

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : การลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวและสารพิษจากรา
2. โครงการวิจัย : การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์
- กิจกรรม : การใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ
- กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
1. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา
- ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Biological Products of *Bacillus subtilis* for Controlling Fungi and Aflatoxin Production
2. คณะผู้ดำเนินงาน
- หัวหน้าการทดลอง : นายชวเลิศ ตรีภรณ์สวัสดิ์ สังกัด กวป.
- ผู้ร่วมงาน : นางสาวสุพี วนศิริกุล สังกัด กวป.
นางสาวอัจฉราพร ศรีจูดานู สังกัด กวป.
3. บทคัดย่อ :

บทคัดย่อ

การศึกษาการพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราคือใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 พบว่าสภาพที่เหมาะสมการผลิตเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในปริมาณมากคือการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (C57) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีการเพิ่มปริมาณถึง stationary phase ในช่วง 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สูตร

ชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบคือ ใช้แป้งข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 ml และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกันกับเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตร บรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอยขนาด 10 กรัม โดยมีระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะสามารถเก็บรักษาได้คือ ไม่เกิน 2 เดือนภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำในตู้เย็น ขณะที่การใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุม เชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่าการให้ชีวภัณฑ์แก่ถั่วลิสงโดยให้ 10 กรัม พร้อมปลูกหรือให้ 10 กรัม ก่อนปลูก 3 วันมีแนวโน้มที่สามารถลดประชากร *A. flavus* และลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินที่ตรวจสอบจากผลผลิตถั่วลิสง ได้ดีกว่าการให้ช่วงออกดอก

คำหลัก: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, ชีวภัณฑ์, แอฟลาทอกซิน ปี 1, การยับยั้ง

Abstract

In this study, biological products of *Bacillus subtilis* C57 was developed for controlling of *Aspergillus flavus* and Aflatoxins contamination. In the development, the proper conditions of mass production for cell culture was testified and results shown that NB (Nutrient Blot) medium, temperature condition of 35 °C would be suitable to growth of bacteria and induced growth rate reaching to the stationary phase after 24 hours of inoculation. The formula of biological products consisting of rice flour 2000 gram, soybean oil 20 ml and sucrose 200 gram well mixed with 400 ml of bacterial cell culture of *Bacillus subtilis* C57 which diluted at concentration of 1.0 OD (wavelength 600 nm.). Then the mixture was separated in 10 gram and load in aluminum foil bag after dryness at 45 °C. Biological product was tested for storage tolerance for 6 months and results revealed that the proper period of storage is 2 months maximum under cold temperature (commercial refrigerator). The research for proper using of biological products was conducted by treating to growing groundnut in the pots (12 inches diameter), comparing of treatments of using 10 gram of biological products into 1.) Non-used 2.) At 3 days before planting 3.) At planting date and 4.) At flowering stage. The *Aspergillus flavus* and Aflatoxins contamination in growing media and groundnut pod yields were investigated and the results revealed that the treatments of biological products using at 3 days before planting and at

planting date tend to reduce the population of *A. flavus* and Aflatoxins contamination rather than using at flowering stage.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, Aflatoxin, biological products

4. คำนำ :

การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) เป็นปัญหาที่พบในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวหลายชนิด ทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ การปนเปื้อนพบได้ทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ซึ่งเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงและคาดการณ์ได้ยาก การจัดการเพื่อลดความเสี่ยงในการบริโภคผลิตผลเกษตรที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง (อมรา และคณะ, 2551) การควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อน การใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต การใช้รังสี วิธีทางเคมี เช่น การใช้โซเดียม ไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) การใช้ไอโซน การใช้โซเดียมไดซัลไฟด์ (sodium disulfide) แต่วิธีดังกล่าว ก็ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งทำให้เกิดความสูญเสียทางโภชนาการกับผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ด้วย (Line and Brackett, 1995) การใช้วิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น การใช้แบคทีเรีย ยีสต์ หรือเชื้อรา เนื่องจากพบได้ในธรรมชาติ และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม กลไกที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยทางชีวภาพนั้นมีรูปแบบที่หลากหลายไม่สามารถกำหนดขอบเขตที่ชัดเจนได้ มีทั้งที่เป็นผลโดยตรงในการยับยั้ง และเป็นวิธีการเฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคพืช กลไกที่มักพบโดยทั่วไป คือ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยการสร้างสารปฏิชีวนะ เอนไซม์หรือสาร biocide ออกมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุ โดยจะไปจำกัดปัจจัยที่ใช้ในการดำรงชีวิตให้ใช้ได้น้อยลงหรือไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Paul and Clark, 1996)

แบคทีเรีย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (rod shaped) อาจเป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย สร้างโคโลนีผิวด้าน (dull) หรือผิวย่นทั้งเซลล์ (wrinkled) เป็นสีครีมหรือน้ำตาลอ่อน (Gordon, 1989) เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง 5-55 องศาเซลเซียส ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงและสภาพเป็นด่างได้อย่างดี เจริญได้ตั้งแต่ pH 5.5 ไปถึง 8.8 (สุรางค์, 2555)

สุพิ์ และคณะ (2560) ได้การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* A39 ทำการศึกษาโดยเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในอาหารเหลว nutrient broth ที่ระดับความ

เป็นกรด-ด่าง 5 6 7 และ 8 ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า *B. subtilis* C57 มีการเจริญสูงสุดที่อายุ 24 ชั่วโมง และลดลงเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา นานขึ้น พบการเจริญเฉลี่ยสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 35 30 และ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณ 1.2×10^9 , 9.5×10^8 , 5.3×10^8 และ 2.8×10^8 ตามลำดับ สภาวะความเป็นกรด-ด่างมีผลทำให้การเจริญของ *B. subtilis* C57 แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็น กรด-ด่าง เท่ากับ 8 เมื่อนำแบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันมาทดสอบประสิทธิภาพการ ยับยั้งการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซิน ปี1 ของเชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่า *B. subtilis* C57 ที่อายุแตกต่างกัน มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* A39 โดยแบคทีเรียที่อายุ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรียที่อายุ 48 และ 72 ชั่วโมง การยับยั้งเฉลี่ย สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 35 25 และ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณการยับยั้ง 48.1, 40.6, 29.4 และ 28.4% ตามลำดับ และ *B. subtilis* C57 อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน ปี1 ได้ดีที่สุดเฉลี่ย 55.5% เท่ากัน รองลงมา คือที่อุณหภูมิ 40 และ 25 องศาเซลเซียส มีการยับยั้งเฉลี่ย 50.86, และ 39.4% ตามลำดับ

จากรายงานดังกล่าวสรุปเป็นสภาวะและเงื่อนไขในการทดลองการพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา คือใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 มีอัตราการ เจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้มีประสิทธิภาพสูง ในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน ปี1 ของเชื้อรา *A. flavus* A39 และพบว่า *B. subtilis* C57 สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง ระดับ 5 – 7

5. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57
2. เชื้อรา *Aspergillus flavus* A39
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ: Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB) Potato Dextrose Agar (PDA)
4. ชุดทดสอบสารแอฟลาทอกซินสำเร็จรูป DOA –Aflatoxin ELISA test kit
5. คิวเวตพลาสติก (cuvette)
6. เมทานอล

7. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 4
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
9. เครื่องอ่าน MicroELISA Reader
10. เครื่อง spectrophotometer
11. แป้งทัลคัม
12. แคลเซียมคาร์บอเนต
13. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โซเดียม ซอลท์ (CMC)
14. ฤงอะลูมิเนียมฟอย
15. กระดาษขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว
16. ดินปลูกที่มีเชื้อ *A. flavus* (infested soil)

- วิธีการ

เตรียมหัวเชื้อที่จะใช้ในการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยแบคทีเรียให้ได้ปริมาณ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ให้ได้เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

1. ศึกษาการผลิตเซลแขวนลอยแบคทีเรียในปริมาณมาก

ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (C57) ตามสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อได้จากรายงานของ สุพี และคณะ (2560) คือใช้อาหารเหลว NB ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 5 ปริมาตร 1000 ml. บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยปรับความเข้มข้นให้ได้ค่า OD = 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่ 0 24 และ 48 ชม.

2. การเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบ

2.1 การเตรียมชีวภัณฑ์สูตรทัลคัม (Figure 1)

ประกอบไปด้วย

- 1 แป้งทัลคัม 60 กรัม
- 2 แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม
- 3 คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โซเดียม ซอลท์ (CMC) 8 กรัม

4 น้ำสกัดมันฝรั่ง 2 กรัม

5 เชื้อแบคทีเรียที่มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จำนวน 20 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสูตรตัดแปลงของ ณิชกานต์, 2554 (Figure 2-4)

มีขั้นตอนดังนี้

1). เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ในอาหารเหลว NB ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 5 ปริมาตร 1000 ml. บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2). เก็บเกี่ยวเชื้อแบคทีเรียด้วย centrifuge ที่ 4°C ความเร็ว 4000 rpm นาน 10 นาที นำตะกอน pallette ของเชื้อมาเจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0

3). เตรียมสูตรชีวภัณฑ์ประกอบไปด้วย แป้งข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 ml และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกัน นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน เมื่อเย็นตัวลงจึงนำมาผสมกับเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตรที่เจือจางความเข้มข้นแล้ว

4). อบอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียด

5). บรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอย 10 กรัม

3 การศึกษาความทนทานต่อสภาพการเก็บรักษา

เตรียมชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* (C57) ตามสูตรตัดแปลงของ ณิชกานต์, 2554 แล้วบรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอย 10 กรัม ได้ชีวภัณฑ์ทั้งหมด 200 ถุง นำมาเก็บในสภาพอุณหภูมิ 2 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน แล้วนำออกมาประเมินอัตราการอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ทุก 1 เดือน โดยวิธี plate count technique วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การประเมินอัตราการอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ในชีวภัณฑ์ต้นแบบ โดยวิธี plate count technique มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ผงชีวภัณฑ์ 10 กรัม ต่อน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
2. ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 10-15 นาที
3. นำส่วนใสไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยวิธีการ Serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นระดับ $10^{-1} - 10^{-5}$ เท่า
4. ดูดสารแขวนลอยเชื้อ 0.1 ml นำไป spread plate บนอาหาร NA ในจานเลี้ยงเชื้อจำนวน 3 เพลท (ซ้ำ) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชั่วโมง
5. ตรวจสอบจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณตามวิธีการคำนวณโคโลนี

โดยใช้สูตร $\bar{X} \times df \times 10$

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยของโคโลนีจาก 3 ซ้ำ ของความเข้มข้นจะใช้หาค่า CFU

df = ความเข้มข้นในการ spread plate (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} )

จากสูตร $\bar{X} \times df \times 10$

4 การทดลองให้ชีวภัณฑ์แก่ต้นถั่วลิสงในกระถาง

เนื่องด้วยผลการเตรียมชีวภัณฑ์ใหม่โดยใช้สูตรที่ลดค่า ให้ผลไม่ดีนัก จึงจะใช้สูตรดัดแปลงของ ณิชกานต์, 2554 ในการทดลองกับต้นถั่วลิสงในกระถาง โดยเริ่มดำเนินการเตรียมสูตรชีวภัณฑ์ที่เตรียม จากเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) และ activate เชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่ active และเตรียมการสถานที่ปลูก ถั่วลิสง กระถาง วัสดุเพาะปลูก

ใช้กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว และดินปลูกที่มีเชื้อ *A. flavus* (infested soil) โดยนำ สปอร์แขวนลอยเชื้อรา ผสมกับดินที่บ่มฆ่าเชื้อแล้วใน อัตรา 1: 25 v/w ตรวจสอบปริมาณเชื้อราเริ่มต้นโดย วิธี Soil dilution plate method นำดินที่ใส่เชื้อ บ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ก่อนปลูกถั่วลิสง วางแผนการ ทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำและให้ 1 กระถางเป็น 1 experimental unit ด้วยวิธีการให้ชีวภัณฑ์ 1 ซอง (10 กรัม) ที่ผสมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 500 มิลลิลิตรต่อกระถางโดยกำหนดวิธีการให้ 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธี 1 ไม่ให้ชีวภัณฑ์

กรรมวิธี 2 ให้ชีวภัณฑ์ 1 ซองก่อนปลูก 3 วัน

กรรมวิธี 3 ให้ชีวภัณฑ์ 1 ซองพร้อมปลูก

กรรมวิธี 4 ให้ชีวภัณฑ์ 1 ซองหลังปลูก 1 เดือน (หรือเมื่อดอกบาน)

- ขั้นตอนการบันทึกผลการทดลอง

1) เก็บตัวอย่างดินในบริเวณราก (root zone) ของต้นถั่วมาตรวจสอบประชากรเชื้อด้วย selective medium ของ *A. flavus* (AFPA selective medium) ตั้งแต่เริ่มจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดย บันทึกผลโดยตรวจนับจำนวนโคโลนีของ *A. flavus* ทุก 15 วัน

2) ตรวจสอบการปนเปื้อน *A. flavus* ด้วย selective medium ของ *A. flavus* และสารพิษ แอฟลาทอกซินในผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวด้วยชุดตรวจสอบแอฟลาทอกซินสำเร็จรูปของกรมวิชาการ เกษตร

- เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 ห้องปฏิบัติการ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการ เก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

6. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาการผลิตเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในปริมาณมาก

ผลการทดสอบการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ในอาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง พบว่าที่ 35 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเพิ่มปริมาณเร็วกว่าที่อุณหภูมิห้อง และถึง stationary phase ในช่วง 24 ชม. แรก หลังจากเริ่มเลี้ยง ขณะที่เชื้อที่เลี้ยงในอุณหภูมิห้องมีการเพิ่มปริมาณที่ไม่สม่ำเสมอที่ 48 ชม. หลังจากเริ่มเลี้ยง (Figure 6)

2. การเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบ

ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อเบื้องต้นพบว่าการเตรียมชีวภัณฑ์ด้วยทลคัมแทนแปงข้าวเจ้า มีปริมาณเชื้อต่ำมากเพียง 6750 CFU/มล. ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดความผิดพลาดจากการที่เชื้อแบคทีเรียไม่มีการ activate จึงได้ทำการเตรียมการผลิตชีวภัณฑ์ใหม่ เริ่มตั้งแต่การแยกเชื้อและ activate เชื้อ โดยเลือกเอาสูตรชีวภัณฑ์ตามสูตร ณิชกานต์, 2554 โดยใช้แปงข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 ml และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกัน ต่อเชื้อเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตร เมื่อแบ่งบรรจุจุกอะลูมิเนียมฟอยขนาด 10 กรัม ได้ชีวภัณฑ์ทั้งหมด 200 จุก

3 การศึกษาความทนทานต่อสภาพการเก็บรักษา

ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในชีวภัณฑ์ต้นแบบหลังการเก็บรักษาครบ 6 เดือนพบว่าที่ 1 เดือนหลังการเก็บรักษา การเก็บที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วจากปริมาณตั้งต้นที่ 1.36×10^6 CFU/ml จนเหลือ 0.0925×10^6 CFU/ml และมีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 0.0425×10^6 - 0.0718×10^6 CFU/ml จนตลอดระยะเวลาเก็บรักษา ขณะที่ชีวภัณฑ์ที่เก็บในตู้เย็นมีปริมาณเชื้อลดลงจากปริมาณตั้งต้นที่ 1.36×10^6 CFU/ml เหลือ 0.9925×10^6 CFU/ml ในเดือนที่ 1 หลังการเก็บรักษา และลดลงเหลือ 0.114×10^6 CFU/ml และ 0.116×10^6 CFU/ml ในเดือนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งถือว่ายังคงมีปริมาณเชื้อสูงในเกณฑ์ที่นำไปใช้งานได้ อย่างไรก็ตาม หลังจากเก็บรักษาได้ 4 และ 5 เดือน ค่าของปริมาณเชื้อก็ลดลงเหลือ 0.071×10^6 CFU/ml และ 0.070×10^6 CFU/ml ตามลำดับ แต่ผลการตรวจสอบที่ 6 เดือนกลับพบว่าค่าที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 0.1662×10^6 CFU/ml (Figure 7) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะสามารถเก็บรักษาได้คือ ไม่เกิน 2 เดือนภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำ (5°C)

4 การทดลองให้ชีวภัณฑ์แก่ต้นถั่วลิสงในกระถาง

จากการตรวจสอบปริมาณประชากรเชื้อรา *A. flavus* ในดินที่เก็บมาจากกระถางปลูกถั่วลิสงที่ให้ชีวภัณฑ์กรรมวิธีต่าง ๆ พบว่ากรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์มีปริมาณประชากรเชื้อรา *A. flavus* ต่ำกว่าที่ไม่ให้ชีวภัณฑ์ และกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ให้พร้อมปลูกและกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ก่อนปลูก 3 วันมีแนวโน้มที่สามารถลดประชากร *A. flavus* ได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ให้ช่วงออกดอก (Figure 8) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินที่ตรวจสอบจากผลผลิตถั่วลิสงที่ได้จากกรรมวิธีที่ให้ชีว

ภัณฑ์พร้อมปลูกและกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ก่อนปลูก 3 วัน ก็มีปริมาณการปนเปื้อนต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่ให้ชีวภัณฑ์ หรือกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ในช่วงออกดอก (Figure 9)

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

1. การผลิตเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในปริมาณมากมีสภาพที่เหมาะสมคือ การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีการเพิ่มปริมาณเร็วกว่าที่อุณหภูมิห้อง โดยถึง stationary phase ในช่วง 24 ชม.
2. การเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบที่เหมาะสมคือ สูตรชีวภัณฑ์ โดยใช้แป้งข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 ml และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกัน ต่อเชื้อเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตร บรรจุถุงอะลูมิเนียมพอยขนาด 10 กรัม โดยมีระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะสามารถเก็บรักษาได้คือ ไม่เกิน 2 เดือนภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำในตู้เย็น
3. การให้ชีวภัณฑ์แก่ถั่วลิสงโดยให้ 10 กรัม พร้อมปลูกหรือให้ 10 กรัม ก่อนปลูก 3 วันมีแนวโน้มที่สามารถลดประชากร *A. flavus* และลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินที่ตรวจสอบจากผลผลิตถั่วลิสง ได้ดีกว่าการให้ช่วงออกดอก

8. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- ชีวภัณฑ์ต้นแบบแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 สามารถใช้ควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงที่ปลูกในกระถาง หากมีการนำไปทดสอบในสภาพแปลงที่มีการปนเปื้อนสะสมของเชื้อรา *A. flavus* เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินในระดับแปลง เพื่อเป็นการทดสอบยืนยันในประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์และใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงในอนาคต
- เกษตรกรผู้ปลูกพืชที่มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และสารพิษแอฟลาทอกซิน เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด สามารถใช้ชีวภัณฑ์ต้นแบบแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดประชากรเชื้อรา *A. flavus* ในแปลงปลูกที่มีปัญหาการปนเปื้อนสะสมของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินในผลิตผล

9. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

: -

10. เอกสารอ้างอิง

:

สุรางค์ สุทธิราช. 2555. การตรวจสอบปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตรจากผลิตภัณฑ์นำเข้า.

http://www.doa.go.th/biotech/pdf-ktk/i_book_1.pdf

สุพี วนศิริกุล, ขวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และ อัจฉราพร ศรีจูดาน. 2560. ศึกษาสภาพที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน ปี 1. รายงานเรื่องเติมผลการทดลองสิ้นสุดปีงบประมาณ 2560, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, กรมวิชาการเกษตร, หน้า 46-56.

อมรา ชินภูติ. 2551. สารพิษจากเชื้อราและการจัดการ. หน้า1-21. ใน: เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการตรวจวิเคราะห์สารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรอย่างรวดเร็วโดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป “DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit”. สำนักวิจัยพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

Gordon, R.E. 1989. The Genus *Bacillus*; In Practical Handbook of microbiology Edited by W.M. O’Leary 681pp. CRC Press Inc. pp 109-126.

Line, J. E., R. E. Brackett. 1995. Factors affecting aflatoxin B₁ removal by *Flavobacterium aurantiacum*. Journal of Food Protection 58(1): 91-94.

Paul, E.A. and F.E. Clark. 1996. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego.

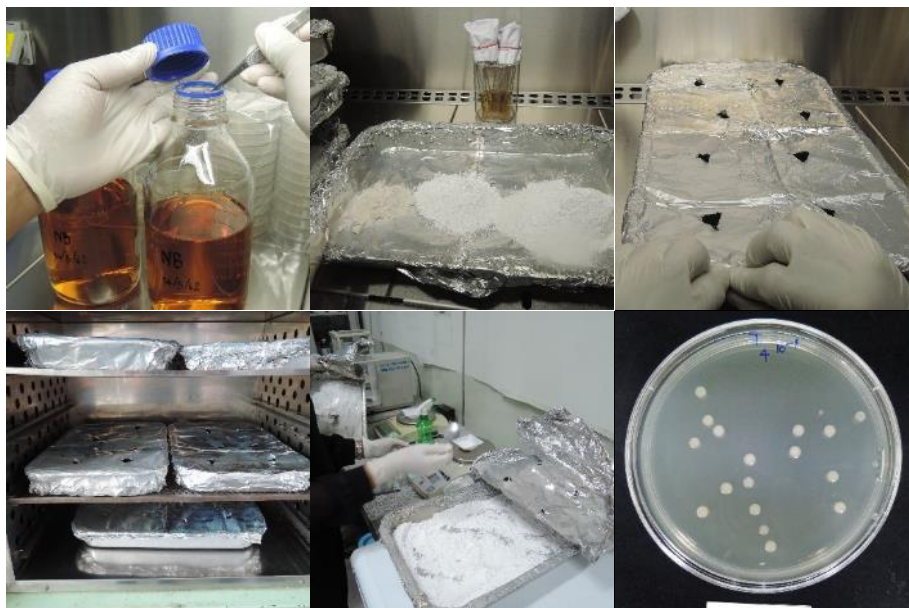


Figure 1 Preparation of biological products of *Bacillus subtilis* C57 using of Talcum instead of rice flour.

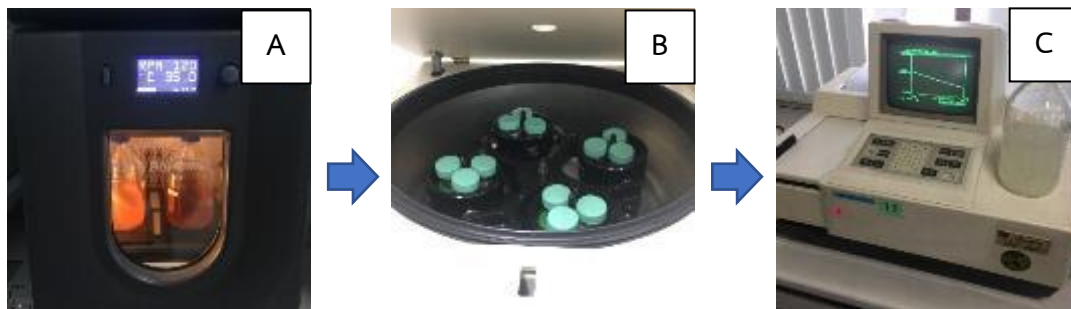


Figure 2 Bacterial culture in NB medium pH of 5 shaking 120 rpm at 35 °C incubation for 24 hours (A) the cell collecting of bacteria by using centrifuge apparatus under condition of temperature at 4 °C, 4000 rpm for 10 minutes (B) then it was diluted in distilled water until 1.0 by OD measurement at 600 nm. (C)

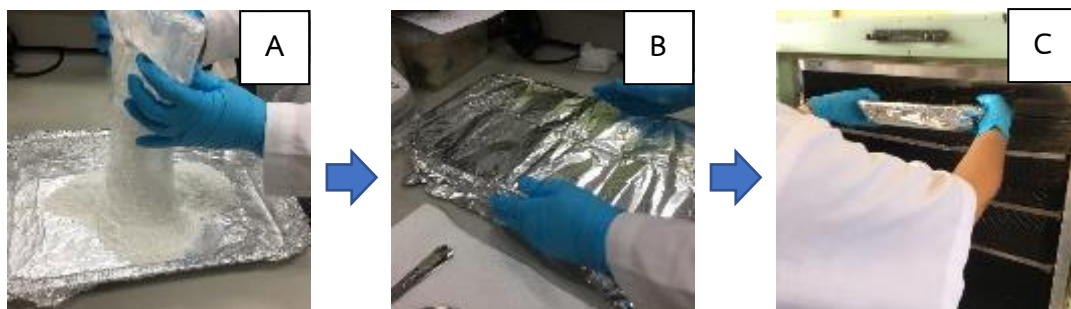


Figure 3 The composition of biological products were autoclaved and mixed with 20 ml of *Bacillus subtilis* C57 culture (A - B) then let dry in hot air oven at temperature of 40 °C (C)



Figure 4 The biological product was grinded and packed in 10 gram Aluminum foil bag.

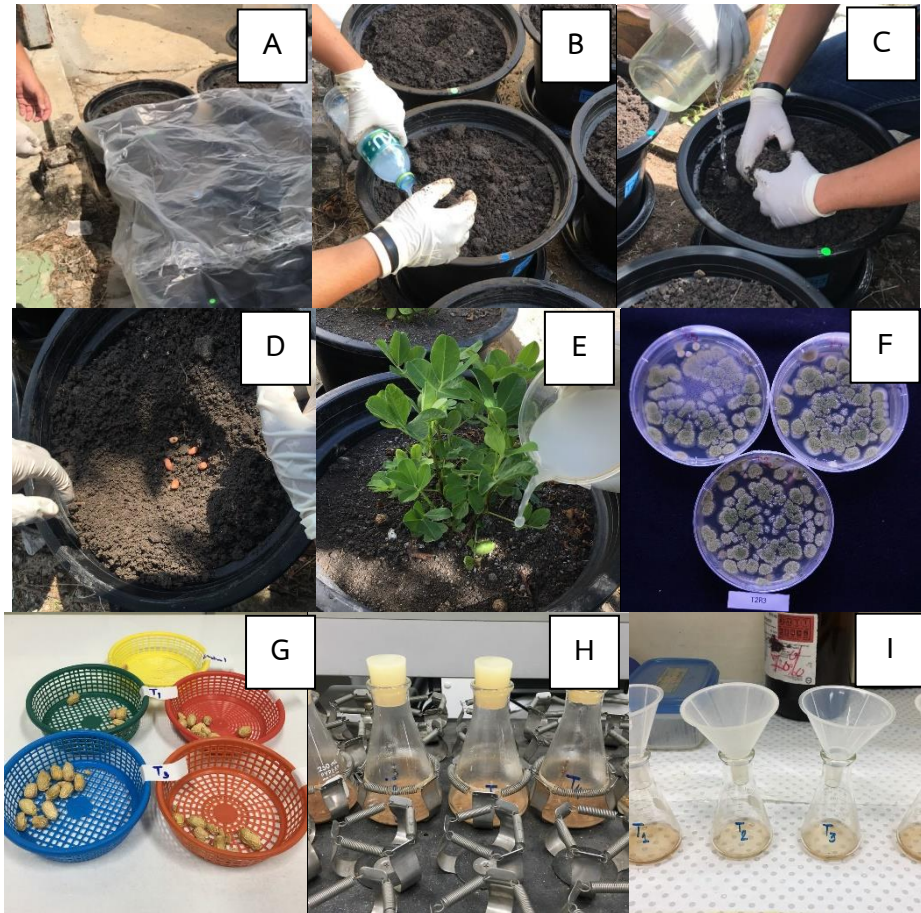


Figure 4 Growing material for groundnut planting was prepared by using disinfectant soil (A) those inoculated with *A. flavus* (B). The experiments are comparing of using of biological products of *Bacillus subtilis* C57. They are the 1st treatment is non-using, 2nd is using 3 days before planting (C) The 3rd is using while planting (D) and the 4th treatment is using at flowering stage (E). The soil dilution technique was employed for *A. flavus* population evaluation in 15 days interval for 90 days (F). The pods was harvested and Aflatoxins contamination was detected by using ELISA detection. (G H and I).

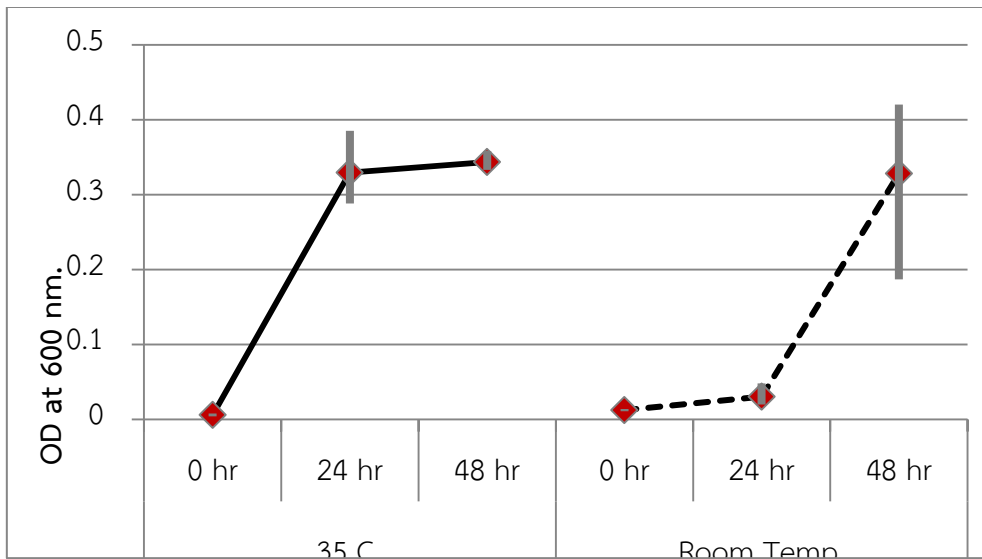


Figure 6 The cell cultures of *Bacillus subtilis* (C57) was evaluated during 0 - 48 hours incubation period, under condition of using NB pH 5.0 as culture media at incubation temperature of 35 °C comparing with room temperature (25±3 °C).

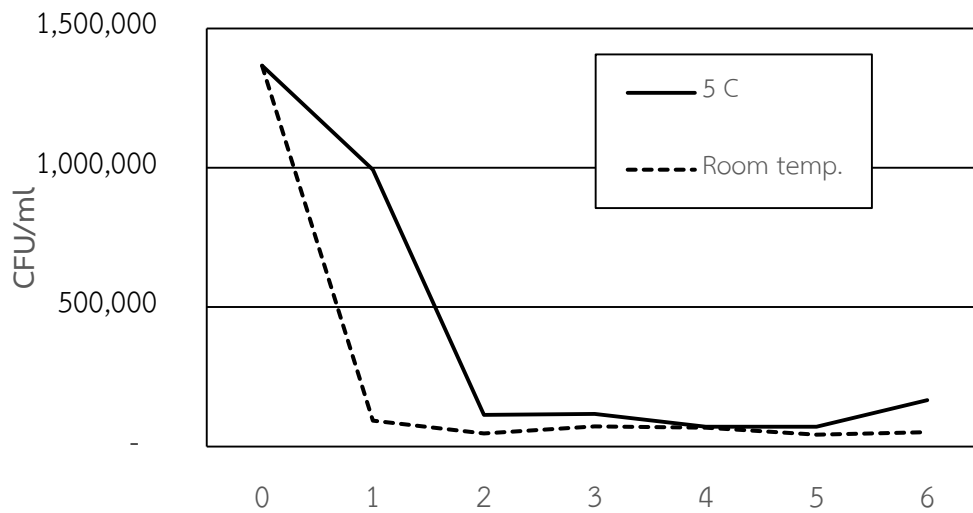


Figure 7 Evaluation of *Bacillus subtilis* C57 (cfu/ml) survived in biological product kept in refrigerator (5 °C) comparing with room temperature (25±3 °C) for 6 months.

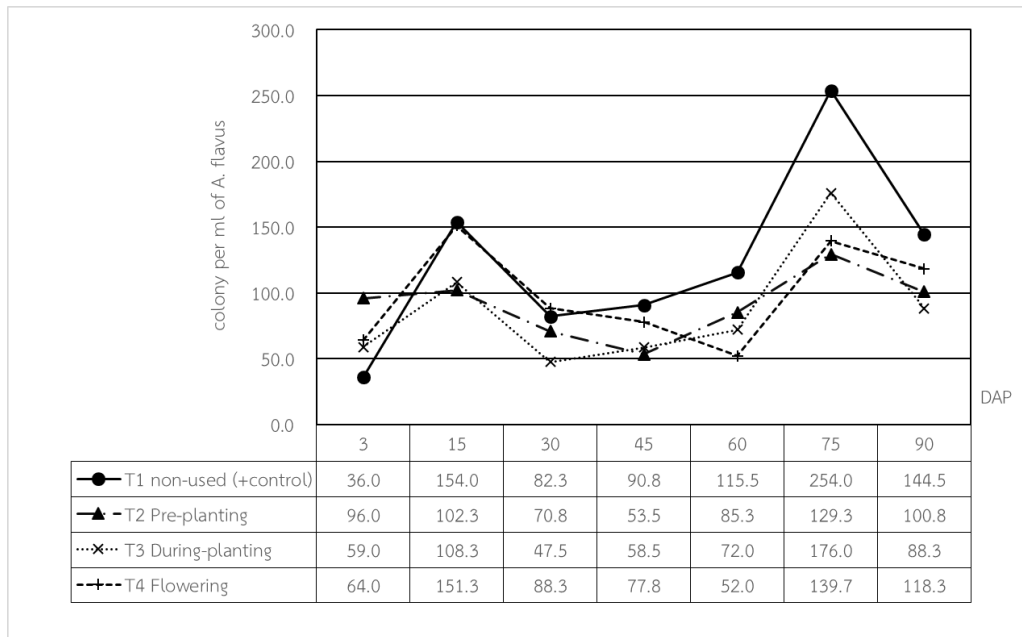


Figure 8 Population evaluation of *A. flavus* (cfu/ml) from growing media of each treatment employed soil dilution technique at 3, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days after planting (DAP).

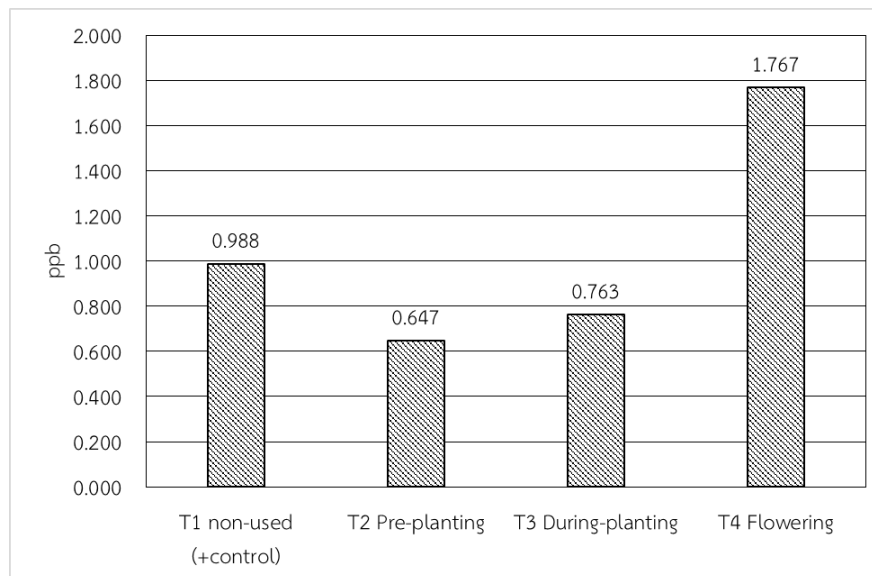


Figure 9 Aflatoxins contamination (ppb) occurred in groundnut pods harvested from each treatments by using DOA-Aflatoxin ELISA test kit.

11. ภาคผนวก

:-