รหัสโครงการ SUT3-304-49-24-18

รายงานการวิจัย

การพัฒนาหัวเชื้อ PGPR เพื่อการเก็บรักษาระยะยาว

(Development of PGPR inoculum for long shelf-life)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-49-24-18

รายงานการวิจัย

การพัฒนาหัวเชื้อ PGPR เพื่อการเก็บรักษาระยะยาว
(Development of PGPR inoculum for long shelf-life)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2550
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว
เมษายน 2556

บทคัดย่อ

หัวเชื้อ PGPR เริ่มเป็นที่รู้จักและนำไปใช้โดยเกษตรกรมากขึ้นเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชและลดการใช้ปุ๋ยเคมีหรือสารเคมีต่าง ๆในการเกษตร ดังนั้นคุณภาพของหัวเชื้อ PGPR จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพเมื่อเกษตรกรนำไปใช้กับพืช โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารราคาถูกที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อให้มีปริมาณสูง รวมทั้งวัสดุพาหะที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเซลล์ให้อยู่รอดได้ในระยะเวลาอย่างน้อย 6-12 เดือน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการตรวจสอบทั้งวัสดุพาหะชนิดแข็ง และวัสดุพาหะชนิดเหลว ในการเลี้ยงเชื้อ PGPR สองชนิด คือ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ทั้งนี้พบว่าการใช้เทคนิคการเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า ก่อนผสมกับวัสดุพาหะชนิดแข็งต่าง ๆ คือ เปลือกมันสำปะหลัง เปลือกข้าวโพด Filter cake หรือฟางข้าว สามารถทำให้เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเกินกว่า 10^8เซลล์ต่อกรัม ในสัปดาห์ที่ 2 และมีชีวิตอยู่รอดในปริมาณมากกว่า 10^6เซลล์ต่อกรัม ได้จนถึง 6 เดือน สำหรับการทดสอบในวัสดุพาหะชนิดเหลวพบว่าเชื้อ *Azotobacter* sp. มีปริมาณเชื้อรอดชีวิตมากกว่า 10^8เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ถึง 10 เดือน ในอาหาร LG ที่มีการใช้วัสดุพาหะเป็น PEG 0.5% + แป้งมัน 0.5% ในขณะที่เชื้อ *Azospirillum*sp. มีปริมาณเชื้อรอดชีวิตมากกว่า 10^8เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ 6 เดือน ในอาหาร NFB ที่มีการใช้วัสดุพาหะเป็น แป้งมัน 1.0% และเมื่อพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการผลิตหัวเชื้อ PGPR ชนิดเหลวเพื่อให้มีราคาถูกลงโดยใช้ Molasses 2% ร่วมกับการเติมบัพเฟอร์เพื่อควบคุมค่ากรด-ด่างที่เหมาะสม พบว่าเชื้อ *Azotobacter* sp. สามารถเจริญและมีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่า 10^8เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 5 เดือน ในอาหารที่ใช้ Molasses 2% + Phosphate buffer + PEG 0.5% + แป้งมัน 0.5% ในขณะที่เชื้อ *Azospirillum* sp. สามารถเจริญและมีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่า 10^8เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลาถึง 8 เดือน ในอาหารที่ใช้ Molasses 2% + Phosphate buffer + แป้งมัน 1.0% ดังนั้นจากงานวิจัยนี้ทำให้ได้หัวเชื้อ PGPR ที่มีการพัฒนาการผลิตโดยใช้วัสดุพาหะทั้งชนิดแข็งและชนิดเหลว รวมทั้งได้สูตรอาหารที่มีราคาถูกลงโดยที่ยังสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์และรักษาให้เซลล์มีชีวิตอยู่รอดได้นานอย่างน้อย 6 เดือน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาใช้กับการผลิตในเชิงการค้าได้ต่อไป

Abstract

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) are known and have been used by farmers in order to support plant growth and reducing chemical fertilizer and chemical substances used in agriculture. Therefore, the quality of PGPR inoculum is an important factor which directly contributes to the efficiency of inoculum when using with plants. The objective of this research was to develop the low cost medium and carrier formulation that can support high cell growth as well as extend the shelf-life of PGPR inoculum at least 6-12 months when store at room temperature. Both solid and liquid carriers were used to determine the effect on growth and survival of two PGPR, *Azotobactor* sp. and *Azospirillum* sp. It was found that the 10-fold diluted inoculum starter could be used to inject into different solid carriers, such as cassava peel, corn waste, filter cake, or rice straw, and the cell number of PGPR was increased to 10^8 cells/gram at 2^{nd} week after injection and remained more than 10^6 cells/gram for 6 months. On the other hands, the appropriate carrier for liquid inoculant was also investigated. The cell number of *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. remained more than 10^8 cells/ml for 10 months in LG medium with PEG 0.5% + cassava starch 0.5% and for 6 months in NFB medium with cassava starch 1.0% as carrier, respectively. Molasses was used to formulate the low cost medium, while phosphate buffer was also added to control the optimum pH during growth. The cell number of *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. remained more than 10^8 cells/ml for 5 months in medium containing molasses 2% + phosphate buffer + PEG 0.5% and for 8 months in medium containing molasses 2% + phosphate buffer + cassava starch 1.0%, respectively. Therefore, this research could formulate solid and liquid PGPR inoculum that reduce the cost of production and maintain the shelf-life of inoculant for more than 6 months at room temperature, which can be used further for commercial production.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่งทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

26 เมษายน 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)		ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญรูป		ช
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	1
	1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	5
	3.1 การศึกษากระบวนการผลิตโดยใช้วิธี Dilution Technique ร่วมกับ Solid State Fermentation	5
	3.2 การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุพาหะเหลวต่อเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp	6
	3.3 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบเป็นสูตรอาหาร	6
	3.4 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบในสูตรอาหารที่เป็น molasses 2%	7

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 4	ผลการศึกษาวิจัย	
	4.1 การศึกษากระบวนการผลิตโดยใช้วิธี Dilution Technique ร่วมกับ Solid State Fermentation	9
	4.2 การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุพาหะเหลวต่อเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.	13
	4.3 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบเป็นสูตรอาหาร	15
	4.4 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบในสูตรอาหารที่เป็น molasses 2%	19
บทที่ 5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
บรรณานุกรม		25
ประวัตินักวิจัย		27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ชนิดและความเข้มข้นของวัสดุพาหะที่ใช้ประกอบในสูตรอาหารมาตรฐาน 6

3.2 ชนิดและความเข้มข้นของวัสดุพาหะที่ใช้ประกอบใน molasses 2% 7

4.1 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบเป็นสูตรอาหาร 15

4.2 แสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ 17

4.3 แสดงปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azotobacter* sp. ที่เก็บรักษาใน Molasses 2% ที่ ผสมกับ buffer และ PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน 20

4.4 แสดงปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาใน Molasses 2% ที่ผสมกับ Buffer และ แป้งมัน 1.0% เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน 21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.1 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่างๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อเข้มข้น 20% v/w (5.2 x 10^9 CFU/gram) 9

4.2 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ Azotobacter sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่างๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ1:10 (5.2 x 108 CFU/gram) 9

4.3 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่างๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ 1:100 (5.2 x 10^7 CFU/gram) 10

4.4 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter sp.* ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ1:1,000 (5.2 x 10^6 CFU/gram) 10

4.5 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อเข้มข้น 20% v/w (6.4 x 109 CFU/gram) 11

4.6 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ 1:10(6.4 x 10^8 CFU/gram) 12

4.7 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ 1:100 (6.4 x 10^7 CFU/gram) 12

4.8 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่างๆที่ใส่ปริมาณเชื้อ 1:1,000 (6.4 x 10^6 CFU/gram) 13

4.9 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะ ชนิดต่างๆ 14

4.10 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ในสูตรอาหารมาตราฐานและสูตรอาหาร มาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ 14

4.11 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐานและสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ 16

4.12 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐานและสูตร อาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ 18

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.13 กราฟแสดงปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ Azotobacter sp. ที่เก็บรักษาในอาหารที่เป็น Molasses 2% ที่ผสมกับ Buffer และ PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน 20

4.14 กราฟแสดงปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาในอาหารที่เป็น Molasses 2% ที่ผสมกับ buffer และ แป้งมัน 1.0 % เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน 22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

เป็นที่ทราบและใช้กันอย่างแพร่หลายในเรื่องของหัวเชื้อ (Inoculum) ปุ๋ยชีวภาพชนิดต่างๆ ไรโซเบียมเป็นปุ๋ยชีวภาพที่ทำหน้าที่เป็นปัจจัยสำคัญในการที่จะยืนยันถึงประสิทธิภาพของเชื้อที่มีต่อพืช โดยปัจจัยหลักของการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียม ได้แก่ ปริมาณเชื้อที่มีจำนวนสูงต่อ 1 หน่วยของวัสดุพาหะ (carrier) ซึ่งโดยปกติอยู่ในช่วง 10^8-10^{10} เซลล์/กรัม พีท โดยพีทเป็นวัสดุพาหะที่สามารถให้ธาตุอาหาร (อินทรียวัตถุ) แก่ไรโซเบียมได้ ทำให้ไรโซเบียมสามารถเก็บรักษาได้นานเป็นเวลา 8-12 เดือน โดยไม่ลดจำนวนลง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นส่งเสริมการอยู่รอดของไรโซเบียม ซึ่งได้แก่ ความชื้น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆ

ในส่วนของการใช้ PGPR ในการเกษตรในรูปหัวเชื้อ เริ่มมีการศึกษา และใช้กันมากขึ้น ดังเช่น ในส่วนของกรมวิชาการเกษตรเอง หรือการใช้ *Azotobacter vinelandii* และ *A. chroococcum* เป็นหัวเชื้อ PGPR ในการปลูกข้าว (Kanungo และคณะ, 1977) โดยพบว่าให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้น 20% หรือการใช้ *Azospirillum brasilense* ร่วมกับ *A. lipoferum* ทำให้ข้าวสาลีได้ธาตุไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนได้ถึง 7-12% (Malik และคณะ, 2002) อย่างไรก็ตาม การใช้หัวเชื้อของกลุ่ม PGPR ส่วนใหญ่จะทำในรูปนำเมล็ด หรือต้นกล้ามาแช่ใน bacterial culture โดยปริมาณหัวเชื้อส่วนใหญ่มักถูกผลิตให้มีจำนวนมากกว่า 10^8 เซลล์/มล. (Singh และคณะ, 1999, Matthew และคณะ, 2001 และ Lee และคณะ, 2002)

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสม ราคาถูก ทำให้เซลล์ตั้งต้นมีปริมาณสูง ในขณะเดียวกันมุ่งที่จะพัฒนาสูตรวัสดุพาหะที่ให้ปัจจัยที่เหมาะสมในการคงจำนวนเซลล์ในการเก็บรักษาเชื้อที่เหมาะสม และสะดวกต่อการนำไปใช้ของเกษตรกรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อให้ได้สูตรอาหารราคาถูกที่สามารถทำให้เชื้อ PGPR มีปริมาณสูงถึง 10^9-10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร
2. เพื่อให้ได้สูตรวัสดุพาหะ (carrier) ที่สามารถคงจำนวนเซลล์ PGPR ได้นานเป็นเวลา 1 ปี
3. เพื่อให้ได้สูตรหัวเชื้อผสม (Multi-strain inoculum) ที่เหมาะสมกับพืชแต่ละกลุ่ม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

นำเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในระดับ *in vitro* ว่ามีศักยภาพสูง มาทดสอบเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการพัฒนาองค์ประกอบ ทำการเพาะเลี้ยงให้ได้จำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 10^9-10^{10} เซลล์/มล. จากนั้นนำมาทำการฉีดใส่วัสดุพาหะ (carrier) ที่มีการแปรผันค่า C/N ratio pH ความชื้น ตรวจสอบประชากรทุกเดือน เป็นเวลา 1 ปี ในขณะเดียวกันทำการคัดเลือกเชื้อ PGPR ที่ให้ประสิทธิภาพสูงในลักษณะต่างๆ มาผสม และทดสอบผลกระทบที่มีต่อพืชในระดับกระถาง และการอยู่รอดในวัสดุพาหะเป็นเวลา 1 ปี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สูตรอาหารราคาถูกที่สามารถทำให้เชื้อ PGPR มีปริมาณสูงถึง 10^9-10^{10} เซลล์/มล.
2. ได้สูตรวัสดุพาหะ (carrier) ที่สามารถคงจำนวนเซลล์ PGPR ได้นานเป็นเวลา 1 ปี
3. ได้สูตรหัวเชื้อผสม (Multi-strain inoculum) ที่เหมาะสมกับพืชแต่ละกลุ่ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หัวเชื้อไรโซเบียมถูกใช้เป็นแหล่งของปุ๋ยไนโตรเจนโดยเฉพาะกับพืชตระกูลถั่ว ไรโซเบียมที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาหลายทศวรรษ เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี ช่วยลดต้นทุนการผลิตสำหรับพืชตระกูลถั่ว หัวเชื้อไรโซเบียมที่จำหน่ายตามท้องตลาดมีด้วยกันหลายรูปแบบ ได้แก่ ชนิดแข็ง หรือชนิดเหลว ที่รักษาเชื้อไรโซเบียมให้มีจำนวนเซลล์อยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อกรัมได้อย่างน้อย 6 เดือน (Stephens และ Rask, 2000) แม้ว่าหัวเชื้อชนิดเหลวจะมีกระบวนการผลิตที่ง่ายกว่าชนิดแข็ง แต่ความอยู่รอดของเชื้อต้องคำนึงถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิต รวมทั้งชนิดของเชื้อไรโซเบียมอีกด้วย (Tittabutr และคณะ, 2007) ดังนั้น หัวเชื้อในรูปของแข็งโดยเฉพาะการใช้พีทเป็นวัสดุพาหะยังเป็นที่นิยมใช้การผลิตหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ เนื่องจาก พีทมีองค์ประกอบต่างๆ ที่ทำให้เชื้ออยู่รอดได้เป็นระยะเวลานาน (Kishore และคณะ, 2005; Okon และ Labandera-Gonzalez, 1994) แต่พีทก็ยังเป็นวัสดุที่มีอยู่จำกัดในหลายๆ ประเทศเช่นเดียวกับในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาวัสดุในท้องถิ่นมาทดแทนเพื่อใช้ผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป วัสดุพาหะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมหรือปุ๋ยชีวภาพนั้นต้องไม่เป็นพิษ รักษาความชื้นได้ดี ช่วยให้เชื้อเจริญเติบโตและอยู่รอดได้ เตรียมในรูปแบบผงได้ง่ายและค่า pH ที่เป็นกลาง (Albareda และคณะ; Khavazi และคณะ, 2007; Smith, 1992) มีการทดสอบวัสดุพาหะหลายชนิดเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียม เช่น ดิน ถ่านหิน เวอร์มิคูไลต์ เพอร์ไลต์ แอตทาพูลไกต์ เซไพโอไลต์ อะมอร์ฟัสซิลิกา ปุ๋ยจากเปลือกไม้ กากอ้อย และปุ๋ยหมักจากพืชต่างๆ (Albareda และคณะ, 2008; Ferreira และ Castro, 2005; Khavazi และคณะ, 2007) อย่างไรก็ตามคุณภาพของหัวเชื้อขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของวัสดุพาหะ ที่จะส่งเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์มีชีวิตอยู่รอดในหัวเชื้อได้

สำหรับการใช้หัวเชื้อ PGPR เริ่มนิยมใช้กันมากขึ้น ตัวอย่างของเชื้อ PGPR ที่ใช้กับพืชที่เคยมีการทดสอบ และได้ผลดีต่อพืช ได้แก่ ข้าว + *Azotobacter* (Kanungo และคณะ, 1977), *Azospillirum* + ข้าวสาลี (Malik และคณะ, 2002), *Acetobater diazotrophicus* + อ้อย (James และคณะ, 1994), *Azorhizobium* + ข้าวสาลี (Saleh และคณะ, 2001), การใช้ *Az. vinelandii* ร่วมกับ *Clostridium butyricum* ในการปลูกข้าวสาลี ทางตะวันตกของออสเตรเลีย (Kennedy และ Tchan, 1992), *Herbaspirillum seroperdiceae* สามารถเพิ่มผลผลิตของรวงข้าว (Arangarasan และคณะ, 1998) เป็นต้น และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการพัฒนา Multi-strain inoculum โดยใช้ PGPR 3 ชนิดร่วมกัน ในการปลูกข้าว และพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตให้ข้าวได้ถึง 1.1 ตัน/เฮกตาร์ (เพิ่มขึ้น 21%) เมื่อเทียบกับไม่ใส่หัวเชื้อ บริเวณเมืองฮานอย ประเทศเวียดนาม โดยการผลิตหัวเชื้อดังกล่าวเกิดขึ้นภายใต้ความร่วมมือวิจัยระหว่าง นักวิทยาศาสตร์เวียดนาม และออสเตรเลีย หัวเชื้อผสมดังกล่าวประกอบด้วย Pseudomonas ที่สามารถตรึงไนโตรเจน, Klebsiella ที่สามารถตรึงไนโตรเจน และย่อยสลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ และ *Citrobacter freundii* ซึ่งช่วยในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันของ PGPR ที่จะอาศัยบริเวณรากข้าว โดยสัดส่วนของการใช้จะอยู่ที่ 10 : 10 : 1 ตามลำดับ โดยปริมาณ PGPR แต่ละชนิด 3×10^9 : 1×10^8 : 1×10^7 เซลล์/กรัมวัสดุพาหะ ตามลำดับ

ถ้าทำการปรับปรุงสูตรอาหาร โดยใช้วัสดุทดแทนที่มีราคาถูก เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด น้ำตาลทราย หรือเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการทำ Bioconversion เป็นแหล่งอาหารเสริม มาเพาะเลี้ยง PGPR ให้ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสูงถึง 10^{9}-10^{10} เซลล์/มล. จากนั้นทำการคงรักษาจำนวนให้อยู่ในวัสดุตัวพา ซึ่งจะใช้ข้อมูลงานวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก สกว. เรื่องธาตุอาหารจากวัสดุการเกษตร (ดำเนินโครงการเสร็จสิ้นแล้ว, หัวหน้าโครงการคือ ศ. ดร. นันทกร บุญเกิด) ที่ทราบธาตุอาหารของวัสดุการเกษตรทั่วประเทศ รวมทั้งข้อมูลจากงานวิจัยที่ใช้วัสดุพาหะแบบละลายน้ำได้ สำหรับการผลิตหัวเชื้อในชนิดเหลว (Tittabutr et al., 2007) มาทำการ formulate และตรวจสอบว่าวัสดุใดสามารถรักษาจำนวนเซลล์ได้อยู่ในช่วง 10^{8}-10^{10} เซลล์/มล. เป็นเวลา 1 ปี ก็จะเป็นการดีสำหรับการนำไปใช้ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ เป็นปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพที่สามารถควบคุมคุณภาพได้ นอกจากนี้การนำหัวเชื้อที่มีลักษณะเด่นต่างๆ กันมาใช้ร่วมกันกับพืช โดยลักษณะเด่นคลอบคลุมถึง การให้ธาตุอาหาร N P K, การสร้างฮอร์โมนพืช และการควบคุมเชื้อราศัตรูพืช ก็จะสามารถทำให้ลดอัตราการใช้สารเคมี และสามารถพัฒนาเป็นระบบเกษตรอินทรีย์ได้ในที่สุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์เมื่อเจริญใน fermentor จนถึง stationary phase แล้วเชื้อจุลินทรีย์จะเริ่มลดจำนวนลงเนื่องจากขาดอาหาร จึงจำเป็นต้องนำไปผสมกับวัสดุพาหะ (carrier) เพื่อตรึงเชื้อให้มีชีวิตอยู่รอดได้นานขึ้นและยังคงรักษาประสิทธิภาพอยู่ได้ดี นอกจากนี้ยังสะดวกในการนำไปใช้งานและจำหน่ายอีกด้วย วัสดุพาหะที่นำมาใช้มีทั้งเป็นวัสดุอินทรีย์ ได้แก่

1. Peat และปุ๋ยหมักจากวัสดุชนิดต่างๆ เช่น เปลือกมันสำปะหลัง เปลือกข้าวโพด filter cake
2. Polymer ชนิดต่างๆ เช่น polyvinylpyrolidole (PVP) และ alginate

โดยนำวัสดุเหล่านี้มาผสมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ตามกรรมวิธีของ Tittabutr และคณะ (2003) แล้วจัดเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุต่างๆตามวันเวลา (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 วัน) ณ อุณหภูมิต่าง ๆ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างมานับเชื้อโดยวิธี Plate count เพื่อคัดเลือกชนิดของวัสดุพาหะและอุณหภูมิจัดเก็บที่เหมาะสมที่สุด

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เชื้อ: *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.

3.1 การศึกษากระบวนการผลิตโดยใช้วิธี Dilution Technique ร่วมกับ Solid State Fermentation

ศึกษากระบวนการผลิตโดยใช้วิธี dilution technique ร่วมกับ solid state fermentation โดยเลี้ยง *Azotobacter* sp. ในอาหารสูตร LG และ *Azospirillum* sp. ในอาหารสูตร NFB ปริมาตร 500 มล. ใน flask ขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 3 วันจากนั้นทำ dilution ต่าง ๆ ตั้งแต่ 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำหัวเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ที่ dilution ต่าง ๆ ฉีดเข้าไปในวัสดุพาหะที่เป็น compost จากเปลือกมันสำปะหลัง, เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, filter cake และ peat (ขนาดบรรจุ 100 กรัม) ที่บรรจุในถุงพลาสติกทนความร้อน 2 ชั้น โดยให้มีความชื้นสุดท้ายของทุก ๆ ตำรับเป็น 40% จากนั้นนวดให้เชื้อเข้ากับวัสดุพาหะโดยใช้มือ แล้วเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อที่มีชีวิตอยู่ในแต่ละตำรับการทดลอง การตรวจสอบคุณภาพหรือการนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตแต่ละตำรับ เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 วัน และจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 เดือน วิธีการตรวจสอบ : ใช้วิธี total plate count โดยใช้ปริมาณตัวอย่างเริ่มต้น 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร เพื่อทำการเจือจางเชื้อให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมที่สามารถนับได้

3.2 การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุพาหะเหลวต่อเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.

โดยนำเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาเลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐานและในอาหารมาตรฐานที่ใส่วัสดุพาหะที่เลือกมาใช้ในการทดลอง ได้แก่

- แป้งมันสำปะหลัง 0.5% และ1% (W/V)
- Polyethyleneglycol 3000 (PEG) 0.1% และ 0.5% (W/V)
- Polyvinyl alcohol (PVA) 0.5%, และ 1% (W/V)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1% และ 2% (W/V)
- Arabic gum 0.1% และ 0.3% (W/V)
- Sodium alginate 0.1% (W/V)

ทั้งนี้วัสดุพาหะแต่ละสูตรจะถูกผสมลงในอาหาร LG สำหรับ *Azotobacter* sp. และNFB สำหรับ *Azospirillum* sp. ในการทดลองทำการเลี้ยงเชื้อทั้งสองเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180 rpm ทำการตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียในแต่ละวัน ด้วยเทคนิค total plate count

3.3 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบเป็นสูตรอาหาร

จากการทดสอบที่ผ่านมา ได้คัดเลือกวัสดุพาหะในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติการทำให้เชื้อมีชีวิตรอดอยู่ได้ ความเข้มข้นของวัสดุพาหะที่เลือกใช้กับเชื้อแต่ละชนิดมีดังนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 ชนิดและความเข้มข้นของวัสดุพาหะที่ใช้ประกอบในสูตรอาหารมาตรฐาน

วัสดุพาหะ	ความเข้มข้นของวัสดุพาหะ (%)ที่เหมาะสมเพื่อใช้ประกอบเป็นสูตรอาหารในเชื้อแต่ละชนิด (W/V)	
	***Azotobacter* sp.**	***Azospirillum* sp.**
PEG	0.5, 1.0, 1.5, 2.0	1.0, 1.5, 2.0
PVP	0.5, 1.0, 2.0	*
แป้งมันสำปะหลัง	0.5, 1.0, 1.5	1.0, 1.5
Arabic gum	0.3, 0.5, 1.0	0.1, 0.5, 1.0
Sodium alginate	0.1, 0.5, 1.0	0.1, 0.5, 1.0
PVA	0.5	0.1, 1.0
แป้งมัน +PEG	(1%+1%),(1.5%+0.5),(0.5%+0.5%), (0.25%+0.25%), (0.25%+0.5%)	*
แป้งมัน +Arabic gum	*	(0.5%+0.5%), (0.1%+0.1%),(0.25%+0.25%) (0.5%+1.0%), (0.5%+1.0%)

หมายเหตุ * ไม่มีการทดสอบเนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นให้ผลการทดลองที่ไม่เหมาะสม

ทำการเปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐานของเชื้อแต่ละตัวเพื่อเป็นการเปรียบเทียบ ในการเก็บรักษานำเชื้อที่เลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตรอาหารมาตรฐานที่ใส่วัสดุพาหะที่กล่าวมาข้างต้นซึ่งเจริญเต็มที่มาเก็บในถุงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว ถุงละ 20 มิลลิลิตร และทำการปิดผนึกถุงพลาสติกให้สนิท โดยในถุงที่ปิดผนึกให้มีอากาศอยู่ในนั้นด้วย ทำการเก็บตัวอย่างแบบนี้ทุกตัวอย่าง จากนั้นใส่กล่องเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ สัปดาห์ในเดือนแรก ต่อไปเก็บและตรวจการเจริญเดือนละครั้งจนครบ 1 ปี วัดปริมาณเชื้อที่มีอยู่โดยวิธี total plate count ทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับเชื้อที่เจริญในอาหารมาตรฐาน

3.4 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบในสูตรอาหารที่เป็น molasses 2%

การศึกษาการรอดชีวิตของ *Azotobacter sp.* และ *Azospirillum sp.* ใน molasses 2% ที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติการทำให้เชื้อมีชีวิตรอดอยู่ได้ ความเข้มข้นของวัสดุพาหะที่เลือกใช้กับเชื้อแต่ละชนิดมีดังนี้

ตารางที่ 3.2 ชนิดและความเข้มข้นของวัสดุพาหะที่ใช้ประกอบใน molasses 2%

วัสดุพาหะ	ความเข้มข้นของวัสดุพาหะ (%)ที่เหมาะสมเพื่อใช้ประกอบเป็นสูตรอาหารในเชื้อแต่ละชนิด	
	Azotobacter sp.	*Azospirillum* sp.
PEG	0.5, 1.0, 1.5, 2.0	0.5, 1.0, 1.5, 2.0
PVP	0.5, 1.0, 2.0	0.5, 1.0, 2.0
แป้งมันสำปะหลัง	0.5, 1.0, 1.5, 2.0	1.0, 1.5, 2.0, 1.0+HEPES buffer 1.0+Phosphase buffer
Arabic gum	0.1, 0.3, 0.5, 1.0	0.1, 0.3, 0.5, 1.0
Sodium alginate	0.1, 0.5, 1.0	0.1, 0.5, 1.0
PVA	0.1, 0.5	0.1, 0.5
แป้งมัน +PEG	(0.5+0.5+HEPES buffer), (0.5+0.5+Phosphase buffer)	*

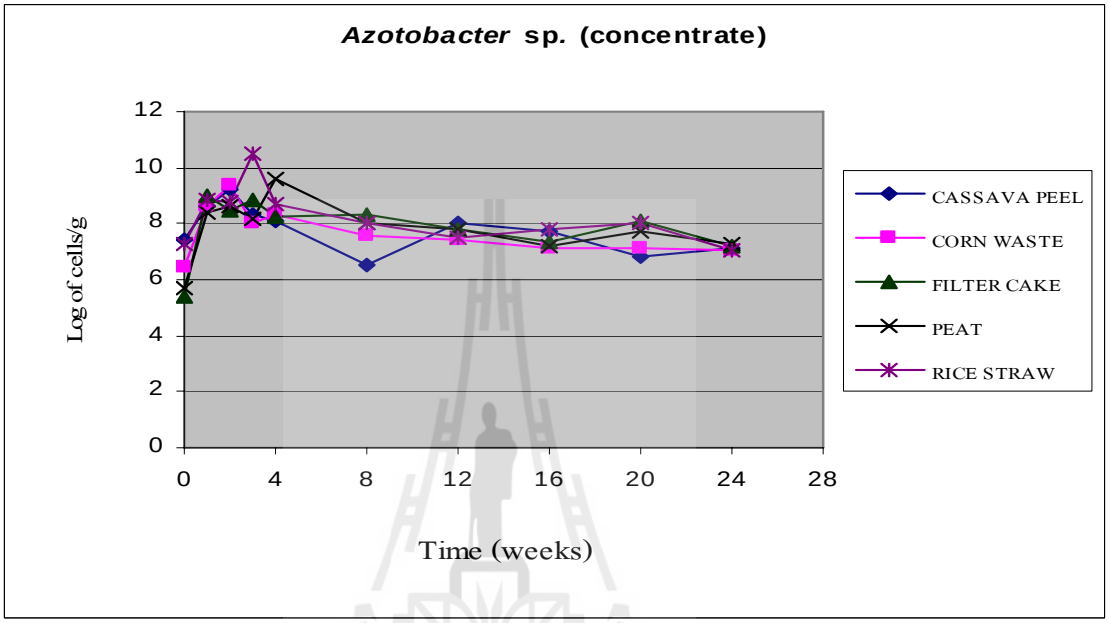
หมายเหตุ * ไม่มีการทดสอบเนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นให้ผลการทดลองที่ไม่เหมาะสม

ทำการเปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐานของเชื้อแต่ละตัวเพื่อเป็นการเปรียบเทียบ ในการเก็บรักษานำเชื้อที่เลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตรอาหารมาตรฐานที่ใส่วัสดุพาหะที่กล่าวมาข้างต้นซึ่งเจริญเต็มที่มาเก็บในถุงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วถุงละ 20 มิลลิลิตร ทำการปิดผนึกถุงพลาสติกให้สนิท แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ เดือน วัดปริมาณการอยู่รอดของเชื้อโดยวิธี total plate count จำนวน 3 ซ้ำ

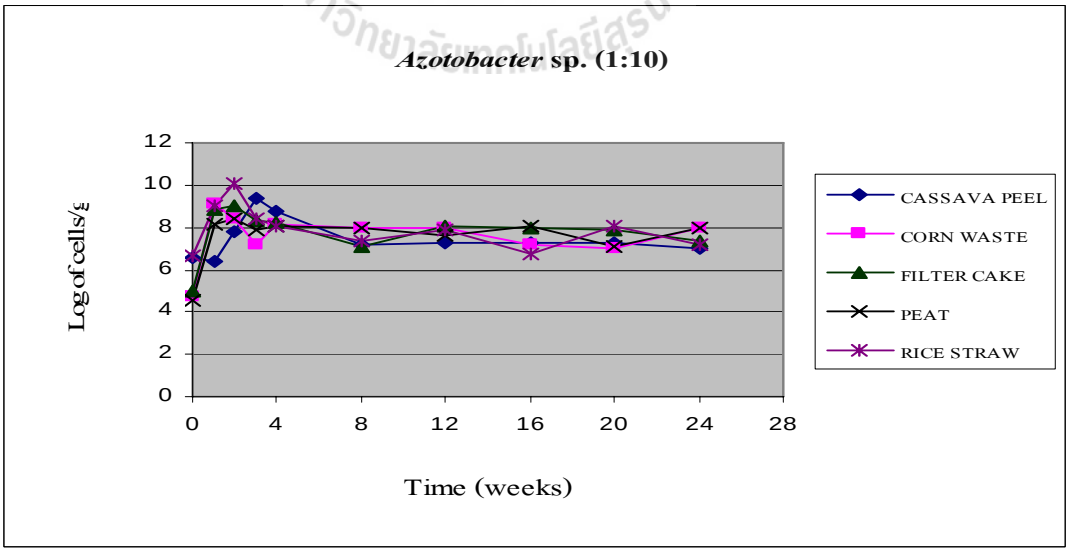
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการศึกษาวิจัย

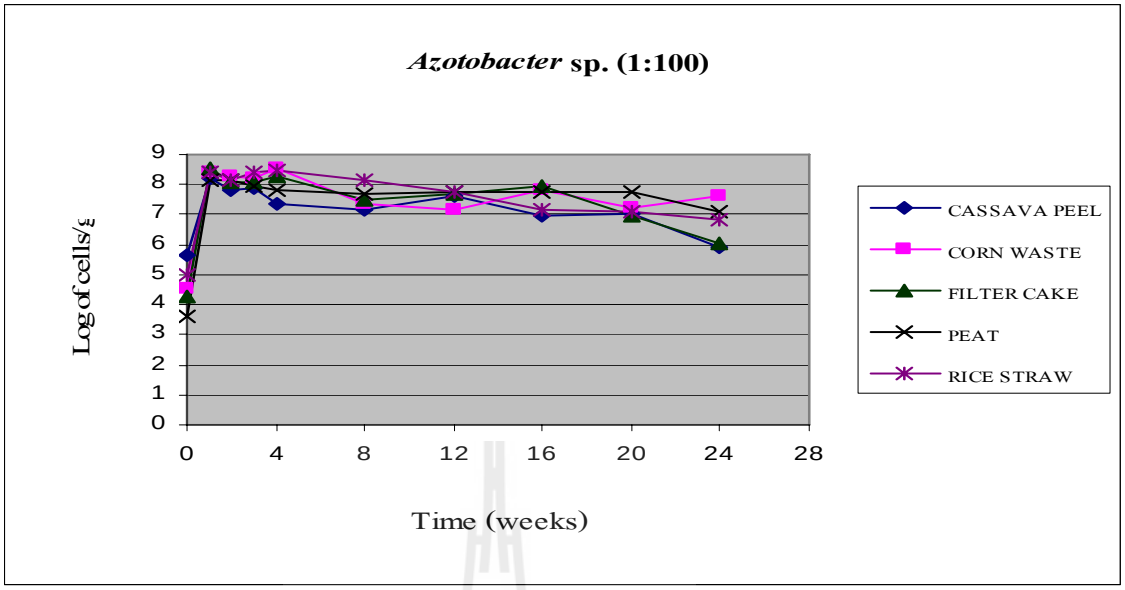
4.1 การศึกษากระบวนการผลิตโดยใช้วิธี Dilution Technique ร่วมกับ Solid State Fermentation



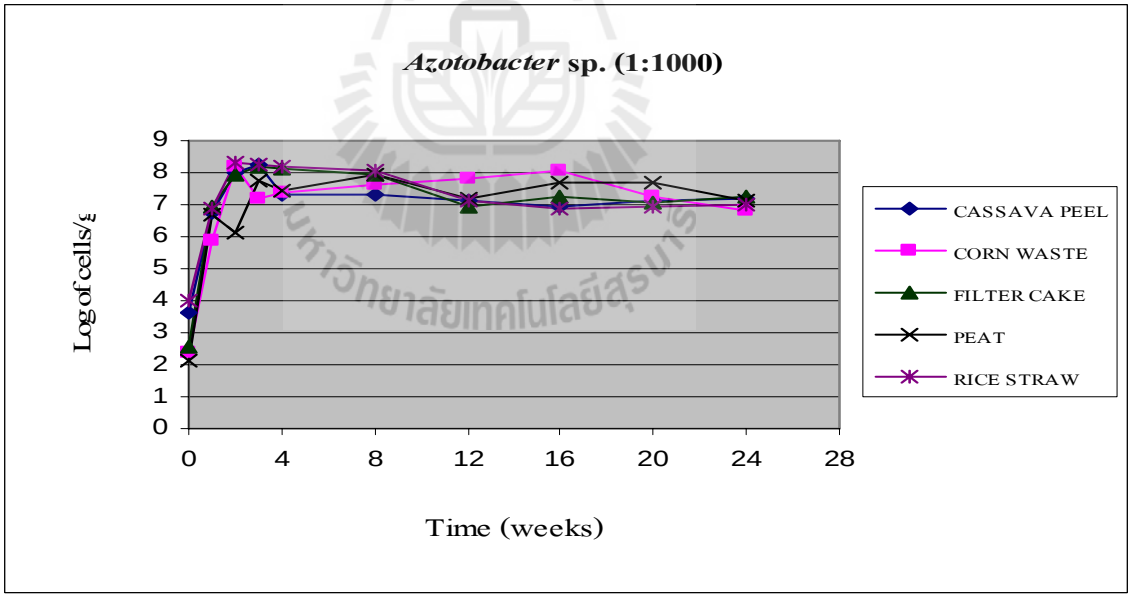
ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่างๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อเข้มข้น 20% v/w (5.2×10^9 CFU/gram)



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่างๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ1:10 (5.2×10^8 CFU/gram)



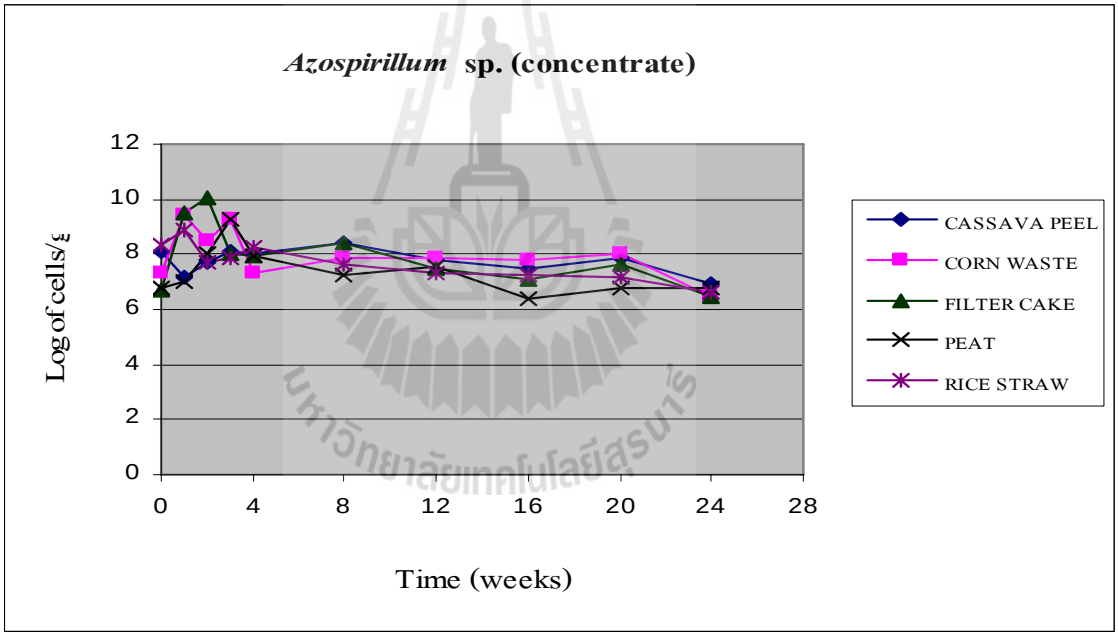
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่างๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ 1:100 (5.2×10^7 CFU/gram)



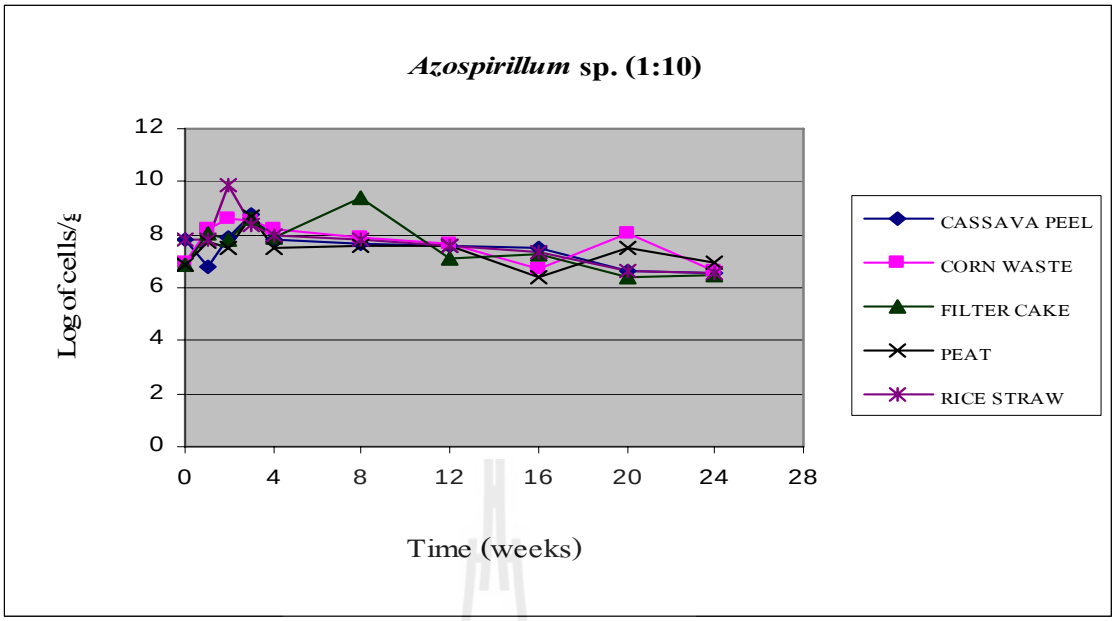
ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter sp.* ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ1:1,000 (5.2×10^6 CFU/gram)

จากรูปกราฟที่4.1, 4.2, 4.3 และ4.4 พบว่าปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ในระดับต่าง ๆ สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์ต่อไปได้ในวัสดุพาหะต่าง ๆ ที่ใช้ (เปลือกมันสำปะหลัง, เปลือกข้าวโพด, filter cake, ฟางข้าว, พีท) ได้เป็นอย่างดี แสดงให้เห็นว่าวัสดุพาหะต่างชนิดที่ใช้และปริมาณเชื้อเริ่มต้น ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ และการอยู่รอดของเชื้อ *Azotobacter* sp. โดยพบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 1 สัปดาห์แรก ยกเว้นในวัสดุพาหะที่เป็น compost จากฟางข้าว ที่มีการเพิ่มปริมาณเซลล์ถึง 10^{10} CFU/กรัม ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของ dilution ที่ 1:10 และสัปดาห์ที่ 3 ของเชื้อเข้มข้น โดยภาพรวมพบว่าในช่วงระยะเวลา 1 เดือน เชื้อเพิ่มปริมาณขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งคงที่ในช่วงเวลา 1 - 6 เดือน ที่ปริมาณเซลล์ 10^{8}-10^{7} CFU/กรัมวัสดุพาหะ ยกเว้นที่ dilution 1:100 ในวัสดุพาหะที่เป็น compost เปลือกมันสำปะหลัง และ filter cake ปริมาณเชื้อลดลงในช่วงเดือนที่ 6 โดยมีปริมาณเซลล์อยู่ในช่วง 10^{6} CFU/กรัม

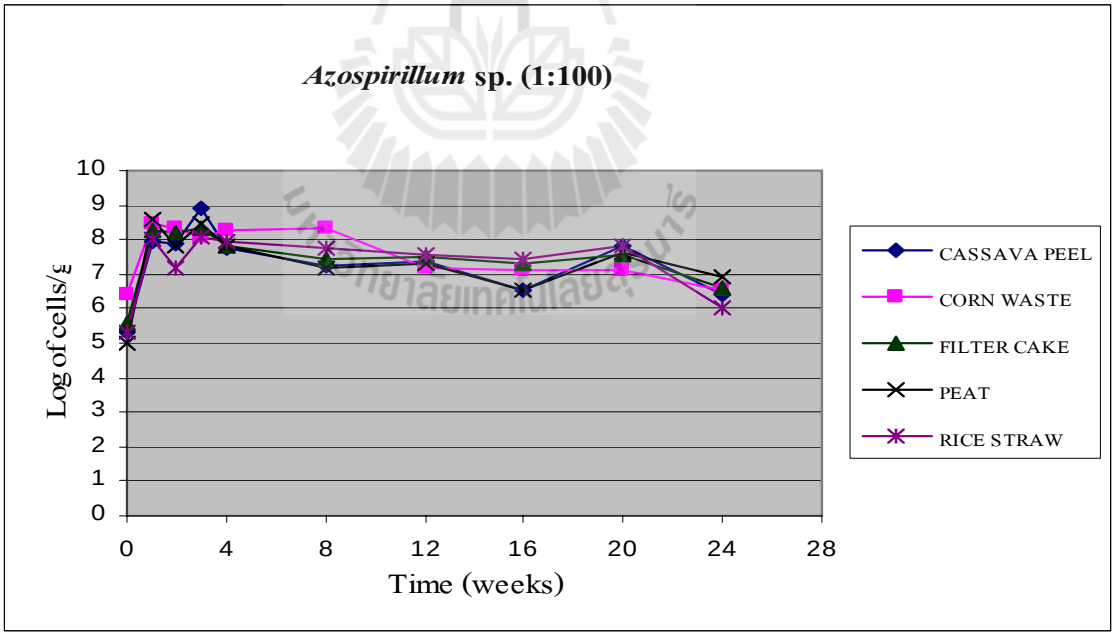
ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนในการผลิตเชิงธุรกิจจึงควรใช้ปริมาณเชื้ออัตราส่วน 1:10 เพื่อเป็นหัวเชื้อใส่ในวัสดุพาหะ ได้แก่ เปลือกมันสำปะหลัง, เปลือกข้าวโพด, Filler cake หรือ ฟางข้าว แล้วนำมาใช้เป็นหัวเชื้อได้ตั้งแต่ 2 สัปดาห์แรกถึง 6 เดือน



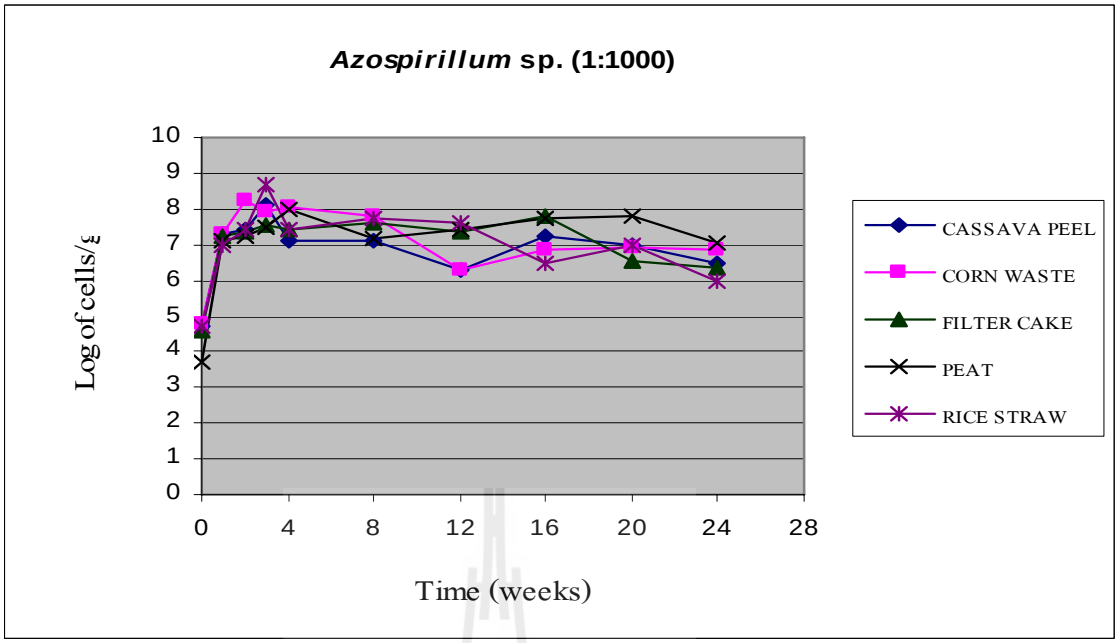
ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อเข้มข้น 20% v/w (6.4×10^{9} CFU/gram)



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ 1:10(6.4 x 10^8 CFU/gram)



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ปริมาณเชื้อ 1:100 (6.4 x 10^7 CFU/gram)

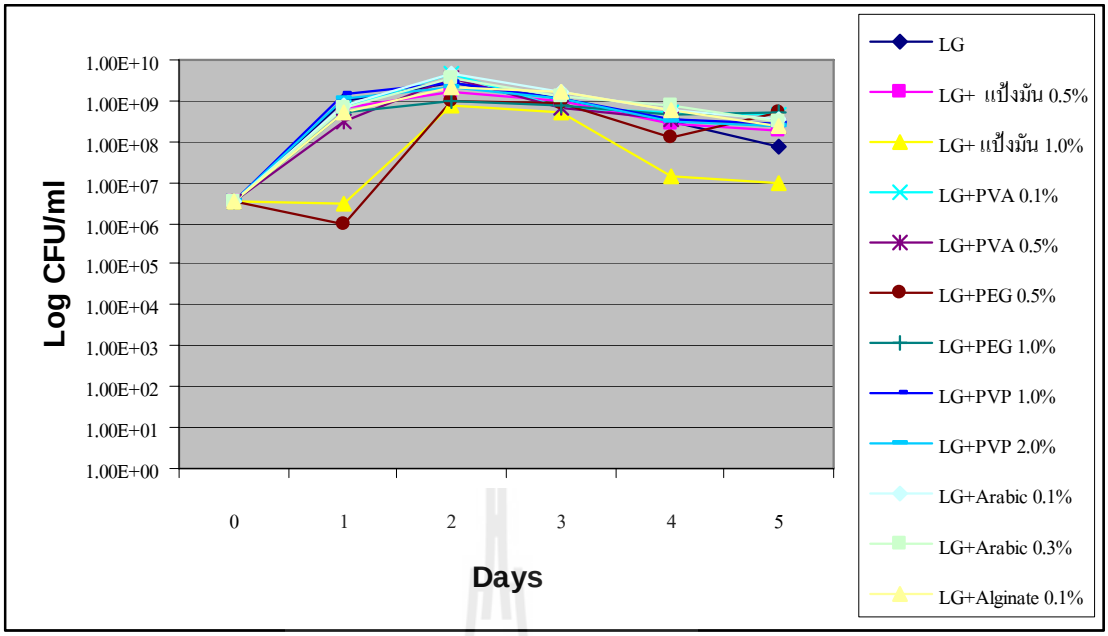


ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะชนิดต่างๆที่ใส่ปริมาณเชื้อ 1:1,000 (6.4×10^6 CFU/gram)

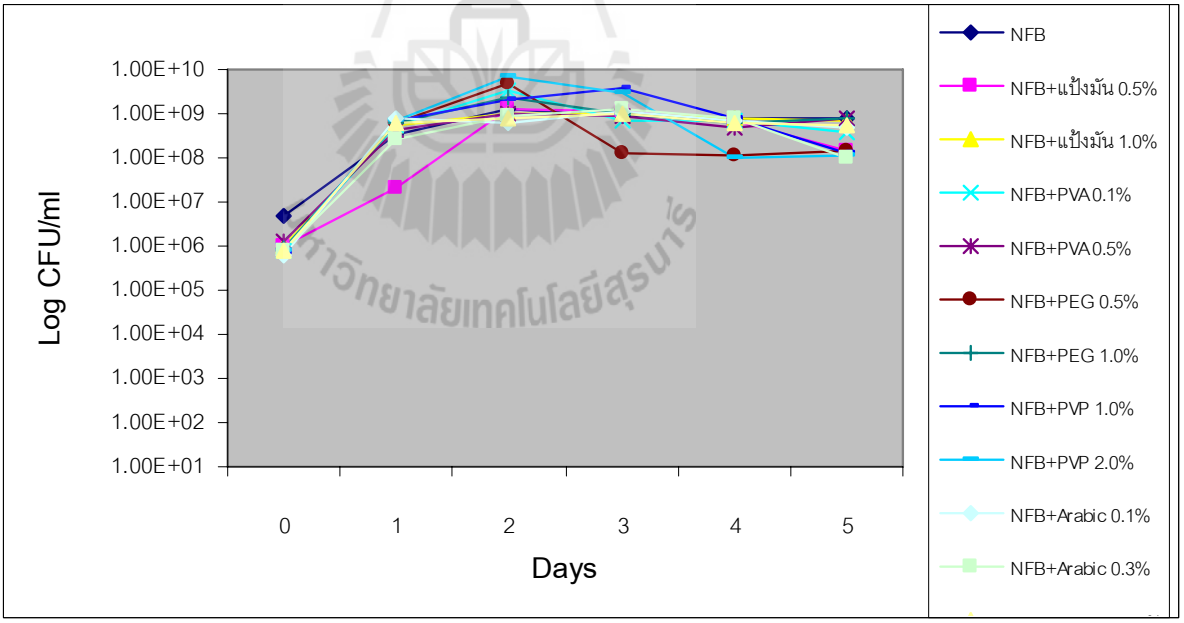
จากรูปกราฟที่ 4.5, 4.6, 4.7 และ 4.8 พบว่าปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ในระดับต่าง ๆ สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์ต่อไปได้ในวัสดุพาหะต่าง ๆ ที่ใช้ (เปลือกมันสำปะหลัง, เปลือกข้าวโพด, filter cake, ฟางข้าว, พีท) ได้เป็นอย่างดี แสดงให้เห็นว่าวัสดุพาหะต่างชนิดที่ใช้และปริมาณเชื้อเริ่มต้นไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ และการอยู่รอดของเชื้อ *Azospirillum* sp. มากนัก โดยพบว่า ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 1 สัปดาห์แรก และจากนั้นในช่วงระยะเวลา 1 เดือนเชื้อเพิ่มปริมาณขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งคงที่ และลดลงอีกเล็กน้อยที่ปริมาณเซลล์ 10^7 และ 10^6 CFU/กรัม วัสดุพาหะ หลังจาก 5 และ 6 เดือนตามลำดับ

4.2 การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุพาหะเหลวต่อเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.

จากการทดสอบวัสดุพาหะชนิดต่างๆกับเชื้อ *Azotobacter* sp. และเชื้อ *Azospirillum* sp. พบว่าวัสดุพาหะเหล่านี้ส่วนมากไม่เป็นพิษต่อเชื้อทั้งสองชนิด อีกทั้งยังสามารถส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญได้ดีกว่าสูตรอาหารมาตรฐาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัสดุพาหะสามารถถูกเชื้อทั้งสองชนิดนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ สำหรับเชื้อ *Azotobacter* sp.พบว่า PEG 0.5% และ1.0%, PVP 1.0% และ 2.0%, แป้งมันสำปะหลัง 0.5%, Arabic gum 0.3% และ Sodium alginate 0.1% ให้ปริมาณเชื้อคงเหลือมากที่สุด ส่วนเชื้อ *Azospirillum* sp. คือ PEG 1.0%, Sodium alginate 0.1%, PVA 0.1%, Arabic gum 0.1% และ แป้งมัน 1.0% ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะ ชนิดต่างๆ



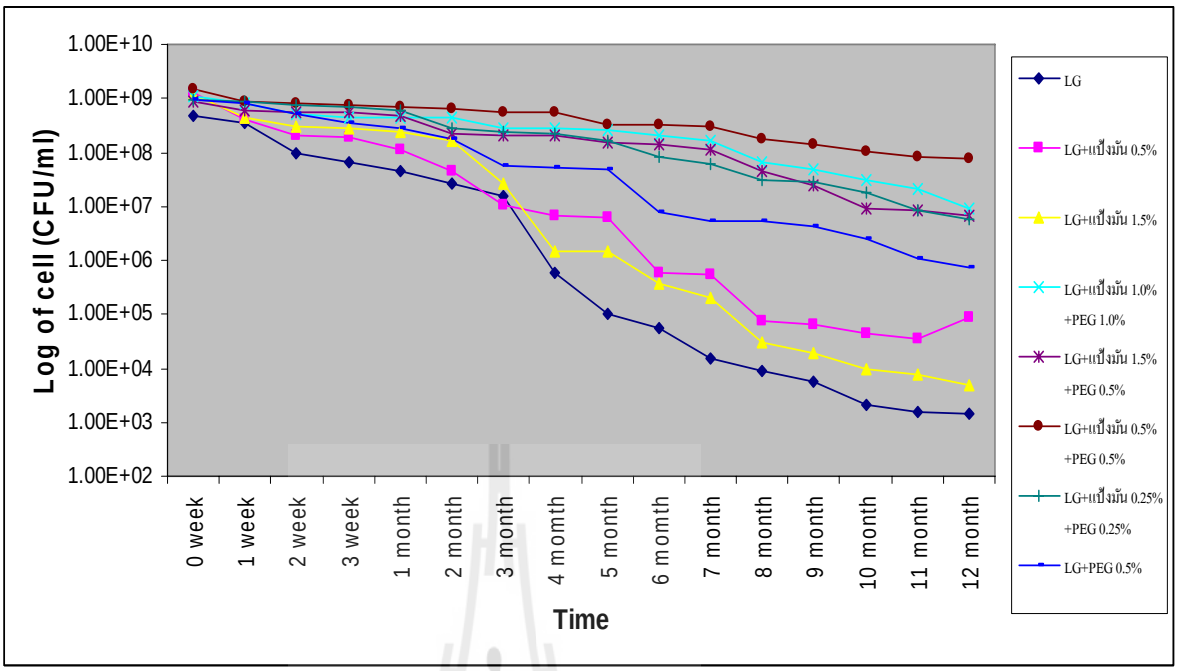
ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ในสูตรอาหารมาตราฐานและสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ

4.3 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบเป็นสูตรอาหาร

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ เมื่อเก็บไว้ 12 เดือน

Time	LG	LG +แป้งมัน 0.5%	LG +แป้งมัน 1.5%	LG+ แป้งมัน 1.0% +PEG 1.0%	LG+ แป้งมัน 1.5% +PEG 0.5%	LG+ แป้งมัน 0.5% +PEG 0.5%	LG+ แป้งมัน 0.25% +PEG 0.25%	LG+ PEG 0.5%
0 week	4.90×10^{8}	1.25×10^{9}	1.23×10^{9}	1.13×10^{9}	9.02×10^{8}	1.51×10^{9}	9.40×10^{8}	9.63×10^{8}
1 week	3.60×10^{8}	3.95×10^{8}	4.27×10^{8}	8.27×10^{8}	5.83×10^{8}	8.50×10^{8}	8.72×10^{8}	7.85×10^{8}
2 week	9.48×10^{7}	2.05×10^{8}	3.07×10^{8}	5.23×10^{8}	5.72×10^{8}	7.93×10^{8}	7.53×10^{8}	5.27×10^{8}
3 week	6.57×10^{7}	1.85×10^{8}	2.87×10^{8}	4.52×10^{8}	5.60×10^{8}	7.67×10^{8}	7.18×10^{8}	3.42×10^{8}
1 month	4.47×10^{7}	1.14×10^{8}	2.37×10^{8}	4.45×10^{8}	4.87×10^{8}	7.21×10^{8}	5.90×10^{8}	2.90×10^{8}
2 month	2.67×10^{7}	4.50×10^{7}	1.65×10^{8}	4.45×10^{8}	2.22×10^{8}	6.65×10^{8}	2.80×10^{8}	1.81×10^{8}
3 month	1.54×10^{7}	1.08×10^{7}	2.63×10^{7}	2.78×10^{8}	2.07×10^{8}	5.38×10^{8}	2.38×10^{8}	5.07×10^{7}
4 month	5.95×10^{5}	6.59×10^{6}	1.50×10^{6}	2.75×10^{8}	2.00×10^{8}	5.37×10^{8}	2.28×10^{8}	5.16×10^{7}
5month	1.00×10^{5}	6.38×10^{6}	1.45×10^{6}	2.67×10^{8}	1.56×10^{8}	3.23×10^{8}	1.63×10^{8}	5.00×10^{7}
6 month	2.52×10^{4}	5.92×10^{5}	3.65×10^{5}	2.12×10^{8}	1.38×10^{8}	3.20×10^{8}	8.28×10^{7}	7.70×10^{6}
7 month	1.50×10^{4}	5.40×10^{5}	1.95×10^{5}	1.58×10^{8}	1.08×10^{8}	2.98×10^{8}	5.93×10^{7}	5.48×10^{6}
8 month	9.20×10^{3}	7.72×10^{4}	3.04×10^{4}	6.40×10^{7}	4.50×10^{7}	1.78×10^{8}	3.02×10^{7}	5.37×10^{6}
9 month	5.64×10^{3}	6.39×10^{4}	1.85×10^{4}	4.92×10^{7}	2.48×10^{7}	1.37×10^{8}	2.95×10^{7}	4.37×10^{6}
10 month	2.05×10^{3}	4.75×10^{4}	9.50×10^{3}	3.08×10^{7}	9.25×10^{6}	1.02×10^{8}	1.87×10^{7}	2.58×10^{6}
11 month	1.54×10^{3}	3.48×10^{4}	7.82×10^{3}	2.04×10^{7}	8.49×10^{6}	8.38×10^{7}	8.60×10^{6}	1.05×10^{6}
12 month	1.46×10^{3}	9.05×10^{4}	4.87×10^{3}	8.87×10^{6}	6.54×10^{6}	7.60×10^{7}	5.83×10^{6}	7.37×10^{5}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



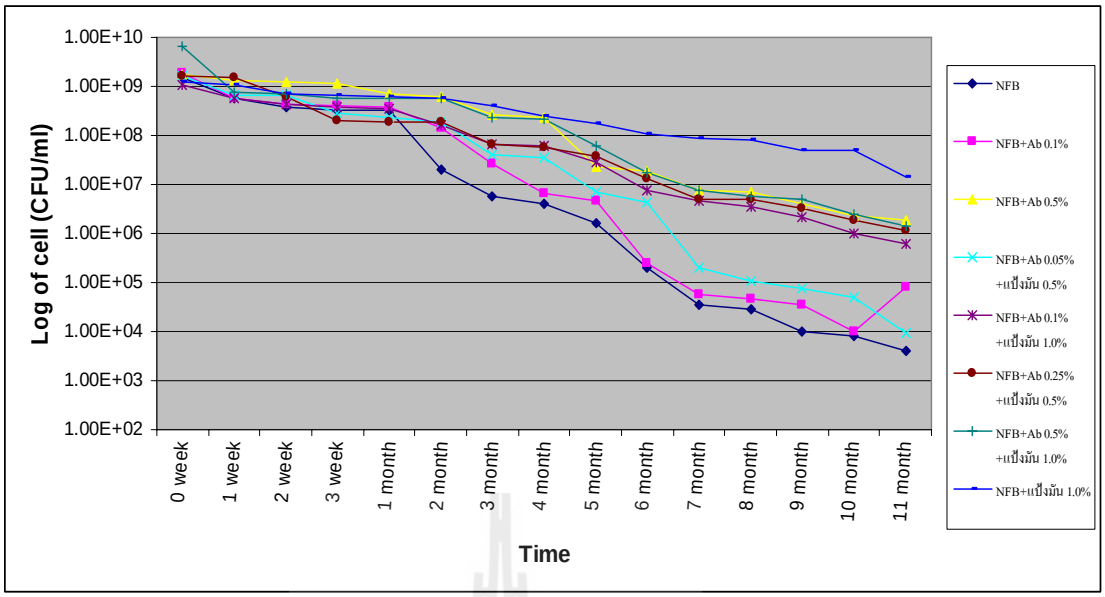
รูปที่ 4.11 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ

จากตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.11 แสดงผลการทดลองของวัสดุพาหะที่ผ่านการคัดเลือก ว่าสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของเชื้อ *Azotobacter* sp. ได้ดีกว่าชนิดอื่น หลังจากเก็บไว้ 12 เดือน อย่างไรก็ตามพบว่า มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตต่ำกว่า 10^8 CFU/ml สำหรับวัสดุพาหะทุกชนิด โดยพบว่าวัสดุพาหะที่ทำให้ *Azotobacter* sp. รอดชีวิตสูงถึง 10^8 CFU/ml นานที่สุด 10 เดือน ได้แก่ LG+PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% ส่วนวัสดุพาหะที่ทำให้เชื้ออยู่รอดสูงถึง 10^8 CFU/ml ถึงเดือนที่ 7 มีสองชนิด ได้แก่ LG+PEG 1.0%+แป้งมัน 1.0% และ LG+PEG 0.5%+แป้งมัน 1.5% ส่วนการใช้วัสดุพาหะชนิดอื่นพบปริมาณเชื้อรอดชีวิตจำนวน 10^8 CFU/ml นานไม่ถึง 6 เดือน โดยพบว่าปริมาณเชื้อรอดชีวิตเมื่อผ่านไป 12 เดือนลดลงเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะ LG ที่ไม่มีวัสดุพาหะ และ LG+แป้งมัน 1.5% ลดลงถึง 10^3 CFU/ml, LG+แป้งมัน 0.5% ลดลงถึง 10^4 CFU/ml ส่วน LG+PEG 1.0%+แป้งมัน 1.0%, LG+PEG 0.5%+แป้งมัน 1.5%, LG+PEG 0.25%+แป้งมัน 0.25%, LG+PEG 0. 5% ลดลงถึง 10^6 และ 10^5 CFU/ml ตามลำดับ สำหรับ LG+PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% พบเชื้อรอดชีวิตหลัง 12 เดือน 7.60×10^7 CFU/ml

ส่วนปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐานและสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดอื่น ๆ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) พบว่า ในช่วง 4 สัปดาห์แรก เชื้อ *Azotobacter* sp. เจริญได้ดีในทั้งอาหารมาตรฐานและอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดอื่นๆ ซึ่งโดยภาพรวมจะเห็นว่าอาหารที่ผสมวัสดุพาหะมีปริมาณเชื้อที่มากกว่าอาหารมาตรฐาน โดยมีปริมาณสูงกว่า 10^8 CFU/ml แต่เมื่อทำการทดลองต่อไปในเดือนที่ 2 ถึงเดือนที่ 6 พบว่า ปริมาณเชื้อลดลง โดยในเดือนที่ 4 พบว่า ส่วนมากปริมาณเซลล์ต่ำกว่า 10^7 cells/ml โดยเฉพาะในอาหารมาตรฐาน เมื่อถึงเดือนที่ 6 พบว่า ปริมาณเซลล์ต่ำกว่า 10^4 CFU/ml ในอาหารมาตรฐาน ส่วนในอาหารมาตรฐานที่ใส่วัสดุพาหะจะแตกต่างกันตั้งแต่ 10^8–10^6 CFU/ml ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุพาหะที่ใส่เข้าไป ซึ่งในการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่า อาหารมาตรฐาน LG ลำพังและวัสดุพาหะส่วนมากที่ใช้ในการทดลอง ไม่เหมาะที่จะใช้เก็บรักษา *Azotobacter* sp. ในระยะยาว

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ

Time	NFB	NFB +Ab 0.1%	NFB +Ab 0.5%	NFB+ Ab 0.05% +แป้งมัน 0.5%	NFB +Ab 0.1% +แป้งมัน 1.0%	NFB +Ab 0.25% +แป้งมัน 0.5%	NFB +Ab 0.5% +แป้งมัน 1.0%	NFB +แป้งมัน 1.0%
0 week	$1.55x10^9$	$1.81x10^9$	$1.70x10^9$	$1.67x10^9$	$1.04x10^9$	$1.64x10^9$	$6.68x10^9$	$1.24x10^9$
1 week	$5.92x10^8$	$5.88x10^8$	$1.31x10^9$	$6.45x10^8$	$5.82x10^8$	$1.50x10^9$	$7.52x10^8$	$1.07x10^9$
2 week	$3.73x10^8$	$4.40x10^8$	$1.20x10^9$	$6.45x10^8$	$4.31 x10^8$	$6.10x10^8$	$6.85x10^8$	$7.15x10^8$
3 week	$3.33x10^8$	$3.95x10^8$	$1.14x10^9$	$2.85x10^8$	$3.70x10^8$	$2.03x10^8$	$5.82x10^8$	$6.77x10^8$
1 month	$3.28x10^8$	$3.78x10^8$	$6.85x10^8$	$2.35x10^8$	$3.48x10^8$	$1.94x10^8$	$5.68x10^8$	$6.07x10^8$
2 month	$1.98x10^7$	$1.39x10^8$	$6.05x10^8$	$1.84x10^8$	$1.68x10^8$	$1.87x10^8$	$5.62x10^8$	$5.83x10^8$
3 month	$5.72x10^6$	$2.07x10^7$	$2.68x10^8$	$4.17x10^7$	$6.77x10^7$	$6.75x10^7$	$2.38x10^8$	$3.98x10^8$
4 month	$4.00x10^6$	$6.55x10^6$	$2.36x10^8$	$3.50x10^7$	$6.05x10^7$	$5.79x10^7$	$2.15x10^8$	$2.50x10^8$
5 month	$1.67x10^6$	$4.78x10^6$	$2.35x10^7$	$7.20x10^6$	$2.78x10^7$	$3.87x10^7$	$6.26x10^7$	$1.70x10^8$
6 month	$2.04x10^5$	$2.53x10^5$	$1.87x10^7$	$4.34x10^6$	$7.42x10^6$	$1.35x10^7$	$1.69x10^7$	$1.08x10^8$
7 month	$3.61x10^4$	$5.72x10^4$	$7.52x10^6$	$1.95x10^5$	$4.60x10^6$	$5.08x10^6$	$7.70x10^6$	$8.45x10^7$
8 month	$2.91x10^4$	$4.76x10^4$	$6.84x10^6$	$1.06x10^5$	$3.56x10^6$	$4.96x10^6$	$5.68x10^6$	$7.95x10^7$
9 month	$1.00x10^4$	$3.58x10^4$	$3.97x10^{67}$	$7.34x10^4$	$2.18x10^6$	$3.28x10^6$	$4.83x10^6$	$5.08x10^7$
10 month	$8.43x10^3$	$1.03x10^4$	$2.28x10^6$	$5.05x10^4$	$1.00x10^6$	$1.85x10^6$	$2.48x10^6$	$4.98x10^7$
11 month	$4.09x10^3$	$7.96x10^4$	$1.84x10^6$	$9.55x10^3$	$6.05x10^5$	$1.12x10^6$	$1.45x10^6$	$1.39x10^7$



ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐาน และสูตร อาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ

จากตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.12 แสดงผลการทดลองของวัสดุพาหะที่ผ่านการคัดเลือก ว่าสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของเชื้อ *Azospirillum* sp หลังจากเก็บไว้ 12 เดือน อย่างไรก็ดีพบว่ามีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตต่ำกว่า 10^8 CFU/ml สำหรับวัสดุพาหะทุกชนิด โดยวัสดุพาหะที่ทำให้ *Azospirillum* sp. รอดชีวิตสูงถึง 10^8 CFU/ml นานที่สุดเพียง 6 เดือน ได้แก่ NFB+แป้งมัน 1.0% ส่วนวัสดุพาหะชนิดอื่นทำให้ปริมาณเชื้ออยู่รอดชีวิตสูงถึง 10^8 CFU/ml นานไม่ถึง 5 เดือน โดยพบว่าปริมาณเชื้อรอดชีวิตเมื่อผ่านไป 12 เดือนลดลงเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ NFB ที่ไม่มีวัสดุพาหะ และ NFB+Arabic gum 0.05%+แป้งมัน 0.5% ลดลงถึง 10^3 CFU/ml NFB+Arabic gum 0.1% ลดลงถึง 10^4 CFU/ml ส่วน NFB+Arabic gum 0.1%+แป้งมัน 1.0%, NFB+Arabic gum 0.5%, NFB+Arabic gum 0.25%+แป้งมัน 0.5% และ NFB+แป้งมัน 1.0% พบเชื้อรอดชีวิตหลัง 12 เดือน 6.05×10^5 CFU/ml, 1.84×10^6 CFU/ml, 1.12×10^6 CFU/ml และ 1.39×10^7 CFU/ml ตามลำดับ

ส่วนเชื้อ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาในสูตรอาหารมาตรฐานและสูตรอาหารมาตรฐานที่ผสมวัสดุพาหะชนิดอื่นๆ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) พบว่า *Azospirillum* sp. เจริญได้ดีในทั้งอาหารมาตรฐานและอาหารที่ผสมวัสดุพาหะชนิดอื่นๆ ใน 4 สัปดาห์แรก โดยมีปริมาณเซลล์สูงกว่า 10^8 CFU /ml แต่เมื่อทำการทดลองต่อไปในเดือนที่ 2 ถึงเดือนที่ 6 พบว่าปริมาณเชื้อมีการลดลงเป็นลำดับโดยเฉพาะสูตรอาหารมาตรฐาน โดยเมื่อถึงเดือนที่ 6 พบว่าปริมาณเชื้อส่วนมากอยู่ระหว่าง 10^4 -10^6 CFU/ml เท่านั้นขึ้นอยู่กับชนิดวัสดุพาหะ ซึ่งในการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่า อาหารมาตรฐาน LG ลำพังและวัสดุพาหะส่วนมากที่ใช้ในการทดลอง ไม่เหมาะที่จะใช้เก็บรักษา *Azospirillum* sp. ในระยะยาว

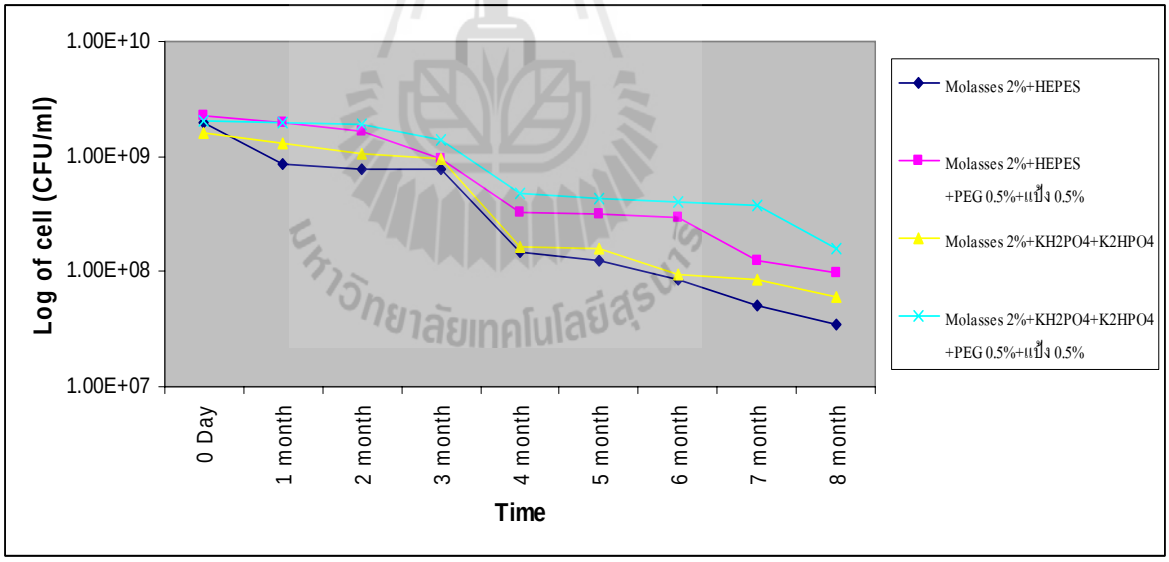
4.4 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบในสูตรอาหารที่เป็น molasses 2%

การใช้อาหารที่เป็น Molasses 2% ผสมวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ ทั้งที่เหมาะกับเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. นั้น ผลที่ได้คือในสัปดาห์ที่ 2 เมื่อนำตัวอย่างทุกตัวอย่างมาวัดหาปริมาณเชื้อที่อยู่รอดโดยวิธี total plate count พบว่า ปริมาณเชื้อทั้งสองที่อยู่รอดมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งในอาหารที่ใช้ Molasses 2% อย่างเดียว และ Molasses 2% ที่ผสมกับวัสดุพาหะเหลวแต่ละชนิด ซึ่งจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า ปริมาณเชื้อที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับค่าพีเอชที่ลดลง แสดงให้เห็นว่าค่าพีเอชมีผลต่อการเจริญของหัวเชื้อ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาโดยเติม buffer 2 ชนิดลงไปใน Molasses 2% เพื่อช่วยรักษาค่าพีเอช ได้แก่ HEPES buffer และ Phosphate buffer รวมทั้งศึกษาการใช้วัสดุพาหะที่เหมาะสม ซึ่งเลือกจากการศึกษาที่ผ่านมาที่ให้ปริมาณเชื้อที่อยู่รอดมากที่สุดสำหรับเชื้อ *Azotobacter* sp. คือ PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% และ *Azospirillum* sp. ได้แก่ แป้งมัน 1.0 % มาศึกษาร่วมกับการใช้ buffer 2 ชนิดด้วย ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างมาวัดหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตโดยวิธี total plate count พบว่า ปริมาณเชื้อที่อยู่รอดมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน เมื่อศึกษาต่อเนื่องจนถึงเดือนที่ 8 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azotobacter* sp. ที่เก็บรักษาใน Molasses 2% ที่ผสมกับ buffer และ PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน

Time	Molasses 2% +HEPES	Molasses 2% +HEPES+PEG 0.5% +แป้งมัน 0.5%	Molasses 2% +KH_2PO_4+K_2HPO_4	Molasses 2% +KH_2PO_4+K_2HPO_4 + PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5%
0 Day	$1.98x10^9$	$2.25x10^9$	$1.58x10^9$	$2.05x10^9$
1 month	$8.53x10^8$	$1.98x10^9$	$1.31x10^9$	$1.96x10^9$
2 month	$7.88x10^8$	$1.65x10^9$	$1.07x10^9$	$1.89x10^9$
3 month	$7.67x10^8$	$9.63x10^8$	$9.48x10^8$	$1.38x10^9$
4 month	$1.46x10^8$	$3.28x10^8$	$1.63x10^8$	$4.86x10^8$
5 month	$1.24x10^8$	$3.15x10^8$	$1.58x10^8$	$4.37x10^8$
6 month	$8.56x10^7$	$2.95x10^8$	$9.56x10^7$	$4.05x10^8$
7 month	$5.05x10^7$	$1.25x10^8$	$8.42x10^7$	$3.75x10^8$
8 month	$3.52x10^7$	$9.75x10^7$	$6.05x10^7$	$1.60x10^8$



ภาพที่ 4.13 กราฟแสดงปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azotobacter* sp. ที่เก็บรักษาในอาหารที่เป็น Molasses 2% ที่ผสมกับ Buffer และ PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน

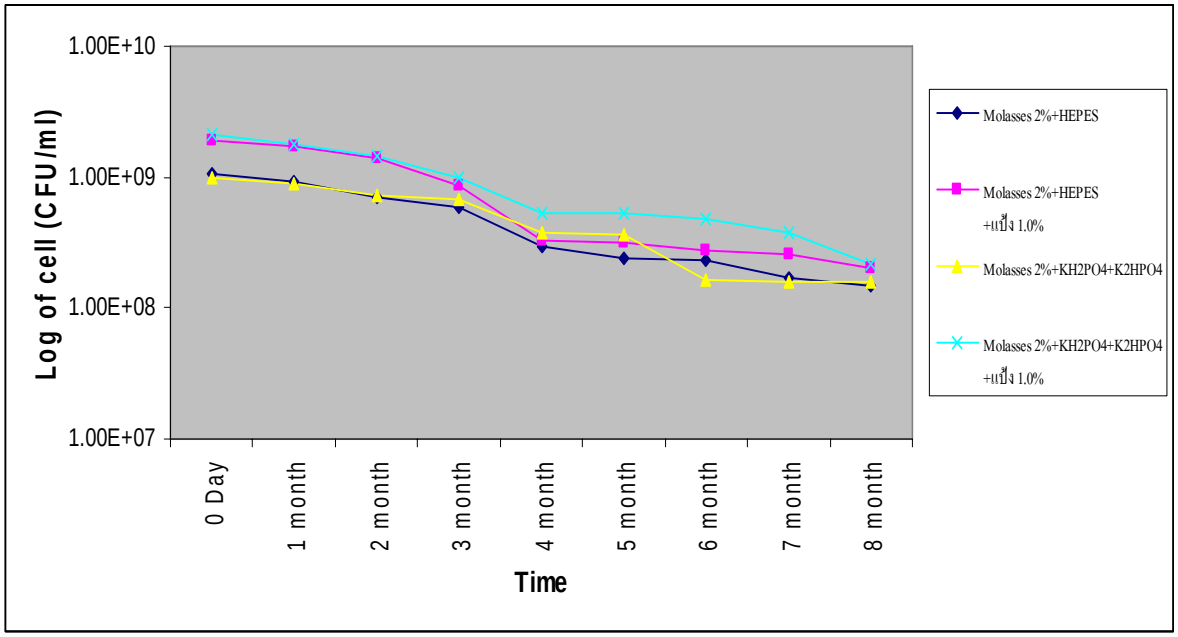
จากตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azotobacter* sp. เมื่อเดือนที่ 8 ที่ใช้ Molasses 2%+Phosphate buffer (KH_2PO_4+K_2HPO_4)+PEG 0.5%+แป้งมันสำปะหลัง 0.5% ให้ปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงที่สุดถึง $1.60x10^8$ CFU/ml ในขณะที่ Molasses 2%+Phosphate buffer เพียงอย่างเดียวพบปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตเพียง $6.05x10^7$ CFU/ml โดยจะเริ่มลดลงมาต่ำกว่า 10^8 CFU/ml ในเดือนที่ 6 ส่วนการใช้

HEPES buffer+Molasses 2% พบเชื้อที่รอดชีวิตหลังจากเดือนที่ 8 เพียง $3.52x10^7$ CFU/ml โดยเริ่มลดลงต่ำกว่า 10^8 CFU/ml ในเดือนที่ 6 ในขณะที่ใช้ Molasses 2%+HEPES buffer+PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% พบเชื้อรอดชีวิตเพียง $9.75x10^7$ CFU/ml ซึ่งเริ่มลดลงต่ำกว่า 10^8 CFU/ml ในเดือนที่ 7

สำหรับ *Azospirillum* sp. นั้นในการศึกษาการใช้ Molasses 2% รวมกับการใช้ Buffer และวัสดุพาหะที่เหมาะสม คือ แป้งมัน 1.0% เมื่อนำตัวอย่างมาวัดหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต โดยวิธี total plate count ซึ่งได้ศึกษาต่อเนื่องถึงเดือนที่ 8 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.14

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาใน Molasses 2% ที่ผสมกับ Buffer และ แป้งมัน 1.0% เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน

Time	Molasses 2% +HEPES	Molasses 2% +HEPES + แป้งมัน 1.0%	Molasses 2% +KH_2PO_4+K_2HPO_4	Molasses 2% + KH_2PO_4 +K_2HPO_4 + แป้งมัน 1.0%
0 Day	$1.05x10^9$	$1.88x10^9$	$9.89x10^8$	$2.15x10^9$
1 month	$9.07x10^8$	$1.69x10^9$	$9.00x10^8$	$1.79x10^9$
2 month	$6.95x10^8$	$1.39x10^9$	$7.30x10^8$	$1.45x10^9$
3 month	$5.79x10^8$	$8.50x10^8$	$6.77x10^8$	$1.00x10^9$
4 month	$2.95x10^8$	$3.30x10^8$	$3.83x10^8$	$5.36x10^8$
5 month	$2.38x10^8$	$3.19x10^8$	$3.65x10^8$	$4.86x10^8$
6 month	$2.35x10^8$	$2.76x10^8$	$1.63x10^8$	$1.00x10^8$
7 month	$1.72x10^8$	$2.59x10^8$	$1.60x10^8$	$3.75x10^8$
8 month	$1.46x10^8$	$2.05x10^8$	$1.57x10^8$	$2.81x10^8$



ภาพที่ 4.14 กราฟแสดงปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azospirillum* sp. ที่เก็บรักษาในอาหารที่เป็น Molasses 2% ที่ผสมกับ buffer และ แป้งมัน 1.0 % เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงใน Molasses 2% ที่เติม Buffer ทั้ง 2 ชนิดอย่างเดียว หรือที่มีการเติมวัสดุพาหะ คือ แป้งมันสำปะหลัง 1.0% ทำให้เชื้อรอดชีวิตสูงถึง 10^8 CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 8 เดือน โดยพบว่าการใช้ Molasses 2%+Phosphate buffer+แป้งมัน 1.0% มีเชื้อรอดชีวิตสูงที่สุดถึง 2.81×10^8 CFU/ml ส่วนการใช้ Molasses 2%+HEPES buffer+แป้งมัน 1.0% พบเชื้อรอดชีวิตรองลงมาคือ 2.05×10^8 CFU/ml สำหรับการใช้ Molasses 2%+Phosphate buffer และ Molasses 2%+HEPES buffer พบเชื้อรอดชีวิต 1.57×10^8 CFU/ml และ 1.46×10^8 CFU/ml ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษากระบวนการผลิตโดยใช้วิธี Dilution Technique ร่วมกับ Solid State Fermentation แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้จะใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเจือจาง และต้องใช้ปริมาณเชื้อที่น้อยลงเมื่อผสมกับวัสดุพาหะชนิดต่าง ๆ แต่ทั้งเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ก็สามารถเจริญเติบโตในวัสดุพาหะได้ดี เช่นเดียวกับการใช้เชื้อเข้มข้นในปริมาณมาก ๆ ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Roughley (1968) ที่พบว่าขนาดและปริมาณเชื้อเริ่มต้นไม่มีผลกระทบต่อปริมาณเชื้อไรโซเบียมในพีทที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว หากมีการให้ระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มปริมาณเชื้อในระยะหนึ่ง แต่อย่างไรก็ดีปริมาณเชื้อจะลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไปทั้งนี้เนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น คุณสมบัติการส่งผ่านอากาศของถุงพลาสติก ซึ่งทำให้สูญเสียความชื้นออกไปหรืออุณหภูมิในการเก็บรักษา (28-30 ^{o}C) ในระดับที่เชื้อยังมีการเจริญได้ ดังนั้นจึงมีการแบ่งตัวและตายไป (Roughley, 1968) อีกทั้งอาหารที่มีอยู่ในวัสดุพาหะมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นเมื่ออาหารเริ่มหมดไป (ประมาณ 2 สัปดาห์) ปริมาณเชื้อจึงค่อย ๆ ลดลง โดยในเชื้อไรโซเบียมได้มีการศึกษาพบว่าเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อให้เซลล์ที่ยังมีชีวิตต่อไปอีกระยะหนึ่ง คือ เซลล์มีขนาดเล็กลงและมีรูปร่างกลมรี (Feng และคณะ, 2002) อย่างไรก็ตามจากการทดลองเปรียบเทียบวัสดุพาหะทั้ง 5 ชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว พบว่าไม่มีความแตกต่างกันมากนักต่อการเพิ่มปริมาณ และการอยู่รอดของเชื้อทั้ง 2 ชนิด

การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุพาหะเหลวและการทดสอบคุณสมบัติของวัสดุพาหะในการเอื้ออำนวยให้เชื้อ *Azotobacter* sp.และ *Azospirillum* sp.มีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อประกอบเป็นสูตรอาหาร พบว่าวัสดุพาหะเหล่านี้ส่วนมากไม่เป็นพิษต่อเชื้อทั้งสองชนิด อีกทั้งยังสามารถส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญได้ดีกว่าสูตรอาหารมาตรฐาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัสดุพาหะสามารถถูกเชื้อทั้งสองชนิดนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ อย่างไรก็ดีสำหรับในอาหารมาตรฐานของเชื้อทั้งสองชนิดที่มีการเติมวัสดุพาหะชนิดต่างๆ หลังจากเก็บไว้นาน 12 เดือน นั้น พบว่า ปริมาณเชื้อลดลงค่อนข้างมาก โดยเฉพาะ *Azospirillum* sp. ที่มีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^{8} CFU/ml เพียงในเดือนแรกเท่านั้น อย่างไรก็ตามการใช้ NFB+แป้งมัน 1.0% สามารถทำให้มีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 108 CFU/ml ได้ถึง 6 เดือน ส่วนวัสดุพาหะชนิดอื่นๆ นั้นไม่สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 6 เดือน เนื่องจากมีปริมาณเชื้อค่อนข้างต่ำ ส่วน *Azotobacter* sp. นั้นพบว่ามีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^{8} CFU/ml ถึงเดือนที่ 10 โดยการใช้ LG+PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% ส่วนวัสดุพาหะชนิดอื่นๆ พบปริมาณเชื้อค่อนข้างต่ำ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แป้งมัน ซึ่งเป็น Biopolymer และมีราคาถูกช่วยส่งเสริมให้เชื้อทั้งสองชนิดมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตสูงกว่า 10^{8} CFU/ml หลังจาก 6 เดือน ไปแล้ว ซึ่งเกิดจากการที่แป้งมันมี colloidal stabilization นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตระหว่าง *Azotobacter* sp. กับ *Azospirillum* sp. ที่เก็บไว้พบว่า *Azotobacter* sp. ที่เก็บไว้มีจำนวนเชื้อรอดชีวิตสูงกว่าและสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า เนื่องจาก *Azotobacter* sp. มีการสร้าง Cyst (Inamdar และคณะ, 2000) ซึ่งทำให้สามารถมีความต้านทานในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน แห้งแล้ง รังสี เป็นต้น อย่างไรก็ตามการสร้าง Cyst ของ *Azotobacter* sp. นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ Carbon sources ที่ใช้ด้วย

ส่วนการใช้ Molasses 2% ในการเลี้ยงทั้งเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ที่มีการเติม Buffer 2 ชนิด คือ HEPES และ Phosphate buffer เพื่อช่วยในการรักษาค่า กรด-ด่าง ทำให้มีปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงกว่า 10^8 CFU/ml จนถึงเดือนที่ 5 ทั้งแบบที่ใช้ Molasses 2% เพียงอย่างเดียว และแบบที่เติมวัสดุพาหะ โดย *Azotobacter* sp. พบว่าการเติม PEG 0.5%+แป้งมัน 0.5% สามารถทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่า 10^8 CFU/ml ณ เดือนที่ 6 และสำหรับ *Azospirillum* sp. การเติมแป้งมัน 1.0% สามารถทำให้มีเชื้ออยู่รอดมากกว่า 10^8 CFU/ml ณ เดือนที่ 8 ผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า Buffer ที่เหมาะสมสำหรับ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. เมื่อใช้ร่วมกับ Molasses 2% คือ Phosphate buffer (KH_2PO_4+K_2HPO_4)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้ Molasses 2% ร่วมกับ Phosphate buffer และสูตรอาหารมาตรฐานของเชื้อทั้งสองชนิด ที่มีการใช้วัสดุพาหะชนิดเดียวกัน พบว่า การใช้ Molasses 2% ช่วยให้ปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงกว่าการใช้อาหารมาตรฐาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ *Azospirillum* sp. ที่พบว่าการใช้ Molasses 2% ร่วมกับ Buffer ทั้งสองชนิดเพียงอย่างเดียวทำให้พบเชื้อรอดชีวิตสูงกว่า 10^8 CFU/ml หลังจากเดือนที่ 8 และมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงขึ้นเมื่อมีการเติมวัสดุพาหะที่เป็นแป้งมัน 1.0% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารมาตรฐาน NFB นั้นพบเชื้อรอดชีวิตต่ำกว่า 10^8 CFU/ml เมื่อถึงเดือนที่ 8 แม้เมื่อมีการเติมวัสดุพาหะที่เป็นแป้งมัน 1.0% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการใช้ Molasses 2% ร่วมกับ Phosphate buffer เป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาใช้ผลิตหัวเชื้อสำหรับทั้ง *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. เนื่องจากมีราคาถูกและส่งเสริมให้มีจำนวนเชื้อรอดชีวิตค่อนข้างสูง เก็บไว้ได้นานกว่า 6 เดือนที่อุณหภูมิปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหารมาตรฐานที่ใช้วัสดุพาหะชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตามการที่เชื้อรอดชีวิตอยู่ในวัสดุพาหะเป็นเวลานานเท่าไรนั้นก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ สายพันธุ์ และชนิดของวัสดุพาหะด้วย รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา จากผลการทดลองน่าจะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการผลิตหัวเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. สำหรับการค้าได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Arangarasan, V., Palaniappan, S. P. and Chelliah, S. (1998). Inoculation effects of diazotrops and phosphobacteria on rice. Indian Journal of Microbiology 38, 111-112.

Islam, N. and Bora, L. C. (1998). Biological management of bacterial leaf blight of rice (Oryza sativa) with plant growth promoting rhizobacteria. Indian Journal of Agricultural Science 68, 798-800.

James, E. K., Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, J. L. and Dobereiner, J. (1994). Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium Acetobacter diazotrophicus. Journal of Experimental Botany 45, 757-766.

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.

Kennedy, I. R. and Tchan, Y. (1992). Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances. Plant and Soil 141, 93-118.

Lee, S., Pierson, B. and Kennedy, C. (2002). Genetics and biochemistry of nitrogen fixation and other factors beneficial to host plant growth in diazotrophic endophytes. In: Vanderleyden, J., (Ed.), Proceedings of the Ninth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes, Katholique Universiteit, Leuven, Belgium, pp. 41-42.

Malik, K. A., Mirza, M. S., Hassan, U., Mehnaz, S., Rasul, G., Haurat, J., Bally, R. and Normand, P. (2002). The role of plant-associated beneficial bacteria in rice-wheat cropping system. In: Kennedy, L. R., Choudhury, A. T. M. A. (Eds.), Biofertilisers in Action. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, pp. 73-83.

Matthews, S. S., Sparkes, D. L. and Bullard, M. J. (2001). The response of wheat to inoculation with the diazotroph Azorhizobium caulinodans. Aspects of Applied Biology 63, 35-42.

Nguyen, T. H., Deaker, R., Kennedy, L. R. and Roughley, R. J. (2003). The positive yield response of field-grown rice to inoculation with a multi-strain biofertiliser in the Hanoi area, Vietnam. Symbiosis 35, 231-245.

Saleh, S. A., Mekhemar, G. A. A., El-Soud, A. A. A., Ragab, A. A. And Mikhaeel, F. T. (2001). Survival of Azorhozobium and Azospirillum in different carrier materials: inoculation of wheat and Sesbania rostrata. Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University 52, 319-338.

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.

ประวัติผู้วิจัย

Name: **ChokchaiWanapu (Intapruk)**

Sex: Male ***Nationality:*** Thai

Religion: Buddhism

Home Address: 114/246 Ratchsima–Pakthongchai Road, NongJa Bok, Muang, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

Present Status: Assistant Professor in Institute of Agricultural Technology, SuranareeUniversity of Technology, NakhonRatchasima30000, Thailand.

Education Backgroundand Experience:

From 1978 – 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, ChiangmaiUniversity, Chiangmai, Thailand.

From 1982 – 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, MahidolUniversity, Bangkok, Thailand.

From 1991 – 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, OsakaUniversity, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, WalailakUniversity, NakhonSritummarat80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, SuranareeUniversity of Technology, NakhonRatchasima30000, Thailand.

From 2002 – 2005: Manager of SUT's Farm, Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima30000, Thailand.

From 2006 – 2011: Chair, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima 30000, Thailand.

Scientific Experients:

Plant and microbial molecular genetics.

Fermentation Techniques

Biopolymers

Symposium:

Krongjai, T. and **Wanapu, C.** (2004) The transformation of chitinase gene into grape plants. The 4th National Symposium on Graduate Research. 94.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd.N. (2004) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor.The 4th National Symposium on Graduate Research. 124.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2004) Selection of maolactic bacteria for wine fermentation.The 4th National Symposium on Graduate Research. 128.

Kuapunyakoon, T., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Chervin,C. (2004) What is the gene which expression depends ethylene receptor inhibition in berry of Carbernet Sauvignon at veraison. The 4th National Symposium on Graduate Research. 93.

Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste.The 3rd National Symposium on Graduate Research.633-634.

Sripunya, P. and **Wanapu, C.** (2005) Selection of Yeast Strains Containing β-glucosidase for improving Aroma in Grape Wine.31st Congress on Science and Technology of Thailand at SuranareeUniversity of Technology, 18 – 20 October 2005, B0100.

Tasing, K., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N., Wongkaew, S. (2005) Transformation of grape calli variety shiraz with LeucaenachitinasecDNA. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at SuranareeUniversity of Technology, 18 – 20 October 2005, B0109.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2005) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at SuranareeUniversity of Technology, 18 – 20 October 2005, B0116.

Lertpinyochaithaworn, N., Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2005) Ma-Maow wine production.31st Congress on Science and Technology of Thailand at SuranareeUniversity of Technology, 18 – 20 October 2005, B0139.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at SuranareeUniversity of Technology, 18 – 20 October 2005, F0028.

Wanapu, C., Rattana, P., Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (2005) Success stories of stainable factory Management for the Thai traditional alcoholic beverage enterprises. In

International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24–25 November 2005, Bangkok. Session 2B–3: 1–8.

Boonkerd N., Teaumroong, N., **Wanapu C.** and Chankhun Y. (2005) Application of Bio and Bioorganic fertilizers in organic farming systems for sustainable agriculture. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24–25 November 2005, Bangkok. Session 2B–4: 1–7.

Muaenjang, T. and **Wanapu, C.** (2006) The study of ethanol production of thermotolerant yeast S1 strain. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15–17 December 2006 Bangkok.

Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2006) Isolation and classification of thermotolerant yeast for ethanol production. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15–17 December 2006 Bangkok.

Wasuwan, R., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.** (2006) Classification and nitrogen fixation efficiency analysis of *Azolla* species in rice fields of Thailand.The 11th Biological Science Graduate Congress, 15–17 December 2006 Bangkok.

Usansa, U., Wanapu, C. and N. Boonkerd (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Chaing Mai, 2005.

Usansa U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea–umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2008) The use of response surface methodology to optimize malting conditions of two black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica) as a raw material for gluten– free foods. First International Symposium on Gluten–Free Products and Beverages, Cork, Ireland, September 2008.

Usansa, U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea–umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2009) The optimization of malting condition for Thai rice. 10th RGJ– Congress.Pattaya, April 2009.

Usansa, U, Geiger, E., **Wanapu, C**. and Teaumroong, N. (2009) Improvement of nitrogenous content in wort produced from rice malt. ASBC Annual Meeting.Arizona, USA June 6–10, 2009.

Kongkaew, A., Wanapu, C. and Usansa, U. (2010) Response surface optimization of wort production for brewing from rice malt using commercial enzymes and malt barley. The

16th Asian Agricultural Symposium on Agricultural Technology: Sufficiency Agriculture, August 25 – 27, 2010, Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2010) FT-IR study for hydroxyapatite/alginate nanocompositebeads.The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Li, L., **Wanapu, C**., Huang, X., Huang Q., and Huang, T. (2010) Genetic variation of *Brassica napus* cultivars using SSR markers.The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Kongkaew, A., Wanapu, C., and Usansa, U. (2010) Beer production from rice malt based in pilot scale brewing : chemical and sensorial properties approach. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, SuranareeUniversity of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012) Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. BuraphaUniversity International Conference 2012, July 9-11, 2012, BuraphaUniversity, ChonburiThailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012) High selenium-Enriched Yeast Production.BuraphaUniversity International Conference 2012, July 9-11, 2012, BuraphaUniversity, ChonburiThailand.

Muaenjang, T., Ponchana P., and**Wanapu, C**. (2012) Improved Enzymatic Hydrolysis of Cassava Residue by Polyethylene Glycol Addition. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, SuranareeUniversity of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Satsum, A, and**Wanapu, C**. (2012) FT-IR study for Aiginate/Hydroxyapatite/latex NanocompositeBeads.School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012) Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, SuranareeUniversity of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012) High selenium–Enriched Yeast Production.School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16–20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pliansrithong P., Usansa U., and**Wanapu, C**. (2012) Protein Properties in Broken Rice for optimizing of Rice Ratio in Beer Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16–20, 2012, SuranareeUniversity of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Lertpinyochaithaworn N, and**Wanapu, C**. (2012) Effect of ethanolic on black–kernal rice flavonoids character. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16–20, 2012, SuranareeUniversity of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Scientific Publication:

Intapruk, C., Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. MahidolUniversity Annual Research Abstracts 11, 297.

Intapruk, C. (1984) in Manual for international laboratory workshop ''Genetic engineering techniques in tropical diseases research'' to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195–204.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210–213.

Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. MahidolUniversity Annual Research Abstracts, 12, 250.

Intapruk, C. (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172–188.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299–305.

Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). Songkla Med J. 6, 428–435.

Intapruk, C., Higashimura, N., Yamamoto, K., Okada, N., Shinmyo, A. and Takano M (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237–241.

Intapruk, C., Yamamoto, K., Fujiyama, K., Shinmyo, A. and Takano, M. (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166–172.

Shinmyo, A., Fujiyama, K., Kawaoka, A. and**Intapruk, C.** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. *In*: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222–228.

Intapruk, C., Yamamoto, K., Sekine, M., Shinmyo, A. and Takano, M. (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 13: 123–129.

Intapruk, C., Takano, M. and Shinmyo, A. (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104: 285–286.

Wanapu, C. and Shinmyo, A. (1996) *cis*–Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high–salt stress. Ann New YorkAcad Sci. 782 (12): 107–114.

Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000) Starch–utilizing bacteria for L–lactic acid production.The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.

Kanchanatawee, S., **Wanapu, C.** and Ketudat–Cairns, M. (2000) Biotechnology postgraduate program in Thailand. Thai J. Biotechnol. 2, 55–62.

Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002) Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonassalina* strain AS11. J. Biotech. 95, 171–179.

Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cereviseae* K1–V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147–151.

Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of β–glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* on aroma production during mango (Chok–anan) wine fermentation. Thai J. Biotechnol. 6: 50–56.

Usansa, U., Sompong, N., **Wanapu, C.,**Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2009) The influences of steeping duration and temperature on the α– and β– amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. indica). J. Inst. Brew. 105 (2) 140–147.

Teaumroong, N., **Wanapu, C**., Chankum, Y., Arjharn, W., Sang–Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010) Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: A case study. In: Insam, H., Franke–Whittle, I. and Goberna, M. (eds). Microbs at work: from wastes to resources. Springer–Verlag, Berlin, Heidelberg. 294–296.

Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E., Back, W., **Wanapu, C.,** Arendt, E.K., Kreisz, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N. and Zarnkow, M. (2011) Optimization of malting for two black rice varieties, black non–waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). J. Inst. Brew. 117(1), 39–46.

Vechklang, K., Boonanuntanasarn, S. Ponchunchoovong, S., PiraratN. and**Wanapu, C.** (2011) The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) at the juvenile stage. Aqua.Nut., 17(6), 685–694.

Li L., **Wanapu, C.**, Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y. and Huang, G. (2011) Comparison of AFLP and SSR for Genetic Diversity Analysis of *Brassica napus*Hybrids. J Agri. Sc. 3(3), 101–110.

Boonterm, C., **Wanapu, C**., Silapapun, A. and Boonkerd, N. (2011) Effects of nitrogen, potassium fertilized, and clusters per vine on anthocyanins content in cabernet sauvignon wine. Suranaree J. Sci. Technol. 18(1), 41–54.

Li, L., Huang, X., **Wanapu, C**., Li, Q., Huang, G. and Huang, T. (2011) Genetic diversity analysis of 25 rapeseed varieties from Guizhou rapeseed regional test by SSR marker.Guizhou Agri. Sc. 11, 1–4 (in Chinese).

Wanapu, C.,Sripunya, P. and Boonkerd, N. (2012) Selection of yeast strains β–glucosidase for improving wine aroma. J. Agri. Sc. Technol. B, 2, 691–702.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012) Beer production from rice malt based in pilot–scale: volatile compounds and sensorial properties analysis. The Journal of KingMongkut'sUniversity of Technology. 3(1), 86–94.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012) Optimization of wort production from rice malt using enzymes and barley malt. Af. J. Biotech. 11(42), 9941–9949.

Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntanasarn, S., Welker, T., Ponchunchuwong, S., Klesius, P.H. and **Wanapu, C.** (2012) Growth performance and resistance to *Streptococcus iniae* of juvenile Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) fed diets supplemented with GroBiotic–A and Brewtech dried brewers yeast. J App. Aqua. 24, 183–198.

Patents:5 Thai patents and 3 Trade Secrets.

Current Research Works:

1. The Bioprocess Control of Microbial Alginates for Industrial Production.
2. Composition of Biopolymer and Filmogenics.
3. Improvement of Bioethanol Production by Using Thermotolerant Yeasts and Bioconversion.
4. Thai Rice Beer Production.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี