การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

Formulation of *Bacillus subtilis* Endospore for Controlling Ginger Wilt

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง เริ่มจากการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B.subtilis* จำนวน 21 สูตร ทดสอบความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อการบ่มเชื้อเพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ ทดสอบความทนทานของ *B.subtilis* ที่อยู่ในระยะเอ็นโดสปอร์ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ และศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ *B subtilis* ในรูปเอ็นโดสปอร์ ผลการทดลอง พบว่า อาหารสูตร N1 B N2 N5 N4 N3 และ FFS1 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงถึง10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสูตร N3 กระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงสุดถึง 3.10 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 480 ชั่วโมง (20 วัน) และสูตร FFS1 สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ 2.1 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (5 วัน) การเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิปกติ (26 องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงธรรมดา เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* ในการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ และพบว่า แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถทนอุณหภูมิได้ต่ำถึง 8 องศาเซลเซียสและสูงถึง 100 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูก ปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ที่อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส) การทดสอบแปรรูปผลิตภัณฑ์ในรูปของเหลว พบว่า หลังการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารนำพา (หางนม) คงเหลือ 3.3 x 10^5 โคโลนี/มิลลิลิตร และในอาหาร FFS1 ที่ไม่เติมหางนม คงเหลือ 8.3 x 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร การทดสอบแปรรูปผลิตภัณฑ์ในรูปผง พบว่า หลังการแปรรูปปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นมีปริมาณเท่ากันคือ10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร แต่การใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารนำพามีข้อเสีย คือ การเกาะติดค่อนข้างยากเนื่องจากแป้งข้าวโพดมีลักษณะมัน ลื่น ต้องใช้เวลานานในการคลุกเคล้า ข้อดีคือ ผลิตภัณฑ์ละลายน้ำได้ดี ในขณะที่การใช้สารทัลคัมการละลายน้ำจะมีตะกอนตกค้าง หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 เดือน พบว่า ปริมาณแบคทีเรียจากทั้งสองผลิตภัณฑ์มีปริมาณเท่ากันแต่ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากการเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร PSA ซึ่งไม่มีการกระตุ้นให้สร้างเอ็นโดสปอร์ ไม่มีแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่มีชีวิตรอด เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตพบว่า ราคาของสารนำพาทั้งสองชนิดที่นำมาใช้แปรรูปไม่แตกต่างกัน

คำนำ

Ralstonia solanacearum เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมาก ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา การควบคุมโรคด้วยสารเคมีค่อนข้างยาก และมักก่อให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อม จึงได้มีการศึกษาหาวิธีควบคุมโรคเหี่ยวที่มีความปลอดภัยหลายวิธี มาใช้ควบคุมโรค การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น antagonist ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย จนกระทั่งแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เช่น เชื้อรา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ณัฏฐิมาและคณะ (2548) จึงได้ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ และพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงถึง 60% แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมาการนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทำโดยใช้สารละลายเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์ และ/หรือ ราดลงบนดิน ซึ่งวิธีการปฏิบัติเช่นนี้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มักไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลล์แบคทีเรียตายลง เนื่องด้วยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีคุณสมบัติในการสร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ ซึ่งมีผนังหนา คงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น รังสี แรงกระแทก ร้อนจัดหรือเย็นจัดหรือสภาพขาดแคลนอาหาร และเอ็นโดสปอร์จะสามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell ได้ใหม่เมื่อใส่ลงไปในดินและสภาพแวดล้อมเหมาะสม และมีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อโรคได้ทันที (http://www.splammo.net/bact102/102/bacillus.html) โดยมหาวิทยาลัยน้อททิ่งแฮม ของประเทศอังกฤษได้คัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* และพัฒนาเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ในรูปของเอ็นโดสปอร์และได้รับการจดทะเบียนจาก EPA แล้วในชื่อ MBI 600 โดยมีคุณสมบัติทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถเก็บในสภาพแห้งได้ไม่ต่ำกว่า 2 ปี และใช้ร่วมกับสารเคมีชนิดอื่นได้อย่างกว้างขวาง และสปอร์สามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell และเข้าครอบคลุม (colonise) รากพืชได้ทันที เมื่อใส่ลงไปในดิน (http://www.microbiogroup.com/BS1.htm) วาสนา และคณะ, 2547 ได้ศึกษาการยืดอายุผลิตภัณฑ์ *B.subtilis* TISTR 001 เพื่อใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ พบว่าถ้าเติมสารตัวพา (carrier) ได้แก่ zeolite, talcum, และ calcium carbonate ลงไปในผลิตภัณฑ์ชนิดผง แม้เพิ่มอุณหภูมิถึง 150 องศาเซลเซียสในระหว่างกระบวนการผลิต สปอร์ของแบคทีเรียสามารถทนอยู่ได้และปริมาณไม่ลดลง และความเข้มข้นของเอ็นโดสปอร์จะคงที่กว่าผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของเหลว (http://www.nowledge.biotec.or.th/doc_upload/200411495822.doc) เพ็ญจันทร์, 2546 ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อขบวนการหมักสปอร์ของ *B.subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก พบว่า การใช้โมลาสและกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้หมัก จะสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* TISTR 001 ได้ถึง 10^9 สปอร์/มิลลิลิตร งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จของแบคทีเรีย *B.subtilis* ให้อยู่ในรูปของเอ็นโดสปอร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ให้มีความคงทนเนื่องการมีชีวิตรอดในรูปสปอร์ของเชื้อ และสามารถนำไปใช้ได้ทุกสภาพแม้กระทั่งในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงโดยอาศัยคุณสมบัติความทนทานของเอ็นโดสปอร์และการงอกกลับมาเป็นเซลล์ใหม่ได้โดยง่ายของเอ็นโดสปอร์ดังกล่าว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย *B. subtilis* 1 ไอโซเลท (ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* (ณัฏฐิมาและคณะ, 2547)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA (Potato sucrose agar)

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ เครื่องเขย่า (incubator shaker) ฯลฯ

4. สารเคมีในห้องปฏิบัติการ

5. สารที่ได้จากของเหลือภาคเกษตร เช่น หางนม กากน้ำตาล กากถั่วเหลือง โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก) ฯลฯ

วิธีกา

1. การทดสอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

<u>สูตรอาหารทดสอบ</u> (ภาคผนวก) ได้แก่

- **ชุดที่ 1** สูตรอาหารทั่วไป 15 สูตร ได้แก่ : CA MY NGA PSB (Wakimoto'broth) CPG YP NA NTG GMP B N1 N2 N3 N4 และ N5

- **ชุดที่ 2** สูตรอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร ได้แก่ : SM1 SM2 FM1 FM2 FFS1 และ FFS2

ปฏิบัติดังนี้

1.1 การเตรียมหัวเชื้อ : เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B.subtilis* บนอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1 ลูป (loop) มาตรฐานลงในอาหารเหลว PSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 การทดสอบในสูตรอาหารต่างๆ : ถ่ายหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ ซึ่งบรรจุอยู่ในฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 99 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

1.3 การบันทึกผล : ตรวจผลโดยนับจำนวนเอ็นโดสปอร์โดยการย้อมสีและนับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 24 ชั่วโมง

2. การทดสอบความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ปฏิบัติดังนี้

2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารสูตร N3 (Parry,J.M. และคณะ,1988) โดยปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 นำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ ได้แก่ 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 360 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส)

2.3 ตรวจผลโดยนับจำนวนเอ็นโดสปอร์โดยการย้อมสีและนับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบความทนทานของเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *B .subtilis* สร้างขึ้น ที่อุณหภูมิต่างๆ

ปฏิบัติดังนี้

3.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารเหลว N1 N2 N3 N4 และ N5 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

3.2 นำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 8 40 60 80 และ100 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิปกติ (26 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

3.3 นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด โดยวิธี serial dilution plate method

4. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis*

4.1 <u>ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปของเหลว</u>

1. เลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอาหารเหลว FFS1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลว (ข้อ1) อัตรา 10 % ของปริมาตร

3. เติมหางนมลงไป 4 เท่า เขย่าให้เข้ากัน

4. บรรจุขวดแก้ว ปิดฝา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. ตรวจนับเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique เปรียบเทียบกับ การเลี้ยงบนอาหารเหลวที่ไม่มีการแปรรูป

4.2 <u>ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง</u>

1. ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลอง 4.1 (ข้อ1-2)

2. เติม methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ (จากข้อ 1)

3. เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน

4. นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) เก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. ตรวจนับเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์แปรรูปแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ซึ่งปฏิบัติ ดังนี้

- เลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* บนอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มิลลิลิตร ขูดเซลล์แบคทีเรีย
- นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- รินเอาส่วนใสมาผสมกับ Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1
- เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน
- นำไปผึ่งในที่ร่มจนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท เก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ผลการทดลอง พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อ 240 ชั่วโมง มีอาหาร 8 สูตรได้แก่ YP NB NTG GMP N1 B N2 และ N5 ที่แบคทีเรีย *B .subtilis* สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ประมาณ 10^2สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 360 ชั่วโมง พบว่า *B. subtilis* สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ในอาหารทั้ง 15 สูตร โดยที่ในสูตร N3 และ N4 แบคทีเรียสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุด เท่ากับ 2.13 x 10^6 และ2.34 x 10^6สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อจนครบ 480 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุดถึง10^8ในอาหาร 6 สูตร ได้แก่ N1 B N2 N5 N4 และ N3 โดยมีปริมาณเอ็นโดสปอร์เท่ากับ 1.10 x 10^8 1.38 x 10^8 1.40 x 10^8 1.43 x 10^8 2.48 x 10^8 และ 3.10 x 10^8สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การทดสอบสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร 6 สูตร พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารที่มีส่วนผสมของเศษปลาหมักผสมกับกากถั่วเหลืองอัตรา 1:1 (FFS) แบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ปริมาณสูงภายใน 5 วัน คือ สร้างเอ็นโดสปอร์ได้ถึง 2.1 x 10^8สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนำไปแปรรูป คือ สูตร FFS1 ซึ่งมีส่วนผสมที่ราคาถูก หาง่าย และใช้เวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียไม่นานมาก

2. การทดสอบความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ผลการทดลอง พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อในอาหาร N3 เป็นเวลา 360 วัน การเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 7.1x10^8 และ 9.7x10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้โดยพบว่า การเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่ามากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็จะทำให้ปริมาณการสร้างเอ็นโดสปอร์เพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

3. การทดสอบความทนทานของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่อุณหภูมิต่างๆ

ผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียทดสอบสามารถทนทานทั้งในสภาพอุณหภูมิต่ำ 8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร 5 สูตร โดยพบว่า เมื่อแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส แบคทีเรียยังคงมีชีวิตรอดถึงประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจากการทดสอบการทนทานในสภาพอุณหภูมิสูง พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิซึ่งใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูก แบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยที่ปริมาณไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และในสภาพอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส แบคทีเรียก็ยังคงมีชีวิตรอดถึง 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4)

จากการทดลองนี้ การตรวจผลจำเป็นต้องใช้วิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี serial dilution plate method เพื่อตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตรอดเท่านั้น และจากลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ถ้าแบคทีเรียอยู่ในสภาพเป็นเซลล์และยังไม่สร้างเอ็นโดสปอร์ แบคทีเรียสามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส (http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/MM_404652038_12.doc) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเซลล์แบคทีเรียจะตายลงจนไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ โดยเฉพาะถ้าอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นการที่โคโลนีแบคทีเรียยังสามารถเจริญอยู่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 40 - 100 องศาเซลเซียส แสดงว่า เอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* เท่านั้นที่ยังทนต่อความร้อนและเจริญกลับมาเป็นเซลล์ปกติได้ตามเดิม

4. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis*

4.1 <u>ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* ในรูปของเหลว</u>

การทดลองแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยใช้หางนมเป็นสารพาหะ เป็นวิธีการที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลา 2 - 3 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง พบว่า ปริมาณเซลล์มีชีวิตของ *B. subtilis* ลดลงไม่มากนัก แต่หลังจาก 3 เดือน ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อหลังการเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซลล์แบคทีเรียลดลงจาก 10^7 เป็น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร FFS1 ซึ่งไม่มีการแปรรูป พบว่า ปริมาณเซลล์แบคทีเรียยังมีปริมาณถึง 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5)

การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เหลว จะต้องมีการปรับปรุงกรรมวิธีต่อไป เพื่อให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ยังมีชีวิตรอดให้ได้ไม่ต่ำกว่า 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยอาจจะมีการปรับเปลี่ยนอัตราของหางนมที่ใช้ และ/หรือ เปลี่ยนชนิดสารพาหะเพื่อให้เหมาะสมต่อการดำรงอยู่ของเซลล์แบคทีเรียต่อไป

4.2 <u>ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง</u>

จากการทดลอง พบว่า การแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยใช้ ทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารพาหะ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คือ ผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากแบคทีเรียที่ล้างบนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ พบว่า ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นไม่แตกต่างกัน คือ เท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเก็บไว้ 5 เดือน พบว่า ไม่พบปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่กรรมวิธีที่แปรรูปจากการกระตุ้นเอ็นโดสปอร์ในอาหาร FFS1 ที่ใช้ทัลคัมและแป้งข้าวโพดลดลงเหลือ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการผลิต พบว่า การใช้แป้งข้าวโพดจะค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีความมัน ลื่น การเกาะติดในขั้นตอนการผสมเชื้อค่อนข้างยาก ใช้เวลานาน แต่ข้อดีคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ละลายน้ำได้ดีกว่าการใช้สารทัลคัม ไม่เหลือตะกอน และราคาไม่ต่างกัน

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มีอาหารที่ช่วยกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B. subtilis* สูงสุด ได้แก่ N1 B N2 N5 N4 N3 และ FFS1 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้สูงถึง 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสูตร N3 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้สูงสุดถึง 3.10×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แต่สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูป คือ สูตร FFS1 เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด การเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรียทดสอบ และพบว่า แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถทนอุณหภูมิได้ต่ำถึง 8 องศาเซลเซียสและสูงถึง 100 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูก ปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือที่อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส

การใช้หางนมในอัตราดังกล่าวเป็นสารนำพาในขบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเหลวยังไม่เหมาะสม เนื่องจากปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดลดลงรวดเร็วภายใน 5 เดือน การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงโดยใช้สารทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพาปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดหลังการเก็บ 7 เดือนไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอด 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การแปรรูปจากแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ ไม่พบการรอดของเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* หลังการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ 5 เดือน

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ผลงานวิจัยที่ได้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการผลิตแบคทีเรีย *B.subtilis* ให้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปของเอ็นโดสปอร์ เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ตลอดจนเป็นต้นแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ของ *B. subtilis* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง หรืออุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น

2. ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้ มีส่วนช่วยสนับสนุนการลดการใช้สารเคมีของเกษตรกรในอนาคต เพื่อรักษาสิ่งแวดล้อม และส่งเสริมสุขอนามัยของเกษตรกร ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายของกรมวิชาการเกษตรที่ให้มีการดำเนินงานในด้านการลดการใช้สารเคมี

3. ช่วยสนับสนุนภาคการส่งออกพืชผัก ผลไม้ ซึ่งการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เป็นหนทางหนึ่งในการแสดงเจตนาให้นานาประเทศได้รับรู้ว่าประเทศไทยมีความตั้งใจที่จะแก้ปัญหาการใช้สารเคมีในการผลิตสินค้าเกษตร ผลผลิตทางการเกษตรที่ผลิตจากประเทศไทย เป็นสินค้าที่มีคุณภาพ ปลอดภัย

4. นักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถนำผลงานวิจัย ไปต่อยอดหรือประยุกต์ใช้กับงานด้านการพัฒนาสารชีวภัณฑ์ เพื่อเพิ่มคุณภาพและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ เพื่อการควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืน

5. เผยแพร่ความรู้ของงานวิจัยสู่นักวิชาการ นิสิต-นักศึกษา ภาคเอกชน เกษตรกร และผู้สนใจ ในรูปของบทความทางวิชาการตีพิมพ์ผลงานเผยแพร่ในวารสาร และเผยแพร่ผ่านทางเครือข่าย Information technology (IT) ผ่านเว็ปไซต์ของกรมวิชาการเกษตร การบรรยายในงานประชุมวิชาการ ของหน่วยงานต่างๆ และอบรมแก่ผู้สนใจและเกษตรกรโดยตรง

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รัศมี ฐิติเกียรติพงษ์ อรพรรณ วิเศษสังข์ และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 90-105. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง,2546 การปรับปรุงผลผลิตของกระบวนการหมักสปอร์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก. สืบค้นจาก http://dcms.thailis.or.th/dcms/basic.php?institute_code=54&option=show&bib=193&query=Bacteria%20&doc_type=0 เมื่อวันที่ 2 สิงหาคม 2549

วาสนา กิตติกนกรัตน์, ไวรุจ เดชมหิธกุล และเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง, 2547, "*Study of Formulation and Shelf-life of Bacillus subtilis TISTR 001 Product*", The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, "Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology สืบค้นจาก http://www. nowledge. biotec.or.th/doc_upload /200411495822 .doc เมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2549

Parry, J.M., P.C.B. Turnbull, and J.R. Gibson .1988. A Colot Atlas on Bacillus species. Wolfe Medical Publication Ltd. สืบค้นจาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_3_002c.asp?info_id=237 เมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2549

Norris J.R., R.C.W. Berkeley, N.A. Logan, and A.G. O'Donnell. 1981. The genera *Bacillus* ana *Sporolactobacillus,* p. 1711-1742. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, vol. 2. Springer-Verlag, New York

สืบค้นจาก http://www.splammo. net/bact102/102/bacillus.html เมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2549

สืบค้นจาก http://www. microbiogroup.com/BS1.htm เมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2549

สืบค้นจาก http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/MM_404652038_12.doc เมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2549

ตารางที่ 1 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหาร 15 สูตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 240 360 และ 480 ชั่วโมง ตามลำดับ

สูตรอาหาร	ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่เวลาต่างๆ (สปอร์/มิลลิลิตร)		
	240 ชั่วโมง (10 วัน)	360 ชั่วโมง (15 วัน)	480 ชั่วโมง (20 วัน)
CA	0	1.02×10^{2}	1.42×10^{2}
MY	0	3.36×10^{2}	5.70×10^{3}
NGA	0	7.28×10^{3}	2.60×10^{5}
PSB	0	8.48×10^{3}	3.00×10^{5}
CPG	0	8.97×10^{3}	7.00×10^{5}
YP	0	1.36×10^{4}	1.04×10^{6}
NB	1.3×10^{2}	6.45×10^{4}	1.46×10^{6}
NTG	1.27×10^{2}	8.38×10^{4}	2.00×10^{6}
GMP	1.63×10^{2}	3.94×10^{5}	1.04×10^{7}
N1	2.23×10^{2}	7.33×10^{5}	1.10×10^{8}
B	2.46×10^{2}	8.26×10^{5}	1.38×10^{8}
N2	3.34×10^{2}	8.28×10^{5}	1.40×10^{8}
N5	3.36×10^{2}	8.63×10^{5}	1.43×10^{8}
N4	0	2.13×10^{6}	2.48×10^{8}
N3	0	2.34×10^{6}	3.10×10^{8}

ตารางที่ 2 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร 6 สูตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 72 และ120 ชั่วโมง ตามลำดับ

สูตรอาหาร	ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่เวลาต่างๆ (สปอร์/มิลลิลิตร)	
	72 ชั่วโมง (3 วัน)	120 ชั่วโมง (5 วัน)
FFS1	1.9×10^{6}	2.1×10^{8}
FFS2	1.1×10^{6}	9.6×10^{7}
FM1	1.2×10^{6}	7.3×10^{7}
FM2	8.5×10^{5}	8.2×10^{6}
SM1	8.1×10^{5}	2.0×10^{6}
SM2	2.8×10^{5}	1.9×10^{6}

ตารางที่ 3 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหาร N3 (Parry,J.M. และคณะ,1988) ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ เป็นเวลา 360 วัน ณ อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส)

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ปริมาณเอ็นโดสปอร์ (สปอร์/มิลลิลิตร)
50	4.10×10^{6}
100	5.60×10^{6}
150	7.10×10^{8}
200	9.70×10^{8}

ตารางที่ 4 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอด ในอาหาร N3 (Parry,J.M.และคณะ,1988) ที่แช่ในน้ำอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

อุณหภูมิ (^{0}C)	ปริมาณเอ็นโดสปอร์ (สปอร์/มิลลิลิตร)
8	9.20×10^{6}
26	1.60×10^{7}
40	1.90×10^{7}
60	1.38×10^{6}
80	1.43×10^{4}
100	1.38×10^{4}

ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลวที่ใช้หางนมเป็นสารนำพา เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงในอาหารเศษปลาหมักผสมกากถั่วเหลือง (FFS1) ที่ไม่มีการแปรรูป เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 เดือน

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)	
	ในผลิตภัณฑ์แปรรูป	ในอาหารFFS1
0 [1/]	1.1×10^{8}	1.0×10^{8}
1	0.7×10^{8}	5.3×10^{8}
2	0.2×10^{8}	5.9×10^{7}
3	5.3×10^{6}	8.0×10^{7}
4	2.8×10^{6}	8.6×10^{7}
5	3.3×10^{5}	8.3×10^{7}

[1/] ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารทัลคัม และแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพา เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ก่อนแปรรูป เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 เดือน

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)		
	ทัลคัม (อาหาร FFS1)[2/]	แป้งข้าวโพด (อาหาร FFS1)[2/]	ทัลคัม (อาหาร PSA)[3/]
0 [1/]	1.2×10^{8}	1.5×10^{8}	2.1×10^{8}
1	0.9×10^{8}	0.6×10^{8}	1.5×10^{8}
2	1.7×10^{7}	1.5×10^{7}	2.0×10^{8}
3	2.2×10^{7}	1.7×10^{7}	1.5×10^{7}
4	1.3×10^{7}	1.5×10^{7}	4.3×10^{7}
5	3.2×10^{7}	3.0×10^{7}	0
6	1.0×10^{7}	9.0×10^{7}	0
7	1.5×10^{7}	2.5×10^{7}	0

[1/] ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

[2/] ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เลี้ยงบนอาหาร FFS1 ก่อนแปรรูป

[3/] ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ก่อนแปรรูป

ภาคผนวก

สูตรอาหารทดสอบ 15 สูตร

Malt-yeast extract (MY)

Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Peptone-calcium carbonate

Peptone	5	กรัม
$CaCO_3$	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

CPG

Casamino acid	1	กรัม
Peptone	10	กรัม
Glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NGA

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

PSB (wakimoto'broth)

Potato	300	กรัม
Sucrose	20	กรัม
$Ca(Na_3)_2 4H_2O$	0.5	กรัม
$NaHPO_4 . 12H_2O$	2	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

B

Yeast extract	1	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
$MnSO_4 . H_2O$	50	มิลลิกรัม
$CaCl_2 . 2H_2O$	100	มิลลิกรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	500	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

GMP

Glucose	15	กรัม
Peptone	6	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

YP

Yeast extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NB

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NTG

Glucose	20	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

N1 :Norris J.R และคณะ (1981)

Peptone	5	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Mn $_2SO_4$. H_2O	0.005	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

N2 : Parry J.M และคณะ (1988)

Mn $_2SO_4$. H_2O	0.03	กรัม
KH_2PO_4	0.25	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

N3 : Parry J.M และคณะ (1988)

Peptone	15	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
NaCl	6	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

N4

$Ca(Na_3)_2 4H_2O$	0.5	กรัม
$NaHPO_4 . 12H_2O$	2	กรัม
Peptone	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

N5

$Ca(Na_3)_2 4H_2O$	0.5	กรัม
$NaHPO_4 . 12H_2O$	0.5	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

SM1

กากถั่วเหลือง	10	กรัม
กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

SM2

กากถั่วเหลือง	10	กรัม
กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	5.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FM1

ปลาป่น	10	กรัม
กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FM2

ปลาป่น	10	กรัม
โมลาสส์ (cane molass)	5.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

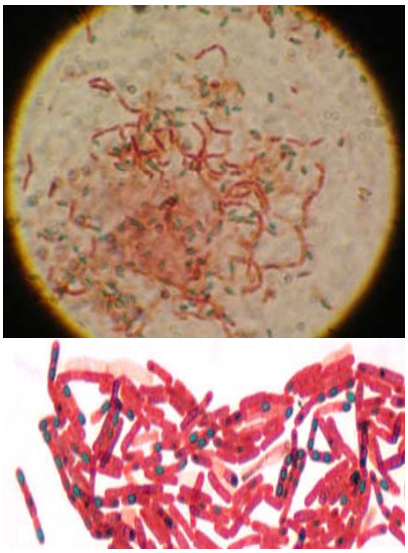
FFS1

โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก)	10	มิลลิลิตร
กากถั่วเหลือง	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FFS2

โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก)	10	มิลลิลิตร
กากถั่วเหลือง	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*



เอ็นโดสปอร์ของ *Bacillus*

ผลิตภัณฑ์เหลวเอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis*

ผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis*