รายงานแผนงานวิจัย

อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน

Conservation and Sustainable Utilization of Microorganisms and Microbial Products

หัวหน้าแผนงานวิจัย

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

NUCHANART TANGCHITSOMKID

ปี พ.ศ. 2561

รายงานแผนงานวิจัย

อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน

Conservation and Sustainable Utilization of Microorganisms and Microbial Products

หัวหน้าแผนงานวิจัย

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

NUCHANART TANGCHITSOMKID

ปี พ.ศ. 2561

คำปรารภ

กรมวิชาการเกษตร เป็นแหล่งเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ทางการเกษตรที่มีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จำนวนมาก มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ตามภารกิจโดยนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน ได้แก่ จุลินทรีย์ดิน จุลินทรีย์ย่อยสลาย จุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว จุลินทรีย์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรม และสายพันธุ์เห็ด เป็นศูนย์กลางความรู้และเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์แต่ละชนิดและสายพันธุ์ซึ่งนับเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อการเกษตรของประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง ณ ปัจจุบัน มีความพร้อมด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตรในทุกมิติของการศึกษาค้นคว้า วิจัย มีบุคลากรเฉพาะสาขาวิชา องค์ความรู้ เทคโนโลยี กระบวนการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงภาคสนาม และจุลินทรีย์บางชนิดสามารถถ่ายทอดสู่ภาคการเกษตรและภาคเอกชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ กรมวิชาการเกษตร จึงมีศักยภาพที่จะเป็นผู้นำในด้านจุลินทรีย์ตามบทบาทและภารกิจ

อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องทางการเกษตรมีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ ดังนั้น การพยายามค้นหา เก็บรวบรวมจุลินทรีย์ชนิดและสายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทย เพื่อนำมาวิจัยและพัฒนาไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องยังคงเป็นภารกิจของนักวิจัย อันนำไปสู่การพัฒนาประเทศต่อไป

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

มีนาคม 2562

สารบัญ **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ..... 5
ผู้วิจัย 6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... 6
บทนำ..... 7

1.โครงการวิจัย การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรและการใช้ประโยชน์ 10
2.โครงการวิจัย การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์ 15

บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... 17
บรรณานุกรม..... 22

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน ประกอบด้วย 2 โครงการวิจัย คือ โครงการวิจัยการอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรและการใช้ประโยชน์ และโครงการวิจัยการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์ ได้รับความร่วมมือจากคณะนักวิจัย ดำเนินงานวิจัยอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 3 ปี (ปี 2559-2561) เป็นไปตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 3 : ยุทธศาสตร์ความเข้มแข็งภาคเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน และสอดคล้องกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559) ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 3 : การอนุรักษ์ การเสริมสร้าง และพัฒนาทุนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสอดคล้องกับนโยบายรัฐบาลในด้านความหลากหลายทางชีวภาพ โดยได้รับการพิจารณาและสนับสนุนให้ดำเนินงานจากกรมวิชาการเกษตร และสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ ผลของงานเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปต่อยอดสู่การประยุกต์ใช้และขยายผลสู่เกษตรกรต่อไป

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

มีนาคม 2562

ผู้วิจัย

นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวภรณี สว่างศรี	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
นางสาวจีรภา ปัญญศิริ	สังกัด สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	สังกัด สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
นางสาวอัครชาพรรณ กวางแก้ว	สังกัด ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร
นางเสริมพร กึ่งพุทธพงศ์	สังกัด ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALA 5-Aminolevulinic acid

ALAS 5-Aminolevulinate synthase

PCR Polymerase Chain Reaction

NA Nutrient agar

LB Luria-Bertani

EPN Entomopathogenic nematode

บทนำ

จุลินทรีย์ทางการเกษตร มีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จำนวนมากในระบบนิเวศเกษตร สามารถแบ่งได้หลายกลุ่มขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ที่อยู่อาศัย แหล่งอาหาร สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และความชื้น ที่มีผลต่อการดำรงชีวิต การใช้อาหาร และความอยู่รอดในสภาพธรรมชาตินั้นๆ โดยจุลินทรีย์ทางการเกษตรมีทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อดินและพืชที่ปลูกในระบบนิเวศ ซึ่งนักวิจัยได้พยายามเก็บรวบรวมและจำแนกจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมต่างๆ นำมาศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อการนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช จุลินทรีย์ย่อยสลาย จุลินทรีย์ดิน จุลินทรีย์อาหาร จุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว และ จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานวิจัยพัฒนาด้านจุลินทรีย์ตั้งแต่การเก็บรวบรวม จัดจำแนก และเก็บรักษาให้คงความมีชีวิต การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มปริมาณ และการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอ็นไซม์ต่างๆ เพื่อพัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอย่างต่อเนื่อง เช่น แบคทีเรียไรโซเบียมตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียบาซิลัสย่อยสลายเซลลูโลส ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง และรากำจัดแมลง เป็นต้น โดยจุลินทรีย์บางชนิดมีการผลิตขยายและถ่ายทอดไปสู่ภาคการเกษตรมากกว่า 30 ปี ซึ่งมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มที่นำไปใช้ประโยชน์ยังมีข้อจำกัดของความแข็งแรงและคุณสมบัติของการนำไปใช้ เนื่องจากการนำขึ้นมาจากธรรมชาติและเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องในสภาพห้องปฏิบัติการระยะเวลาหนึ่ง จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ลดลงหรือตายไป ดังนั้น การเก็บรวบรวมและอนุรักษ์จุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ จึงควรมีการดำเนินการศึกษาเก็บรวบรวม จำแนก และคัดเลือกชนิด/สายพันธุ์อย่างต่อเนื่องเพื่ออนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพตามความต้องการใช้หรือได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีศักยภาพ/ประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์เดิมอันจะเกิดประโยชน์ ต่อการนำจุลินทรีย์จากความหลากหลายทางชีวภาพมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยมุ่งการศึกษาจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ตั้งแต่ห้องปฏิบัติไปสู่ต้นแบบในเชิงพาณิชย์ เพื่อการนำไปใช้ทางการเกษตรได้จริง นอกจากนั้น ควรให้ความสำคัญด้านการจัดการฐานข้อมูลจุลินทรีย์ที่กรมวิชาการเกษตรมีเก็บรักษาอยู่มากกว่า 10,000 ไอโซเลท/ชนิด/สายพันธุ์ หรือเก็บรวบรวมใหม่ให้เป็นระบบที่สามารถสืบค้นรายละเอียดของตัวเชื้อได้อย่างรวดเร็ว มีแหล่งจัดเก็บรักษาให้คงความมีชีวิต รวมทั้งรายชื่อนักวิจัยผู้รับผิดชอบในแต่ละชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อให้เข้าถึงได้ง่าย สามารถบริการข้อมูล การขออนุญาตใช้จุลินทรีย์ และถ่ายทอดเทคโนโลยีต่างๆ แก่ผู้สนใจ โดยเป็นจุดเชื่อมโยงระหว่างนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านไปสู่นักวิจัย นิสิต-นักศึกษา และเกษตรกร ผู้ต้องการต่อยอดหรือใช้ประโยชน์ ตลอดจนเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลของหน่วยงานอื่นๆ เป็นเครือข่ายฐานข้อมูลจุลินทรีย์ของประเทศไทยอย่างเป็นระบบสามารถสืบค้นได้สะดวก รวดเร็ว เพื่อให้ประเทศไทยเป็นผู้นำในกลุ่มอาเซียนด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตรและเทคโนโลยีในทุกๆ ด้าน สามารถนำไปขยายผลและ/หรือนำจุลินทรีย์หลากหลายชนิด/สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพไปใช้ประโยชน์ตามระบบการ

จัดการอย่างมีประสิทธิภาพ ตอบสนองยุทธศาสตร์ภายใต้งานวิจัยสร้างความเข้มแข็งให้กับภาคเกษตร เพื่อให้เกิดความมั่นคงทางด้านอาหารปลอดภัยและการผลิตพลังงานทดแทน โดยการเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ทางการเกษตรจากความหลากหลายทางชีวภาพ นำมาศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ และสารชีวภาพ โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง และพัฒนากระบวนการเพิ่มขยายปริมาณจุลินทรีย์สายพันธุ์เดิมและ/หรือสายพันธุ์ใหม่ สำหรับใช้เป็นปัจจัยการผลิตในภาคการเกษตรให้มีความเข้มแข็ง และเกษตรกรพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืน ตลอดจนการบริหารจัดการจุลินทรีย์ในแหล่งอาศัยที่อาจได้รับผลกระทบจากการทำการเกษตร และผลจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศซึ่งส่งผลต่อความอยู่รอด และการสูญหายของจุลินทรีย์ รวมทั้งประเทศไทยมีองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตรพร้อมที่จะเป็นผู้นำของอาเซียนได้ และผู้ต้องการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ทางการเกษตรสามารถเข้าถึงข้อมูลได้สะดวก และรวดเร็ว

โดยมีวัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่ออนุรักษ์ จำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพทางการเกษตรสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

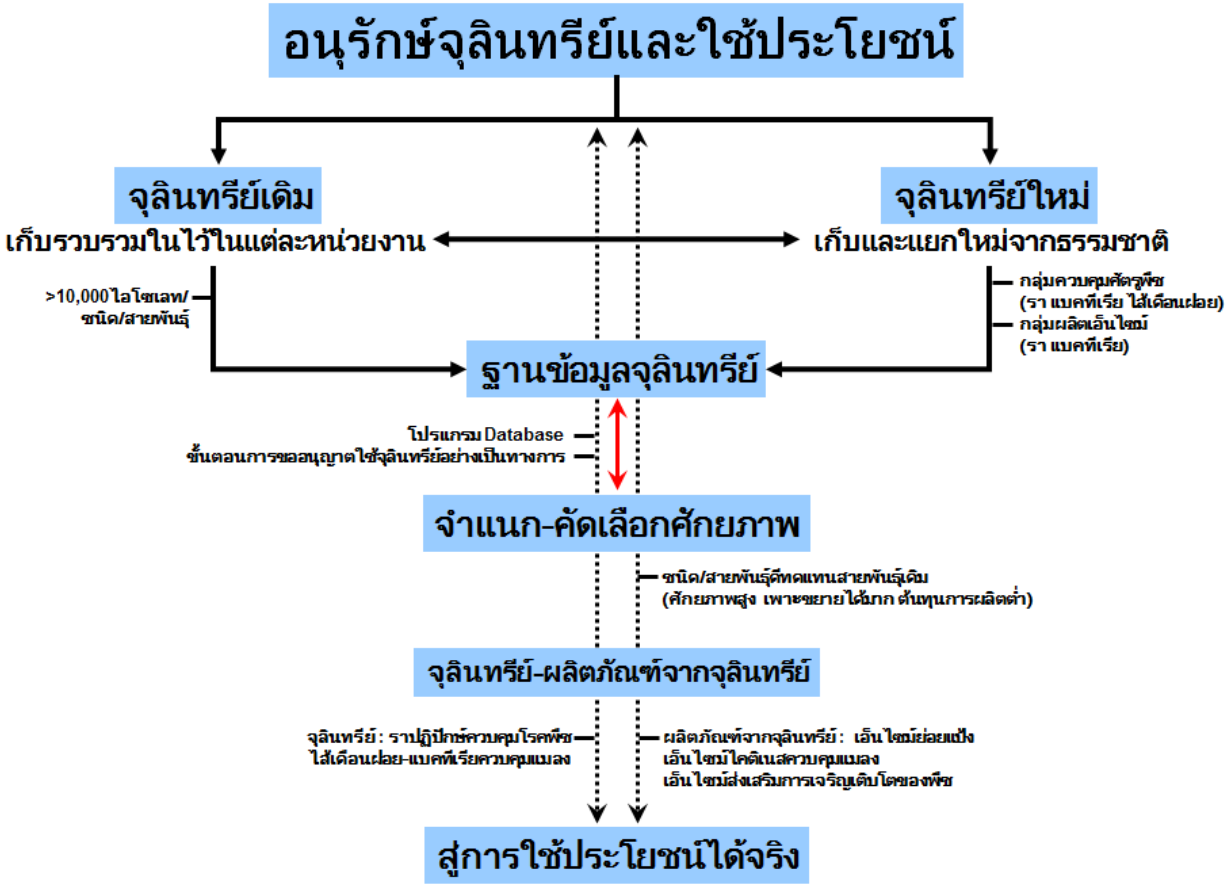
2. เพื่อศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ และสารชีวภาพ โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง และพัฒนากระบวนการผลิตจุลินทรีย์ทางการเกษตรใช้เป็นต้นแบบในเชิงพาณิชย์

3. เพื่อจัดทำฐานข้อมูล (Database) รายละเอียดของจุลินทรีย์แต่ละชนิด/สายพันธุ์ ตามการใช้ประโยชน์ ที่สามารถสืบค้นได้อย่างรวดเร็ว อย่างน้อยปีละ 2,000 ไอโซเลท/ชนิด/สายพันธุ์ รวมทั้งจัดทำขั้นตอนการขออนุญาตใช้จุลินทรีย์อย่างเป็นทางการ

แผนงานวิจัย "อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน" ประกอบด้วย 2 โครงการวิจัย ซึ่งมีความเชื่อมโยงในการศึกษาวิจัยเพื่อมุ่งสู่เป้าหมายเดียวกันคือ การนำจุลินทรีย์จากความหลากหลายทางชีวภาพขึ้นมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ตามศักยภาพ/ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์นั้นๆ โดยการรวบรวมสายพันธุ์ที่มีอยู่เดิม และเก็บสายพันธุ์ใหม่ๆ จากธรรมชาติ นำมาจำแนกชนิด/สายพันธุ์ เก็บรักษา เพื่อคัดเลือกได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงทดแทนสายพันธุ์เดิมอย่างต่อเนื่อง โดยในแผนงานวิจัยดังกล่าวมุ่งศึกษาในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพใช้ควบคุมศัตรูพืช ได้แก่ ราควบคุมแมลงและโรคพืช แบคทีเรียบีที ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง และในกลุ่มที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ต่างๆ ได้แก่ ราเขียวผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส ยีสต์ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตเอทานอล และจุลินทรีย์ผลิตสาร ALA เพื่อการเจริญเติบโตของพืช โดยมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อได้เทคโนโลยีต้นแบบที่สามารถนำไปต่อยอดในเชิงพาณิชย์

จุลินทรีย์ทางการเกษตรที่มีอยู่เดิมและเก็บรวบรวมใหม่ภายใต้แผนงานวิจัยนี้ จะจัดเก็บเป็นฐานข้อมูลที่ระบุรายละเอียดของชนิด/สายพันธุ์ แหล่งอาศัย วิธีการเก็บรักษาเพื่อการอนุรักษ์ สถานที่เก็บ ผู้เก็บรักษา และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ให้สามารถสืบค้นได้สะดวก รวดเร็ว และเข้าถึงข้อมูลจุลินทรีย์ได้ง่าย รวมทั้งฐานข้อมูลจุลินทรีย์สามารถเชื่อมโยงกับหน่วยงานอื่นๆ เช่น สำนักงานพัฒนา

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) หรือ BEDO เป็นต้น ความร่วมมือของทุกๆ หน่วยงานที่ดูแลเรื่องจุลินทรีย์ องค์ความรู้ในสาขาวิชา รวมทั้งเทคโนโลยีการผลิตจุลินทรีย์ต่างๆ และการถ่ายทอดความรู้ จะช่วยผลักดันให้ประเทศไทยเป็นหนึ่งในผู้นำด้านจุลินทรีย์ในกลุ่มประเทศอาเซียนได้ใน 5 ปีข้างหน้า เป็นกลยุทธ์ของแผนงานวิจัยที่จะสนับสนุนให้มีการใช้จุลินทรีย์ทางการเกษตรแพร่หลายเพิ่มขึ้น ทั้งในประเทศไทย และในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นแหล่งผลิตอาหารที่สำคัญของโลก



โครงการที่ 1 การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรและการใช้ประโยชน์
Conservation and Utilization of Agricultural Microorganisms

วิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การเก็บรวบรวม จำแนก และคัดเลือกราปฏิปักษ์ควบคุมโรครากปมเพื่ออนุรักษ์และใช้ประโยชน์

การทดลองที่ 1 การเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดราปฏิปักษ์ควบคุมโรครากปม ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างดินและรากจากพื้นที่การระบาดของโรครากปม ได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย รวมทั้งสิ้น 17 จังหวัด จำนวน 950 ตัวอย่าง และทำการแยกเชื้อราโดยวิธี Soil dilution plate method และ Soil plate method

การทดลองที่ 2 การทดสอบคุณสมบัติการเพิ่มขยายราปฏิปักษ์ควบคุมโรครากปมในอาหารต่างๆ ทำการการทดสอบเพาะขยายราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม (*Meloidogyne* spp.) ในเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวโพด ลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเพาะเป็นเวลา 7 วัน

การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากปมในระดับโรงเรือน ทำการทดสอบจำนวนครั้งของการใช้เชื้อรากำจัดไส้เดือนฝอยรากปมในดินปลูกพริกสภาพโรงเรือน ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 กรรมวิธี 6 ซ้ำ คือ กรรมวิธีที่ 1 ใส่ราปฏิปักษ์ 1 ครั้ง พร้อมปลูก กรรมวิธีที่ 2 ใส่ราปฏิปักษ์ 2 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 ที่ 15 วัน กรรมวิธีที่ 3 ใส่ราปฏิปักษ์ 3 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 และ 3 ที่ 15 และ 30 วัน กรรมวิธีที่ 4 ใส่ราปฏิปักษ์ 4 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 3 และ 4 ที่ 15 30 และ 45 วัน และกรรมวิธีที่ 5 ไม่ใส่ราปฏิปักษ์ (control)

กิจกรรมที่ 2 การเก็บรวบรวม จำแนก และคัดเลือกไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่ออนุรักษ์และใช้ประโยชน์

การทดลองที่ 1 การเก็บรวบรวม อนุรักษ์และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครปฐม ชัยนาท กาญจนบุรี อุทัยธานี อยุธยา ราชบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี รวม 18 จังหวัด นำมาแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินด้วย Galleria baiting technique และจำแนกโดยวิธี cross mating กับ *S. siamkayai*

และเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กำหนดรหัสเป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษ 2 ตัวตามชื่อจังหวัด

การทดลองที่ 2 การประเมินศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

ทำการประเมินศักยภาพการเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชของไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ โดยวิธี Quadrant plate bio-assay, Migration in sand column bioassay และนำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และกลุ่มหนอนด้วง

การทดลองที่ 3 การทดสอบคุณสมบัติการเพิ่มขยายไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในอาหารเทียม ทำการเพาะขยายไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงที่แยกได้ในอาหารเทียม โดยมีไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* (KP strain) เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ด้วยอาหารสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ ที่อัตราส่วน 4 : 2 : 4 เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงได้

กิจกรรมที่ 3 การเก็บรวบรวม จำแนก และคัดเลือกแบคทีเรียบีทีควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่ออนุรักษ์และใช้ประโยชน์

ทำการเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดของบีที (*Bacillus thuringiensis*) จากดินในภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศ นำมาจำแนกชนิดโดยตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย จากนั้นทำการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 40 % ที่อุณหภูมิ 4 °C ,-30 °C, -80 °C เป็นระยะเวลา 3, 6 และ 12 เดือน

กิจกรรมที่ 4 การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์ทางการเกษตรและการบริการ

ทำการรวบรวมรายชื่อจุลินทรีย์ การเก็บรักษา ลักษณะการดำรงชีวิต และการใช้ประโยชน์ จากหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร และออกแบบโครงสร้างระบบฐานข้อมูล จัดทำเว็บไซต์ ติดตั้งระบบบนโดเมน สร้างเว็บเพจและนำเข้าข้อมูล ทดสอบการใช้งาน และเปิดใช้งานจริง จัดทำ QR-Code เพื่อการเข้าถึง และผู้ใช้สามารถดาวน์โหลดเอกสารไปใช้งานได้

ผลการวิจัย

การสำรวจเก็บตัวอย่างดินและรากในพื้นที่การระบาดของโรครากปม ได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย รวมทั้งสิ้น 17 จังหวัด จำนวน 950 ตัวอย่าง และทำการแยกเชื้อราจากดินโดยวิธี Soil dilution plate method และ Soil plate method บนอาหาร GAN และ ½ PDA สามารถแยกได้รา 56 ไอโซเลท และแยกได้จากชิ้นราก จำนวน 3 ไอโซเลท ด้วยวิธี IPP บนอาหาร WA กำหนดรหัสตามชื่อจังหวัดและจำนวนที่

แยกได้คือ BR1-BR5, SK1-SK5, UB1-UB8, KK1-KK6, NS1-NS3, SB1-SB8, NP1-NP7, RB1-RB5, KB1-KB6, CB1, CM1-CM3 และ CR1-CR2 รวมแยกได้ 59 ไอโซเลท คิดเป็น 9.08 % ของจำนวน 950 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ 5 สกุล คือ *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces* และ *Fusarium* และพบว่ารา *Paecilomyces* spp. BR3, NP3 และ UB1 isolate และ *Fusarium* spp. BR5 และ CB1 isolate สามารถทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 70.05 และ 19.8 % ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อรา *Paecilomyces* และ *Fusarium* ในดินอบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และตรวจความมีชีวิตที่ระยะเวลาเก็บ 6 เดือน พบว่าเชื้อรา *Paecilomyces* ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนรา *Fusarium* ไม่เจริญเติบโตในเวลา 6 เดือนเท่ากัน และที่เก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน พบว่ารา *Paecilomyces* ไม่เจริญบนอาหาร PDA จากการนำเชื้อรา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate มาขยายให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปใช้กำจัดไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงเกษตร สามารถเพาะเลี้ยงได้ดีที่สุดในเมล็ดข้าวฟ่างนึ่ง พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีได้จำนวนสูงที่สุดเท่ากับ 9.08 x 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ที่เพาะขยายในเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ ในอัตรา 20 กรัมต่อต้นพริก ในสภาพดินที่มีไส้เดือนฝอยรากปม สามารถลดการเกิดปมได้ 50-75% ของระบบราก โดยมีการใส่ราปฏิปักษ์จำนวนอย่างน้อย 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 พร้อมปลูก และครั้งที่ 2 ห่างกัน 15 วัน และไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อใส่เชื้อรา 3 และ 4 ครั้ง เมื่อนำเชื้อราที่เจริญบนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยมาทดสอบพบว่ายังคงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ได้ 100 %

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง เก็บรวบรวมตัวอย่างดินจำนวน 878 ตัวอย่าง จาก 18 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครปฐม ชัยนาท กาญจนบุรี อุทัยธานี อยุธยา ราชบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี แยกได้ไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* sp. จำนวน 42 ไอโซเลท กำหนดรหัสเพื่อเก็บรักษาเป็นอักษรย่อชื่อจังหวัดคือ ภาคเหนือ *Steinernema* sp. CM, PL, KP02, PB ภาคกลาง *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *Steinernema* sp. KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก *Steinernema* sp. PR, PJ และภาคตะวันออก *Steinernema* sp. CB ทุกไอโซเลทเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีการ re-culture ทุก 3 เดือน เพื่อรักษาความมีชีวิต สามารถจำแนกชนิดโดยวิธีผสมข้ามเป็น *S. siamkayai* เมื่อนำประเมินศักยภาพในการกำจัดแมลงโดยวิธี bioassay ผลการทดลอง Quadrant plate bio-assay พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. รหัส KP isolate เคลื่อนที่ในทิศทางเข้าหาหนอนเหยื่อล่อกับทิศทางตรงข้าม ที่เวลา 30 นาที มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ 48.87 ในขณะที่ *S. siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ 55.82 และไส้เดือนฝอยรหัสที่มีค่าเฉลี่ยระยะทางน้อยที่สุด 3 ลำดับคือ ไส้เดือนฝอยรหัส PJ, CN และ NP isolate เท่ากับ 9.68 10.59 และ

12.68 ตามลำดับ และผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain ไส้เดือนฝอยไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงสุดในการเป็นสารชีวภัณฑ์ ได้แก่ ไส้เดือนฝอย รหัส KP, KB, RE และ UB isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ (หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนกระทู้ดาวเรือง หนอนเจาะสมอฝ้าย) และกลุ่มหนอนด้วง (ด้วงกุหลาบ ด้วงเต่าแตง หนอนด้วงทำลายรากพืช) พบว่าไส้เดือนฝอย 4 ไอโซเลท มีศักยภาพในการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และกลุ่มหนอนด้วง มีเปอร์เซ็นต์การตายในแต่ละไอโซเลท เท่ากับ 38-100 % ในเวลา 48 ชม. การเพาะขยายไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในอาหารเทียมสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ ที่อัตราส่วน 4:2:4 เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 17 ไอโซเลท โดยมีไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* (KP strain) เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ผลการทดลองพบว่า ไส้เดือนฝอยไอโซเลท CM, LP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ และ CB ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 จำนวน 7.9 8.2 9.2 11.2 7.6 10.8 12.8 13.2 13.8 15.5 8.2 11.8 17.2 5.8 10.5 9.2 และ 7.7 ล้านตัวต่ออาหาร 20 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์เปรียบเทียบ (KP strain) ได้ผลผลิตเฉลี่ย 16.8 ล้านตัวต่ออาหาร 20 กรัมเท่ากัน การใช้ประโยชน์จากผลงานวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อไส้เดือนฝอยสำหรับจำหน่าย/จ่ายแจกให้กับเกษตรกร หน่วยงาน และผู้สนใจ เพื่อผลิตและใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยการเพาะขยายไส้เดือนฝอยใช้เอง เป็นอีกหนึ่งเทคโนโลยีเพื่อการพึ่งพาตนเองอย่างยั่งยืน สำหรับเกษตรกรรายย่อยหรือกลุ่มเกษตรกรผลิตพืชผักอินทรีย์ ผักอนามัย ผักปลอดสารพิษ และกลุ่มเกษตรกรที่ประสบปัญหาแมลงดื้อยา ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย จึงเป็นชีวินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้เอง และมีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด นำมาใช้ทดแทนหรือลดจำนวนครั้งของการใช้สารเคมี ได้ผลิตผลเกษตรที่ปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

แบคทีเรียบีที ได้ทำการเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดของบีที จากดินในภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศ พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 57 ไอโซเลท จากการนำเชื้อ *B. thuringiensis* ตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแบนที่ได้ส่วนใหญ่จะผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่2 พบว่า มีเพียง เชื้อ *B. thuringiensis* BT_001 ที่ระดับความเข้มข้น 108 มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็น ในวันที่ 3 คือ 72 ชั่วโมง และชุดควบคุมไม่มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย โดยลักษณะของตัวหนอนที่ตาย จะมีสีลำตัวเป็นสีดำ ลำตัวของตัวหนอนจะงอแข็ง วางตัวตะแครงข้าง และไม่เคลื่อนไหวอีกต่อไป ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* เบื้องต้นนั้นจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ใช้นำมาทดสอบต้องเลี้ยง ให้เจริญจนถึงช่วง Free spore คือเป็นระยะที่สปอร์และผลึกโปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ เพื่อให้เชื้อมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเกิดพิษกับแมลง นั่น

คือผลึกโปรตีนพร้อมที่เปลี่ยนรูปเป็นสารพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งผลการตายของหนอนที่ชัดเจนเนื่องจากเชื้อ *B. thuringiensis* อยู่ที่ประมาณ 3 วัน เพราะถ้าใช้เชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ที่ยังไม่อยู่ในช่วง Free spore เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง เชื้อ *B. thuringiensis* จะใช้เวลาในการเจริญต่ออีกระยะหนึ่งเพื่อทำการพัฒนาให้กลายเป็นสปอร์และผลึกโปรตีนที่สมบูรณ์ทำให้ระยะเวลาที่จะทำให้หนอนตายเพิ่มขึ้นไปอีก 1-2 วันหรือหนอนอาจไม่ตายเลยเนื่องจากว่าหนอนมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนวัยมีความแข็งแรงพอที่จะต้านทานต่อ B. thuringiensis ได้ เทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (Cotton bollworm) ในห้องปฏิบัติการโดยสุ่มทดสอบกับ *B. thuringiensis* 20 ไอโซเลท จากการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 40 % ที่อุณหภูมิ 4 °C ,-30 °C, -80 °C เป็นระยะเวลา 3, 6 และ 12 เดือน พบว่า *B. thuringiensis* ทั้ง 20 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาใน กลีเซอรอล 40 % ที่อุณหภูมิ 4 °C ,-30 °C, -80 °C ลดประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* ลงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้

การจัดการฐานข้อมูลด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตร โดยนำข้อมูลจากหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร มาออกแบบโครงสร้างระบบฐานข้อมูล จัดทำเว็บไซต์ ติดตั้งระบบบนโดเมน สร้างเว็บเพจและนำเข้าข้อมูล ทดสอบการใช้งาน และเปิดใช้งานจริง ในชื่อ microorganism.expertdoa.com ประกอบด้วยเว็บเพจที่สามารถนำเสนอข้อมูลจุลินทรีย์ที่สำคัญ ข้อมูลนักวิจัย และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมถึงจุลินทรีย์ทางด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดโรคได้ครบทุกมิติ สามารถเข้าถึงข้อมูลกิจกรรมต่างๆ Link สู่ Social media ที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มเส้นทางการสื่อสารอย่างต่อเนื่อง ผู้ใช้สามารถดาวน์โหลดเอกสารไปใช้งานได้

โครงการวิจัยที่ 2 การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์

วิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์

ทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยเพิ่มตำแหน่งเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อโคลนยีนกลูโคอะไมเลส และยีนแอลฟาอะไมเลสเข้ากับเวคเตอร์ของยีสต์ เพิ่มปริมาณยีนกลูโคอะไมเลสและยีนแอลฟาอะไมเลสด้วยเทคนิค PCR จากพลาสมิดที่มียีนทั้งสองชนิด โคลนยีนเข้าสู่เวคเตอร์สำหรับยีสต์ แล้วชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอ็นไซม์กลูโคอะไมเลสและแอลฟาอะไมเลสในยีสต์ จากนั้นนำมาสกัดรีคอมบิแนนท์กลูโคอะไมเลสและแอลฟาอะไมเลสให้บริสุทธิ์ นำไปทดสอบประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์กลูโคอะไมเลสและแอลฟาอะไมเลส ในการย่อยแป้งจากมันสำปะหลัง

กิจกรรมที่ 2 การผลิตไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

ทำการรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในแหล่งต่างๆ และจากแหล่งที่เก็บรักษาเชื้อราของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ คัดแยกในอาหารเฉพาะและแยกราให้บริสุทธิ์ จำแนกชนิดราด้วยวิธีชีวโมเลกุล จากนั้นทำการคัดเลือกราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส นำมาทดสอบ Bioassay กับหนอนผีเสื้อ

กิจกรรมที่ 3 การโคลนยีน 5-aminolevulinate synthase (ALAS) จากจุลินทรีย์

ทำการรวบรวมจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงจากแหล่งต่างๆ และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิต ALA ทำการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเทคนิคชีวโมเลกุล รวบรวมลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการผลิตเอ็นไซม์ ALA synthase ใน NCBI ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน โคลนยีนและถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ E. coli จากนั้นทำการทดสอบการผลิตสาร ALA จากรีคอมบิแนนท์เอ็นไซม์ ALA synthase และทดสอบคุณสมบัติของสาร ALA ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในเมล็ดข้าว โดยวิธีการแช่เมล็ดในสารละลาย ALA แล้วสังเกตและวัดการเจริญของราก

กิจกรรมที่ 4 เทคโนโลยีต้นแบบการผลิตไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในอาหารเหลวเชิงพาณิชย์

ทำการการขยายปริมาณไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. Thai isolate) ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ในสภาพมีเชื้ออื่นร่วมด้วย 1 ชนิด (monoxenic culture) และศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิต ได้แก่ อุณหภูมิ pH และแสง ทดสอบผลิตสภาพถังหมัก ดัดแปลง และพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เพื่อการค้า จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ทดสอบกำจัดแมลงในสภาพแปลงปลูก

ผลการวิจัย

การนำยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ เพื่อยีสต์สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังในการผลิตเอธานอลได้ในขั้นตอนเดียว และเพื่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป โดยเพิ่มปริมาณยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sap I และนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pD1214-AT (ATUM, USA) นำพลาสมิดลูกผสมถ่ายฝากเข้าเซลล์ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae สายพันธุ์ INVSc-1 จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง พบว่ายีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสสามารถ ย่อยแป้งได้ โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน

จากการเก็บรวบรวมเชื้อราตามแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และจากตัวอย่างเชื้อราจากศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ ได้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ ซึ่งมีทั้งเชื้อเมตาไรเซียม บิววาเลีย เมื่อทำการผลิตไคติเนสแล้วนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสสามารถทำให้แมลงตายได้ทั้งในช่วงที่เป็นหนอน ดักแด้และผีเสื้อ มีผลในการยับยั้งการกินอาหารโดยหนอนกระทู้ผักจะไม่กินอาหารที่มีไคติเนสปะปน นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตจะทำให้หนอนยืดอายุในการลอกคราบทำให้มีอายุนานกว่าหนอนปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ เปอร์เซ็นต์การตายในช่วงดักแด้และผีเสื้อจะสูงกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงรูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ในการนำไปใช้ในการกำจัดแมลง ตลอดจนอายุการเก็บรักษาที่จะรักษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง นอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาการนำไคติเนสไปผสมกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่นเพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ดียิ่งขึ้น

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำแหล่งต่างๆ สามารถคัดเลือกได้เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 ที่มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA ได้ดี เมื่อนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน hemA (synthase) ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 พบว่าชิ้นยีน hemA (synthase) ที่ได้ มีขนาด 1,224 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน hem A ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของเปปไทด์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน hemA (synthase) ของ Rhodobacter sphaeroides (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์

การโคลนยีนจากการเชื่อมต่อชิ้นยีน hem A เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) สามารถถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของ

ยีน hem A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ ALA synthase พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase มีผลทำให้ recombinant *E. coli* สามารถผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) ได้ จึงเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสาร ALA เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. KP isolate) สามารถเลี้ยงได้ในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 7: 2 : 1 มีต้นทุนค่าอาหารต่ำกว่า 50 บาทต่อลิตร เลี้ยงในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 107 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารมี pH เท่ากับ 7 ตั้งวางในสภาพอุณหภูมิ 25+2 oซ เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุดระหว่าง 90,000-104,000 ตัว/มล. (หรือเท่ากับ 90 และ 104 ล้านตัว/ลิตร) ซึ่งแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยขณะเพาะเลี้ยง ผลผลิตไส้เดือนฝอยสามารถเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด เท่ากับ 32.2 % และมีประสิทธิภาพในการใช้พ่นกำจัดหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ในแปลงผักคะน้า โดยพ่นในอัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) สามารถคัดผักส่งตลาดได้ คิดเป็นร้อยละ 92.50

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โครงการที่ 1 การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรและการใช้ประโยชน์

การอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายเพื่อเก็บรวบรวม จำแนก และคัดเลือกนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ได้แก่ ราปฏิปักษ์ ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง แบคทีเรียบีทีควบคุมแมลง ผลการศึกษาวิจัยสรุปได้ดังนี้

ราปฏิปักษ์ แยกได้จาก 17 จังหวัด ไดแก่ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย จำนวน 950 ตัวอย่าง กำหนดรหัสตามชื่อจังหวัดและจำนวนที่แยกได้คือ BR1-BR5, SK1-SK5, UB1-UB8, KK1-KK6, NS1-NS3, SB1-SB8, NP1-NP7, RB1-RB5, KB1-KB6, CB1, CM1-CM3 และ CR1-CR2 จำแนกได้รา 5 สกุล คือ *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces* และ *Fusarium* และพบว่ารา *Paecilomyces* และ *Fusarium* สามารถทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 70.05 และ 19.80 % ตามลำดับ นำมาเชื้อรา *Paecilomyces* และ *Fusarium* เก็บรักษาในดินอบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน พบว่าเชื้อรา *Paecilomyces* ยังสามารถ

เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนรา *Fusarium* ไม่เจริญเติบโตในเวลา 6 เดือนเท่ากัน เมื่อทำการทดสอบเพาะขยายราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ในเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวโพด ลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเพาะเป็นเวลา 7 วัน พบว่ารา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate สามารถเจริญได้ดีและผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากในเมล็ดข้าวฟ่าง มีจำนวนสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 9.08×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเมล็ดข้าวโพด เท่ากับ 7.64×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ได้ระหว่าง 65-78 % จากการทดสอบประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ (*Paecilomyces* sp.) ในการควบคุมโรครากปมพริกในระดับโรงเรือน พบว่าการใส่ราปฏิปักษ์ 2 3 และ 4 ครั้ง ช่วยลดการเกิดปม 50-75% ของระบบราก โดยมีดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 2.52 2.50 และ 2.33 ตามลำดับ (2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%) ในขณะที่การใส่ 1 ครั้ง และไม่ใส่ราปฏิปักษ์ มีดัชนีการเกิดปมที่รากพริกเท่ากับ 3.88 และ 4.79 (3 = เกิดปม 25-50 %; 4 = เกิดปม 50-75%) ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตรวจนับจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยในดินปลูก มีจำนวนเท่ากับ 235 62 56 33 และ 825 ตัวต่อดิน 200 กรัม ของกรรมวิธีที่ 1-5 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทดสอบ โดยนำดินละลายน้ำและเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทุกกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าราปฏิปักษ์สามารถเข้าทำลายไข่ได้ 100 %

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง แยกได้จากตัวอย่างดิน 18 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครปฐม ชัยนาท กาญจนบุรี อุทัยธานี อยุธยา ราชบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี จำนวน 878 ตัวอย่าง ได้ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ใช้กำจัดแมลง จำนวน 42 ไอโซเลท จำแนกได้ 1 สกุล (*Steinernema* sp.) โดยวิธี cross mating กับ *S. siamkayai* และทำการเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตามรหัสที่กำหนดเป็นอักษรย่อชื่อจังหวัด ดังนี้ ภาคเหนือ *Steinernema* sp. CM, PL, KP, PB ภาคกลาง *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *Steinernema* sp. KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก *Steinernema* sp. PR, PJ และภาคตะวันออก *Steinernema* sp. CB จากการจำแนกโดยวิธีผสมข้ามพบว่าทุกไอโซเลท สามารถผสมพันธุ์กับ *S. siamkayai* ให้ลูกรุ่นใหม่ได้ ดังนั้นไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงที่แยกได้จากดิน 42 ไอโซเลท เป็นไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* จากการประเมินศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. จำนวน 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ CM, PL, KP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, BR, PR, PJ และ CB โดยวิธี Quadrant plate bio-assay พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. รหัส KP isolate เคลื่อนที่ในทิศทางเข้าหาหนอนเหยื่อล่อกับทิศทางตรงข้าม ที่เวลา 30 นาที มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ 48.87 ในขณะที่ *S. siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ

55.82 ในขณะที่ผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain โดยไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KP, KB, RE และ UB isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อและกลุ่มหนอนด้วง พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 4 ไอโซเลท มีศักยภาพในการฆ่าแมลงทั้ง 2 กลุ่ม ตาย 38-100 % ในเวลา 48 ชม. เมื่อนำไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท และสายพันธุ์ KPs (control) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ เป็นเวลา 7 วัน และนำมานับจำนวนไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงได้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับสายพันธุ์ KPs พบว่า ไส้เดือนฝอยไอโซเลท CM, PL, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ และ CB ในอาหารสูตรไข่ผสมน้ำมันหมูและน้ำในอัตราส่วน 4 : 2 : 4 ให้ผลผลิต 7.9 8.2 9.2 11.2 7.6 10.8 12.8 13.2 13.8 15.5 8.2 11.8 17.2 5.8 10.5 9.2 และ 7.7 ล้านตัวต่อถุงเพาะ ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ KPs ได้ผลผลิตเฉลี่ย 14.1-16.8 ล้านตัวต่อถุงเพาะ จากการเพาะขยายในอาหารสูตรดังกล่าวพบว่าไอโซเลทที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ RE เท่ากับ 17.2 ล้านตัวต่อน้ำหนักก้อนอาหาร 20 กรัม และสูงกว่า KPs (ไอโซเลทที่ใช้เปรียบเทียบ) ซึ่งไอโซเลท RE เก็บได้จากพื้นที่ จ.ร้อยเอ็ด รองลงคือ KK และ RB เท่ากับ 15.5 และ 13.8 ล้านตัวต่อน้ำหนักก้อนอาหาร 20 กรัม เป็นตัวอย่างดินจาก จ.ขอนแก่น และ จ.ราชบุรี

แบคทีเรียบีที จากผลการคัดแยกเชื้อเบื้องต้น จากตัวอย่างดินทั้งหมด 117 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาวและมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าได้ผลของพีซีอาร์ขนาดแถบแบนเท่ากับ 1500 pb เมื่อส่งผลพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม NCBI พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 30 ไอโซเลท แล้วนำมาศึกษาการสร้างโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel ของบริษัท NOVEX® by life technologise™ และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard marker ซึ่งประกอบไปด้วยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11, 17, 25, 35, 48, 63, 75, 100,135 และ 180 กิโลดาลตัน พบว่า BT ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่ 2 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^8 มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 คือ 72 ชั่วโมง ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* เบื้องต้นนั้นจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ใช้นำมาทดสอบต้องเลี้ยง ให้เจริญจนถึงช่วง Free spore คือเป็นระยะที่สปอร์และผลึกโปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ เพื่อให้เชื้อมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเกิดพิษกับแมลง นั่นคือผลึกโปรตีนพร้อมที่เปลี่ยนรูปเป็นสารพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง การเก็บรักษา BT เพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในสภาวะต่างๆ นั้น ทำการเก็บรักษา 3 สภาวะ คือ 4 -20 และ -80 องศาเซลเซียส โดยมีจำนวน

เชื้อทั้งหมด 57 isolate พบว่าประสิทธิภาพลดลงตั้งแต่ระยะเวลา 3 เดือน ในสภาพอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จึงควรหาเทคนิคการเก็บรักษาด้วยวิธีอื่นที่เหมาะสมต่อไป

การจัดการฐานข้อมูลด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตร โดยนำข้อมูลจากหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร มาออกแบบโครงสร้างระบบฐานข้อมูล จัดทำเว็บไซต์ ติดตั้งระบบบนโดเมน สร้างเว็บเพจและนำเข้าข้อมูล ทดสอบการใช้งาน และเปิดใช้งานจริง ในชื่อ microorganism.expertdoa.com ประกอบด้วยเว็บเพจที่สามารถนำเสนอข้อมูลจุลินทรีย์ที่สำคัญ ข้อมูลนักวิจัย และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมถึงจุลินทรีย์ทางด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดโรคได้ครบทุกมิติ สามารถเข้าถึงข้อมูลกิจกรรมต่างๆ Link สู่ Social media ที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มเส้นทางการสื่อสารอย่างต่อเนื่อง ผู้ใช้สามารถดาวน์โหลดเอกสารไปใช้งานได้ การนำไปใช้ประโยชน์ ผู้สนใจสามารถสืบค้นฐานข้อมูลจุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ และสามารถเข้าถึงได้อย่างรวดเร็วในระบบอินเทอร์เน็ตที่เผยแพร่ทางเว็บไซต์ รวมทั้งนักวิจัย/เกษตรกร/ผู้สนใจ นำองค์ความรู้ทางวิชาการและเทคโนโลยีด้านจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ไปต่อยอดใช้ประโยชน์ได้

โครงการที่ 2 การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ โดยศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ต่างๆ พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ยีสต์ผลิตขึ้น มีความสามารถในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบได้ และยีสต์ที่สร้างขึ้นมานี้สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดออกมาได้โดยใช้โปรโมเตอร์ TEF1 ซึ่งเป็น constitutive promoter ที่ทำงานหรือแสดงออกได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นด้วยสารชักนำใดๆ นอกจากนี้ยีสต์ที่สร้างขึ้นมานี้ยังสามารถหลั่งเอนไซม์ส่งออกมานอกเซลล์ของยีสต์ได้ จึงทำให้สะดวกในการใช้งานเอนไซม์ สามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้งเพื่อผลิตเอธานอลและยังสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในเชิงพาณิชย์ต่อไป ซึ่งสามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้ง ทำให้ลดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตเอธานอล

การผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง พบว่ามีทั้งมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ ชนิดที่สำคัญคือเชื้อเมตาไรเซียมและบิววาเลีย เมื่อทำการผลิตไคติเนสแล้วนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสสามารถทำให้แมลงตายได้ทั้งในช่วงที่เป็นหนอน ดักแด้และผีเสื้อ มีผลในการยับยั้งการกินอาหารโดยหนอนกระทู้ผักจะไม่กินอาหารที่มีไคติเนสปะปน นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตจะทำให้หนอนยืดอายุในการลอกคราบทำให้มีอายุนานกว่าหนอนปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ เปอร์เซ็นต์การตายในช่วงดักแด้และผีเสื้อจะสูงกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงรูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ในการนำไปใช้ในการกำจัดแมลง ตลอดจนอายุการเก็บรักษาที่จะรักษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง นอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาการนำไคติเนสไปผสมกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่นเพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ ช่วยเสริม

ประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ดียิ่งขึ้น และควรมีการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ไคติเนสที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำแหล่งต่างๆ สามารถคัดเลือกได้เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 ที่มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA ได้ดี เมื่อนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน hemA (synthase) ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 พบว่าชิ้นยีน hemA (synthase) ที่ได้ มีขนาด 1,224 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน hem A ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของเปปไทด์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน hemA (synthase) ของ Rhodobacter sphaeroides (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ การโคลนยีนจากการเชื่อมต่อชิ้นยีน hem A เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) สามารถถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน hem A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ ALA synthase พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase มีผลทำให้ recombinant E. coli สามารถผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) ได้ จึงเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสาร ALA เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป โดยเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 สามารถนำไปเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต ALA ได้ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ผลิตเอนไซม์ ALA synthase ได้ดี สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาร ALA ให้มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น ซึ่งสามารถใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มผลผลิต เป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้สารเคมี ฮอร์โมน และสารเสริมที่สังเคราะห์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

การผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. KP isolate) สามารถเลี้ยงได้ในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 7: 2 : 1 มีต้นทุนค่าอาหารต่ำกว่า 50 บาทต่อลิตร เลี้ยงในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารมี pH เท่ากับ 7 ตั้งวางในสภาพอุณหภูมิ 25+2 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด ระหว่าง 90,000-104,000 ตัว/มล. (หรือเท่ากับ 90 และ 104 ล้านตัว/ลิตร) ซึ่งแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยขณะเพาะเลี้ยง ผลผลิตไส้เดือนฝอยสามารถเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด เท่ากับ 32.2 % และมีประสิทธิภาพในการใช้พ่นกำจัดหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ในแปลงผักคะน้า โดยพ่นในอัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่

แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) สามารถคัดผักส่งตลาดได้ คิดเป็นร้อยละ 92.50 ซึ่งภาคเอกชนหรือหน่วยงานต่างๆ สามารถนำเทคโนโลยีไปผลิตในเชิงพาณิชย์ เพื่อให้มีสารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชเพื่อใช้ลดหรือทดแทนสารป้องกันกำจัดแมลง

ข้อเสนอแนะ

งานด้านจุลินทรีย์นับเป็นงานวิจัยที่เกิดประโยชน์ต่อวงการเกษตร อุตสาหกรรม อาหารและยา มีผลกระทบทั้งในเชิงเศรษฐกิจ สังคม และชุมชน เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดได้มากมายทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังนั้น ควรมีการบูรณาการความร่วมมือระหว่างหน่วยงานวิจัยของสถาบันการศึกษา ซึ่งทำงานเชิงลึกหรืองานวิจัยพื้นฐานจนถึงวิจัยประยุกต์ ร่วมมือกับหน่วยงานวิจัยภาครัฐ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และกระทรวงพลังงาน) และภาคเอกชน นำไปพัฒนาทดสอบในภาคสนามสู่การใช้ประโยชน์ได้จริงทั้งในเชิงสาธารณะและเชิงพาณิชย์

การนำไปใช้ประโยชน์

1. จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ได้แก่ ราปฏิปักษ์ ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง แบคทีเรียบีทีควบคุมแมลง ได้เก็บรวบรวมและคัดเลือกศักยภาพ/ประสิทธิภาพ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม

2. สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์ในเชิงพาณิชย์

3. สามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้ง ทำให้ลดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตเอธานอล

4. เอ็นไซม์ไคติเนส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืช ในรูปแบบของเอ็นไซม์ไคติเนสที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์

5. ภาคเอกชนหรือหน่วยงาน นำเทคโนโลยีการผลิตไส้เดือนฝอยไปต่อยอดผลิตในเชิงพาณิชย์ ใช้เป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชเพื่อลดหรือทดแทนสารป้องกันกำจัดแมลง

บรรณานุกรม

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง: นิวคลีโอโดลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2558. การผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืชแบบทำใช้เอง กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 32 หน้า.

อรพิน ภูมิภมร. 2530. การผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อราที่ทำลายหัวมันสำปะหลังโดยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสาตร์). 21:39-40.

Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sýnal, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. and Margalith, Y. 1997. Extended Screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 4883-4890.

Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-172. In R. Gaugler and H.K.Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida.

Kramer, K. L. and S. Muthikrishnan, 1997. Insect Chitinases: Molecular biology and potential use as pesticides. Insect Biochem. Molec. 27: 887-900.

Jordan, P.M. 1991. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid andits transformation into uroporphyrinogen Ill in animals and bacteria. In Biosynthesis of Tetrapyrroles (Jordan, P.M., Ed.), pp. 1-66. Elsevier, Amsterdam.

Lin, L. L., Y. J. Ma, H. R. Chien and W. H. Hsu. 1998. Construction of an Amylolytic Yeast by Multiple Integration of the Aspergillus awamori Glucoamylase Gene into a Saccharomyces cerevisiae Chromosome. Enzyme and Microbial Technology. 23:360–365.

Martin, P.A., Gundersen, D.E. and Blackburn, M.B. 2010. Distribution of phenotypes among Bacillus thuringiensis strains. Systematic and Applied Microbiology, 33:204- 208.

Neidle, E. L., and S. Kaplan. 1993. Expression of the Rhodobacter sphaeroides hemA and hemT genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. J. Bacteriol. 175:2292–2303.

Sasikala, Ch., Ramana, Ch.V. and Rao, P.R. 1994. 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganisms. Biotechnol. Prog. 10: 451-459.

Warnick GR, Burnham BF. Regulation of prophyrin biosynthesis. Purification and characterization of -aminolevulinic acid synthase. J Biol Chem. 1971 Nov 25; 246(22):6880–6885.