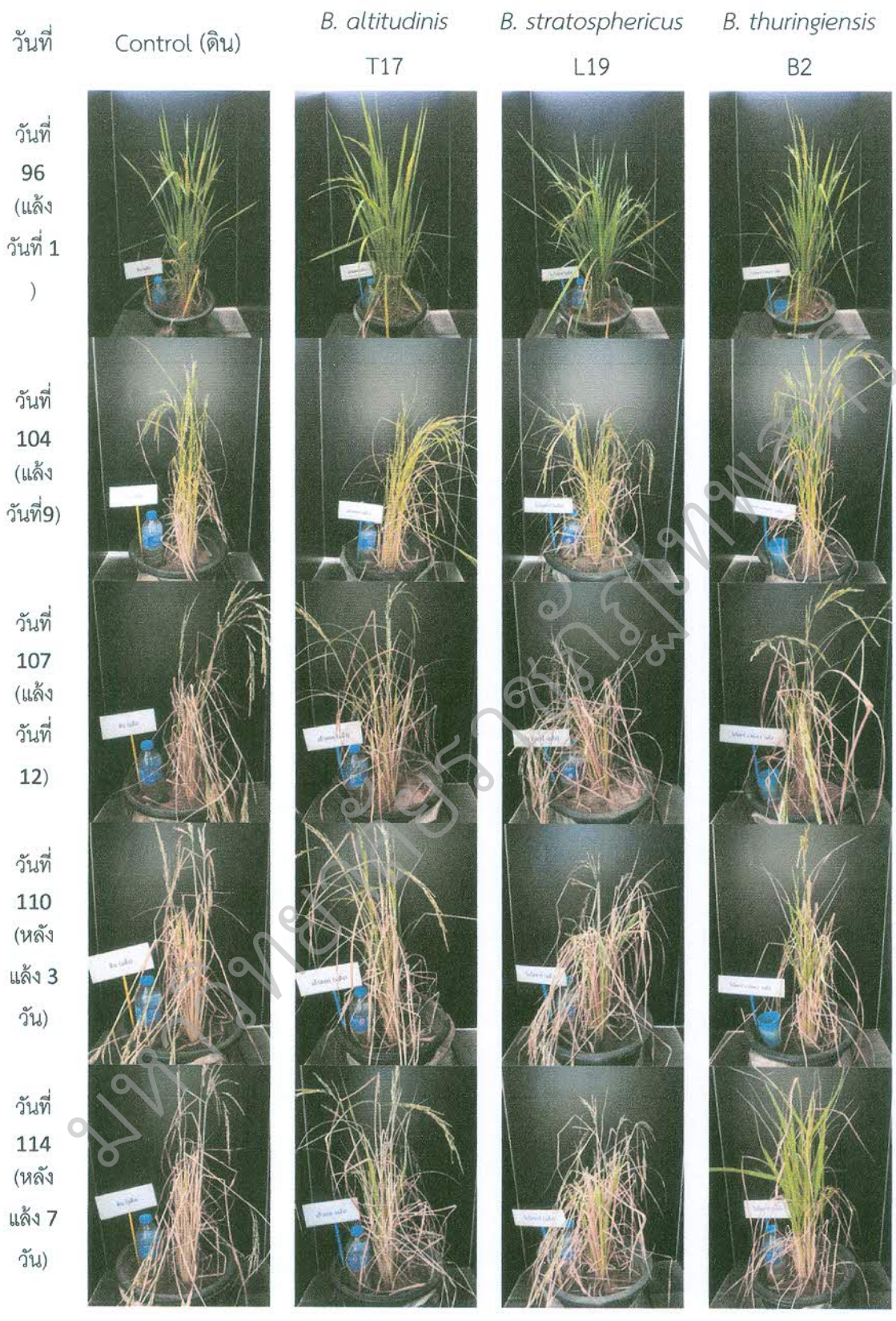
7. นำแผ่นสไลด์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100x

3. ผลการย้อมสปอร์แบคทีเรีย

1. เซลล์ = ติดสีแดง
2. สปอร์ = ติดสีเขียว

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี


วันที่
Control (ดิน)
B. altitudinis
T17
B. stratosphericus
L19
B. thuringiensis
B2
วันที่
14
วันที่
30
วันที่
40
วันที่
50
วันที่
80


วันที่
Control (ดิน)
B. altitudinis
T17
B. stratosphericus
L19
B. thuringiensis
B2
วันที่ 96 (แล้งวันที่ 1)
วันที่ 104 (แล้งวันที่9)
วันที่ 107 (แล้งวันที่ 12)
วันที่ 110 (หลังแล้ง 3 วัน)
วันที่ 114 (หลังแล้ง 7 วัน)

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ.....นางสาวกัลย์สุดา.....นามสกุล.....ดวงศรีแก้ว.....
2. ตำแหน่งทางวิชาการ.....อาจารย์.....
3. ตำแหน่งทางการบริหาร.....-.....
4. สังกัดภาควิชา.....ชีววิทยา.....คณะ.....วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.....มหาวิทยาลัย.....ราชภัฏเทพสตรี .....
5. Email (มหาวิทยาลัย).....-.....

Email(อื่น)..... kansuda.d@hotmail.com.....

6. โทรศัพท์มือถือ.....089-0361925.....
7. โทรศัพท์ที่ทำงาน.....036-412751.....

   โทรสาร..... 036-412751.....
8. ที่อยู่ในการจัดส่งเอกสาร.....สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี เลขที่ 321 ถนนนารายณ์มหาราช ต.ทะเลชุบศร อ.เมือง จ.ลพบุรี 15000.....
9. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	สถาบัน
2552	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	วท.ม	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2549	วิทยาศาสตรบัณฑิต	วท.บ	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยบูรพา

10. ผลงานวิจัย/ผลงานวิชาการ

Duangsrikaew K., Femuechang P., Jaidee R., Kachenchart B. and Luepromchai E. 2015. Isolation of drought tolerant rhizosphere bacteria for promoting growth of rice seedlings. Poster Presentation. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Bangkok. 17-20 November, 2015.

Duangsrikaew K., Femuechang P., Jaidee R., Kachenchart B. and Luepromchai E. 2016. Bacterial Inoculum for Enhancing Rice Recovery after Drought Condition in Pot Experiment. Poster Presentation. The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Chiangmai. 28-30 November, 2016.

Duangsrikaew K., Femuechang P., Kachenchart B. and Luepromchai E. 2017. Efficiency of mixed bacterial inoculum on promoting growth and recovery of rice under drought condition. International Union of Microbiological Societies Congresses 2017, Singapore, 17 – 21 July 2017.

11.ความเชี่ยวชาญในสาขาวิชา : จุลชีววิทยาทางการเกษตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี