

ความมีชีวิตและการปลดปล่อยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนต **Viability and releasing of phosphate solubilizing bacteria encapsulated with alginate**

วรรณทกานจน์ เอียดเหต¹, ชินวรณ์ เพ็ญระวะ¹, ธันวา อินทร์อ่อง¹, สุรพล ฐิตินากุล¹
และ ดวงแขพิตา กาญจนโสภ^{1*}

Wanthakarn Aiedhet¹, Chinnawall Pengrawa¹, Thanwa In-ong¹,
Suraphon Thitithanakul¹ and Duangkhaetita Kanjanasopa^{1*}

บทคัดย่อ: การเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์กระตุ้นการเติบโตพืชลงดินช่วยให้พืชเพิ่มการดูดซับธาตุอาหารและปุ๋ยเคมีจากดิน ส่งผลให้พืชเติบโตและมีผลผลิตเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามหัวเชื้อจุลินทรีย์มีชีวิตอยู่ในดินได้ไม่นานเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงภายในดิน ดังนั้นการห่อหุ้มเซลล์จึงเป็นวิธีป้องกันหัวเชื้อจุลินทรีย์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียจากการตรึงแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus aryabhattai* KNB6 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่มีความเข้มข้น 1% (w/v) และ 2% (w/v) พบว่า ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ มีค่าเท่ากับ $38.83 \pm 29.97\%$ และ $86.47 \pm 16.88\%$ ตามลำดับ การตรึงแบคทีเรียด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% (w/v) บ่มเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด NB TSB และ TYG พบว่าอาหาร TYG ให้ประสิทธิภาพการตรึงแบคทีเรียสูงที่สุดเท่ากับ $99.93 \pm 0.05\%$ รองลงมาคือ TSB และ NB เท่ากับ $99.67 \pm 0.10\%$ และ $86.47 \pm 16.88\%$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความมีชีวิตและการปลดปล่อยแบคทีเรียจากอัลจิเนตที่ตรึงด้วย NB ให้ค่าความมีชีวิตและการปลดปล่อยแบคทีเรียสูงกว่า TSB และ TYG

คำสำคัญ: การห่อหุ้มเซลล์, อัลจิเนต, แบคทีเรียละลายฟอสเฟต, แบคทีเรียกระตุ้นการเติบโตพืช

ABSTRACT: Plant growth promoting inoculant inoculated directly into plant can stimulates plant growth and yield production via enhancement the nutrients absorption from soil or chemical fertilizers. However, bacteria viability was limited due to environment changing in the soil. Cell encapsulation is a way of protecting microorganisms from inappropriate environment. The aim of this study was to investigate the appropriate of sodium alginate concentration and media types for immobilized *Bacillus aryabhattai* KNB6, phosphate solubilizing bacteria. Cell immobilization at concentration of 1% (w/v) and 2% (w/v) of sodium alginate showed an encapsulation efficiency at $38.83 \pm 29.97\%$ and $86.47 \pm 16.88\%$, respectively. Encapsulation efficiency of 2% (w/v) sodium alginate cultivated on three types of media, NB TSB and TYG was carried out. The TYG gave the highest immobilization efficiency at 99.93 ± 0.05 , followed by TSB and NB at $99.67 \pm 0.10\%$ and $86.47 \pm 16.88\%$, respectively, Nevertheless, viability and bacteria releasing from 2% (w/v) alginate with NB had higher than TSB and TYG.

Keyword: encapsulation cell, alginate, phosphate-soluble bacteria, plant growth promoting bacteria

¹ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

Agricultural Science and Technology, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Suratthani Campus

* Corresponding author: daungkhae.k@psu.ac.th

บทนำ

สารชีวภาพกระตุ้นการเติบโตพืช (plant biostimulant) หมายถึง จุลินทรีย์หรือสารใดๆ เมื่อนำมาใช้กับพืชแล้วจะช่วยกระตุ้นกระบวนการทางธรรมชาติภายในต้นพืชให้มีการดูดซับปุ๋ย (nutrient uptake) ทนต่อสภาพแวดล้อม (abiotic stress) และเพิ่มคุณภาพของผลผลิต ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา หัวเชื้อจุลินทรีย์ (microbial inoculants) เป็นกลุ่มหนึ่งของสารชีวภาพกระตุ้นการเติบโตของพืชที่ได้รับความนิยมในประเทศที่พัฒนาแล้วนำมาใช้ร่วมกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด และมะเขือเทศ เนื่องจากข้อดีที่กว้างด้านความปลอดภัย ต่อเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะจุลินทรีย์กระตุ้นการเติบโตพืชในกลุ่ม plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Kloepper et al., 1989) และ plant growth-promoting bacteria (PGPB) จุลินทรีย์กระตุ้นการเติบโตพืชสามารถคัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) (Bashan et al., 2014) เมื่อนำจุลินทรีย์มาใช้ปลูกร่วมกับเมล็ดพืช ชีวพื้นบริเวณผิวพืชหรือนำมาผสมในดิน จุลินทรีย์จะช่วยเพิ่มธาตุอาหารให้ดิน เพิ่มมวลน้ำหนัก เพิ่มพื้นที่ผิวราก และเพิ่มการดูดซับธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ให้แก่พืช (Vessey, 2003) อย่างไรก็ตาม การเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์กระตุ้นการเติบโตพืชลงดินโดยตรงส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมของดินปลูก ดังนั้นในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีการตรึงเซลล์ หรือ encapsulation มาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยป้องกันจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมของดิน ทำให้จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในดิน และมีปริมาณเพียงพอต่อการสร้างสารเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากงานวิจัยของ วรณทกานุกญ์ และคณะ (2559) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus aryabhattai* KNB6 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม PGPR จากดินรอบรากพืช แบคทีเรียมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเติบโตพืช ได้แก่ การ

ละลายฟอสเฟต ผลิตฮอร์โมนออกซิน สร้างสารไซโตไคน์ และช่วยส่งเสริมการเติบโตของต้นข้าวหอมไชยาในระดับหลอดทดลองได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรึงแบคทีเรีย *Bacillus aryabhattai* KNB6 ด้วยไฮโดรเจลอัลจิเนต ทดสอบความมีชีวิตและการปลดปล่อยแบคทีเรียออกจากอัลจิเนต เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสูตรหัวเชื้อแบคทีเรียในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมหัวเชื้อ

นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus aryabhattai* KNB6 ชีดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) ย้ายเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวลงอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 3 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 18 ชม. ถ่ายเชื้อปริมาตร 0.5 มล. ลงอาหาร NB ปริมาตร 50 มล. บ่มเชื้อที่สภาวะเดิม 18 ชม. เมื่อครบเวลาแบ่งสารละลายแบคทีเรียเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นด้วย total plate count (N_0) และนำสารละลายแบคทีเรียที่เหลือปั่นตกเซลล์ที่ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.85% (w/v) ไฮโดรเจนคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 500 มล. 2 รอบ จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% (w/v) NaCl ปริมาตร 5 มล. เก็บสารละลายแบคทีเรียดังกล่าวไว้เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการตรึงด้วยอัลจิเนต

การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต

ตรึงเซลล์ตามวิธีการของ Bashan et al. (2002) นำสารละลายแบคทีเรียข้างต้น ปริมาตร 5 มล. ผสมด้วยไฮโดรเจนอัลจิเนต (NaAlg) ปริมาตร 40 มล. ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2% (w/v) จากนั้นผสม Skim milk ปริมาตร 5 มล. ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (w/v) คนสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำสารละลายบรรจุลงหลอดฉีดยาขนาด 1 มล. (หัวเข็ม 0.3 มม.) หยดเม็ดอัลจิเนตในสารละลาย 0.1 M แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) คนให้เม็ดเจลขึ้นรูป 30 นาที เมื่อครบเวลาแยกเม็ดอัลจิเนตออกจากสารละลาย

และล้างด้วย 0.85% (w/v) NaCl 2 รอบ นำเม็ดอัลจิเนตบ่มในอาหาร NB 3 ช่วงเวลา ดังนี้ คือ 4 ชม. 8 ชม. และ 18 ชม. ตามลำดับ เมื่อครบเวลาแยกเม็ดอัลจิเนตจากอาหาร NB และล้างด้วย 0.85% (w/v) NaCl 2 รอบ ชั้่นำด้วยกระดาษทิชชูผ่านการฆ่าเชื้อ แบ่งเม็ดอัลจิเนตที่ได้หาปริมาณแบคทีเรียภายหลังการตรึง (N) ด้วยวิธี total plate count ซึ่งน้ำหนักสด วัดขนาดเม็ด และนำเม็ดอัลจิเนตส่วนที่เหลืออบแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 18 ชม. เมื่อครบเวลาชั้่นน้ำหนักแห้ง วัดขนาด และเก็บรักษาในภาชนะปิดแน่นสนิทป้องกันความชื้นอุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ทดสอบความมีชีวิตและการปลดปล่อยแบคทีเรียจากอัลจิเนต

ความมีชีวิตของแบคทีเรียภายหลังการทำแห้ง

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ตามวิธีการของ Bashan et al. (2002) ดังนี้ นำเม็ดอัลจิเนตแห้ง 0.1 ก. แช่ใน 0.85% (w/v) NaCl ปริมาตร 4 มล. บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชม. วัดปริมาณแบคทีเรียด้วย total plate count และคำนวณหาความมีชีวิตของแบคทีเรีย (CFU/g)

คำนวณประสิทธิภาพการตรึงแบคทีเรีย

คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการตรึงแบคทีเรีย (Encapsulation efficiency) ดังนี้

Encapsulation efficiency (%) = $(N_0 - N_f) / N_0 \times 100$
 N_0 = ความมีชีวิตของแบคทีเรียเริ่มต้น (CFU/ml), N_f = ความมีชีวิตของแบคทีเรียในอัลจิเนตแบบสด (CFU/g)

การปลดปล่อยแบคทีเรียจากอัลจิเนต

นำเม็ดอัลจิเนตแห้งวัดการปลดปล่อยตามวิธีการของ He et al. (2015) ดังนี้ นำเม็ดอัลจิเนต 0.1 ก. แช่ใน 0.85% (w/v) NaCl ปริมาตร 10 มล. บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 2 ชม. แบ่งสารละลายปริมาตร 0.1 มล. เพื่อหาปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตด้วย total plate count (T_0) คำนวณปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g) วัดปริมาณแบคทีเรียที่ปลดปล่อยออกมาทุก 1, 2, 3, 5, 10 และ 15 วัน

ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการตรึงแบคทีเรีย

นำสารละลายแบคทีเรียตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 ความเข้มข้น คือ 1% (w/v) และ 2% (w/v) บ่มในอาหาร NB เป็นเวลา 4 ชม. เมื่อครบเวลาแยกเม็ดอัลจิเนตออกจากอาหาร NB และล้างด้วย 0.85% NaCl นำเม็ดอัลจิเนตที่ได้เก็บข้อมูลน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง วัดขนาดเม็ดอัลจิเนตแบบสด แบบแห้ง และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการตรึงแบคทีเรีย

ชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการตรึงแบคทีเรียด้วยอัลจิเนต

ตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น นำเม็ดอัลจิเนตที่ผ่านการตรึงบ่มในอาหาร 3 ชนิด ดังนี้ NB, Trypticase soy broth (TSB) และ Tryptone yeast extract glucose (TYG) เป็นเวลา 4 ชม. เมื่อครบเวลาแยกเม็ดอัลจิเนตออกจากอาหาร ล้างด้วย 0.85% (w/v) NaCl นำเม็ดอัลจิเนตที่ได้เก็บข้อมูลน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง วัดขนาดเม็ดอัลจิเนตแบบสด แบบแห้ง คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการตรึงแบคทีเรียและการปลดปล่อยแบคทีเรียจากอัลจิเนต

การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยใช้ T-Test และวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการศึกษา

ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเม็ดอัลจิเนต

ตรึงแบคทีเรียด้วยสารละลายอัลจิเนตความเข้มข้น 2% (w/v) และบ่มในอาหาร NB 3 ช่วงเวลาพบว่า การบ่มเม็ดอัลจิเนตเป็นเวลา 18 ชม. อัลจิเนตไม่สามารถคงรูปเป็นเม็ดได้หลังการอบแห้งและ

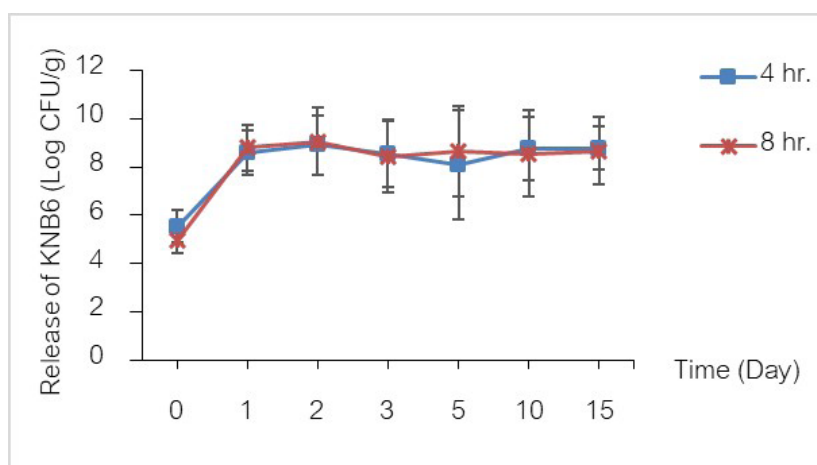
Table 1 Characteristics of *Bacillus aryabhatai* KNB6 capsules and encapsulation efficiency.

Time	Alginate (%)	Wet size (mm.)	Dry size (mm.)	Wet Viability log (CFU/g)	Dry Viability log (CFU/g)	Encapsulation efficiency (%)
4 hr.	2	0.85 ± 0.10	0.53 ± 0.07	5.93 ± 0.70	7.93 ± 0.73	86.47 ± 16.88 ^b
8 hr.	2	1.29 ± 0.14	0.10 ± 0.06	5.78 ± 0.65	6.89 ± 1.12	96.68 ± 0.86 ^a
P<0.05		ns	ns	ns	ns	*

* Statistically significant at P<0.05. ns; not Statistically significant at P<0.05.

เม็ดเจลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ส่วนการบ่มเม็ด อัลจิเนตเป็นเวลา 4 ชม. และ 8 ชม. อัลจิเนตเกิดการคงรูปเป็นเม็ดได้ดีและเม็ดคงสภาพเดิมภายหลังการอบแห้ง ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงปรับช่วงเวลาในการศึกษาการบ่มในอาหารเป็น 2 ช่วงเวลา คือ 4 ชม. และ 8 ชม. พบว่า การบ่มเม็ดอัลจิเนต 4 ชม. ให้ค่าเฉลี่ยของขนาดเม็ดสกลเล็กที่สุดเท่ากับ 0.85 ± 0.10 มม. และการบ่มที่ 8 ชม. ให้ค่าเฉลี่ยของขนาดเม็ดแห้งอยู่ที่ 0.10 ± 0.06 มม. ตามลำดับ เมื่อพิจารณาขนาดเม็ดอัลจิเนตแบบสดทั้ง 2 ช่วงเวลา พบว่า เม็ดอัลจิเนตที่บ่ม 4 ชม. จะมีขนาดเล็กกว่าเม็ดอัลจิเนตที่บ่ม 8 ชม. ทั้งนี้เพราะเม็ดอัลจิเนตที่บ่ม 8 ชม. มีการดูดซับน้ำมากกว่าการบ่มที่ 4 ชม. อย่างไรก็ตามขนาดของเม็ด อัลจิเนตแบบแห้งบ่มที่ 4 ชม. มีขนาดใหญ่กว่าการบ่มที่ 8 ชม. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 1)

จากการวิเคราะห์ระยะเวลาในการบ่มต่อความมีชีวิตของแบคทีเรียภายในเม็ดอัลจิเนตสดและแห้งพบว่า เม็ดอัลจิเนตบ่มที่ 4 ชม. แบคทีเรียยังคงความมีชีวิตอยู่ภายในเม็ดสดภายหลังการตรึงและเม็ดแห้งภายหลังการอบแห้งได้ดีกว่าการบ่มที่ 8 ชม. โดยให้ค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับ 5.93 ± 0.70 CFU/g, 7.93 ± 0.73 CFU/g ตามลำดับ และจะเห็นได้ว่าการบ่มเม็ดอัลจิเนตในอาหาร NB ทั้ง 2 ช่วงเวลา สามารถคงความมีชีวิตและจำนวนแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตแบบสดและแบบแห้งได้ดี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 1) และจากการวิเคราะห์ระยะเวลาในการบ่มต่อประสิทธิภาพการตรึงแบคทีเรีย พบว่า การบ่มเม็ดอัลจิเนตที่ 8 ชม. ให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงแบคทีเรียสูงกว่าการบ่มที่ 4 ชม. โดยให้ค่าการตรึงอยู่ที่ $96.68 \pm 0.86\%$ และ $86.47 \pm 16.88\%$ ตาม

**Figure 1** Releasing of *Bacillus aryabhatai* KNB6 from alginate capsules after incubating at 4 and 8 hr.

ลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) วิเคราะห์ระยะเวลาในการบ่มต่อการปลดปล่อยแบคทีเรียระยะ 15 วัน พบว่า การบ่มเม็ดอัลจิเนตที่ 4 ชม. และ 8 ชม. ให้ค่าการปลดปล่อยแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน (Figure 1) จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติข้างต้น พบว่าการบ่มเม็ดอัลจิเนตทั้ง 2 ช่วงเวลา คือ 4 ชม. และ 8 ชม. ให้ค่าผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นทางผู้วิจัยจึง

เลือกใช้การบ่มเม็ดอัลจิเนตที่ 4 ชม. เพื่อใช้ในการศึกษาระดับความเข้มข้นของอัลจิเนต และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย

ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการตรึงแบคทีเรีย

เมื่อนำสารละลายแบคทีเรียตรึงด้วย

Table 2 Characteristics of *Bacillus aryabhatai* KNB6 capsules prepared on various NaAlg concentration.

Alginate (%)	Medium	Wet size (mm.)	Dry size (mm.)	Encapsulation efficiency (%)
1	NB	1.09 ± 0.08	0.78 ± 0.08	38.83 ± 29.97
2	NB	0.85 ± 0.10	0.53 ± 0.07	86.47 ± 16.88
$P > 0.05$	ns	ns	ns	ns

* Statistically significant at $P < 0.05$. ns; not Statistically significant at $P < 0.05$.

สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 ความเข้มข้น พบว่าขนาดของเม็ดอัลจิเนตที่ตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1% (w/v) และ 2% (w/v) ทั้งแบบสดและแห้งให้ค่าเฉลี่ยขนาดเม็ดอัลจิเนตอยู่ที่ 1.09 ± 0.08 , 0.78 ± 0.08 , 0.85 ± 0.10 และ 0.53 ± 0.07 มม. ตามลำดับ เห็นได้ว่าการตรึงเซลล์ด้วย 2% (w/v) โซเดียมอัลจิเนตให้ขนาดเม็ดอัลจิเนตทั้งแบบสดและแห้งเล็กกว่าการตรึงด้วย 1% (w/v) โซเดียมอัลจิเนต เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตต่อประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์ พบว่าการตรึงเซลล์ด้วย 2% (w/v) โซเดียมอัลจิเนต ให้ค่าประสิทธิภาพในการตรึงสูงกว่าการตรึงเซลล์ด้วย 1% (w/v) โซเดียมอัลจิเนต เท่ากับ $86.47 \pm 16.88\%$ (Table 2)

ชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการตรึงแบคทีเรียด้วยอัลจิเนต

ตรึงสารละลายแบคทีเรียด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% (w/v) และนำไปบ่มในอาหาร 3 ชนิด เพื่อทดสอบอาหารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย พบว่าขนาดของเม็ดอัลจิ

เนตที่บ่มด้วยอาหารทั้ง 3 ชนิด คือ NB, TSB และ TYG มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเม็ดอัลจิเนตที่บ่มในอาหาร NB จะให้ขนาดของเม็ดอัลจิเนตแบบสดและแห้งเล็กกว่าเม็ดอัลจิเนตที่บ่มในอาหาร TSB และ TYG โดยให้ค่าเฉลี่ยของขนาดเม็ดอัลจิเนตเท่ากับ 0.85 ± 0.10 และ 0.53 ± 0.07 มม. ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียที่บ่มในอาหาร 3 ชนิด พบว่า การบ่มในอาหาร NB แบคทีเรียยังคงความมีชีวิตอยู่ภายในเม็ดแห้งหลังการอบได้ดีกว่าการบ่มในอาหาร TSB และ TYG โดยให้ค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับ 7.93 ± 0.42 CFU/g ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) และเมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่า อาหาร TYG ให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงเซลล์สูงที่สุดถึง $99.93 \pm 0.05\%$ รองลงมาคืออาหาร TSB และ NB ให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงเท่ากับ $99.67 \pm 0.10\%$ และ $86.47 \pm 16.88\%$ ซึ่งจะเห็นว่าการใช้อาหาร NB ให้ค่าประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์ได้น้อยกว่าอาหารชนิดอื่น ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3) อย่างไรก็ตาม

Table 3 Characteristics of *Bacillus aryabhattai* KNB6 capsules prepared on various media.

Alginate (%)	Medium	Wet size (mm.)	Dry size (mm.)	Dry Viability log (CFU/g)	Encapsulation efficiency (%)
2	NB	0.85 ± 0.10 ^c	0.53 ± 0.07 ^c	7.93 ± 0.42	86.47 ± 16.88
2	TSB	1.10 ± 0.08 ^a	0.57 ± 0.05 ^b	6.70 ± 0.55	99.67 ± 0.10
2	TYG	0.95 ± 0.07 ^b	0.60 ± 0.00 ^a	6.75 ± 0.12	99.93 ± 0.05
P>0.05		*	*	ns	ns

* Statistically significant at P<0.05. ns; not Statistically significant at P<0.05.

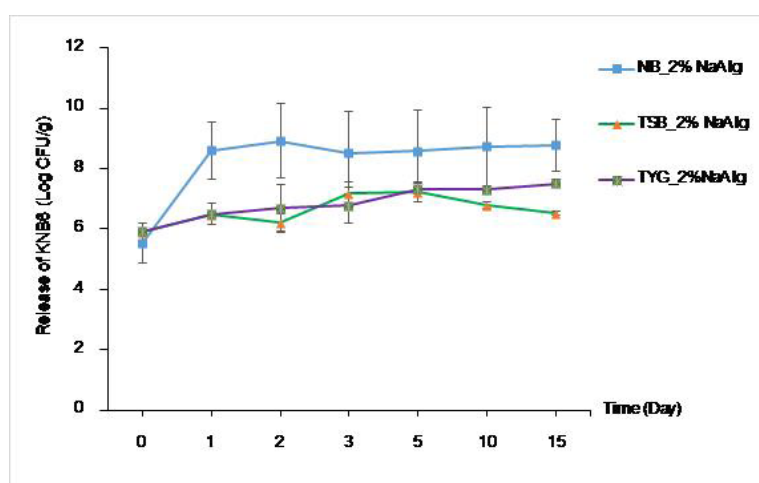


Figure 2 Releasing of *Bacillus aryabhattai* KNB6 from alginate capsules after cultivating on various media (NB, TSB, TYG).

เมื่อวิเคราะห์ชนิดของอาหารต่อการปลดปล่อยแบคทีเรียพบว่า อาหาร NB ให้ค่าการปลดปล่อยแบคทีเรียอย่างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลา 15 วัน โดยจะพบว่าในช่วงวันที่ 1, 10 และวันที่ 15 แบคทีเรียที่บ่มในอาหาร NB จะมีการปลดปล่อยออกมาได้มากกว่าอาหาร TSB และ TYG ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Figure 2)

วิจารณ์

จากการสร้างแบคทีเรีย *Bacillus aryabhattai* KNB6 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% (w/v) และบ่มในอาหารด้วยช่วงเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า การบ่มเม็ดอัลจิเนตเป็นเวลา 18 ชม. ทำให้เม็ดอัลจิเนต

ไม่สามารถคงรูปได้ภายหลังการอบแห้ง เนื่องจาก การบ่มเม็ดอัลจิเนตในอาหารเหลวเป็นเวลานาน ทำให้น้ำซึมผ่านเข้าเม็ดอัลจิเนตมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อความเข้มข้นของอัลจิเนตภายในเม็ดลดลง และด้วยปริมาณน้ำที่มากขึ้นทำให้ต้องเพิ่มระยะเวลาในการอบแห้งนานขึ้น ปัจจัยดังกล่าวส่งผลต่อการคงรูปของเม็ดอัลจิเนตภายหลังการอบแห้ง ส่วนขนาดของเม็ดอัลจิเนตแห้งบ่มที่ 4 ชม. มีขนาดของเม็ดอัลจิเนตแห้งใหญ่กว่าการบ่มที่ 8 ชม. อาจเนื่องจากการบ่มนาน 8 ชม. ต้องใช้เวลาในการอบแห้งนานกว่าจึงส่งผลต่อขนาดของเม็ดภายหลังการอบแห้ง อย่างไรก็ตาม พบว่าการบ่มเม็ดเจลในอาหาร NB ภายหลังการตรึงแบคทีเรียก่อนการทำแห้ง สามารถรักษาความมีชีวิตและจำนวนเซลล์แบคทีเรียภายใน

เมล็ดอัลจินต์ได้ดีกว่าการไม่บ่มเลี้ยงเมล็ดอัลจินต์ในอาหาร จากการเปรียบเทียบการปลดปล่อยแบคทีเรียกับระยะเวลาในการบ่ม พบว่า การบ่มทั้ง 2 ช่วงเวลาให้ค่าการปลดปล่อยแบคทีเรียที่ไม่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงแนะนำการบ่มที่ 4 ชม. เพื่อประหยัดเวลา

จากการตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจินต์ความเข้มข้น 1% (w/v) และ 2% (w/v) พบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินต์มีผลต่อารคงรูปของเมล็ดอัลจินต์และค่าประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ โดยเมล็ดอัลจินต์ที่ตรึงด้วย 1% (w/v) จะมีลักษณะแบน ไม่เป็นทรงกลมและให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ต่ำ ทั้งนี้เพราะสารละลายโซเดียมอัลจินต์มีความหนืดต่ำ ทำให้เมล็ดอัลจินต์ไม่คงรูป (He et al., 2015) ในขณะที่เมล็ดอัลจินต์ที่ตรึงด้วยโซเดียมอัลจินต์ความเข้มข้น 2% (w/v) มีลักษณะเป็นทรงกลมและให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงแบคทีเรียที่สูงกว่า

จากการนำเมล็ดอัลจินต์ไปบ่มในอาหาร 3 ชนิด พบว่า การบ่มในอาหาร TYG ให้ค่าประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์สูงกว่าอาหาร NB และ TSB ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานของ Bashan et al. (2002) ตรึงแบคทีเรีย PGPR *Azospirillum brasilense* ด้วยโซเดียมอัลจินต์ความเข้มข้น 2% (w/v) และนำไปบ่มในอาหาร 4 ชนิด พบว่า อาหาร TYG ให้ค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียสูงกว่าอาหาร NB อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าอาหาร NB ให้การปลดปล่อยแบคทีเรียดีกว่าอาหาร TYG และ TSB นอกจากนี้ NB มีส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ซับซ้อนเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น จึงมีความเหมาะสมในการใช้เตรียมเมล็ดอัลจินต์ตรึงแบคทีเรียในเชิงอุตสาหกรรม

การตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจินต์ให้ได้เมล็ดอัลจินต์ขนาดเล็กในระดับไมโครอัลจินต์ โดยมีขนาดเท่ากับ 0.05-0.20 มม. เป็นขนาดที่เหมาะสมต่อการแพร่กระจายของออกซิเจน สารอาหาร และสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ได้ดีซึ่งช่วยเพิ่มความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกตรึง ในขณะที่เซลล์ที่ตรึงในเม็ดเจลขนาดใหญ่จะมีปริมาณเซลล์และความมีชีวิตต่ำกว่า นอกจากนี้หากขนาดของเมล็ดอัลจินต์มีลักษณะเล็กคล้ายผงแป้ง จะทำให้สามารถประยุกต์ใช้งานได้

ง่ายขึ้น เช่น สามารถนำมาเคลือบกับเมล็ดหรือใช้ในการฉีดพ่นใบ ทำให้สะดวกแก่การใช้งานของเกษตรกรในการหว่านปลูก และลดค่าใช้จ่ายในการดูแลแปลง (Bashan et al., 2002) จากการตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจินต์ความเข้มข้น 2% (w/v) พบว่าขนาดเมล็ดอัลจินต์มีขนาดประมาณ 0.5 มม. ซึ่งเป็นขนาดเม็ดที่ใหญ่กว่าขนาดของไมโครอัลจินต์ ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษาวิธีการตรึงเซลล์ให้ได้ขนาดเม็ดในระดับไมโครอัลจินต์ต่อไป

สรุป

การตรึงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยโซเดียมอัลจินต์ ความเข้มข้น 2% (w/v) บ่มเลี้ยงเมล็ดอัลจินต์เป็นเวลา 4 ชม. และ 8 ชม. สามารถคงรูปของเม็ดไมโครอัลจินต์ได้ดีและให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงเซลล์สูง อาหาร NB เป็นอาหารที่เหมาะสมในการใช้ตรึงเซลล์และบ่มเลี้ยงเมล็ดอัลจินต์หลังการตรึง โดยให้ค่าความมีชีวิตและการปลดปล่อยแบคทีเรียออกจากเมล็ดอัลจินต์ได้ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- วรรณทกัญจน์ เอียดเหตุ, ธาวิตา ปิ่นสุข, ภาณินี จรุงกัทธิวิมล, สุรพล รัฐธนากุล, สุชาติ เขิงทอง และดวงแขทิศา กาญจน
โสภา. (2559). การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินและประเมินการผลิตสารกระตุ้นการเติบโตของพืช. หน้า 369-379. ใน: การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 40 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ 20-21 ตุลาคม 2559.
- Bashan, Y., L.E. de-Bashan, S.R. Prabhu, and J.P. Hernandez. (2014). Advance in plant growth-promoting bacterial inoculants technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*. 378: 1-33.

- Bashan, Y., J.P. Hernandez, L. A. Leyva, and M. Bacillio. (2002) Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils*. 35: 359-368.
- He, Y., Z. Wu, L. Tu, Y. Han, G. Zhang, and C. Li. (2015) Encapsulation and characterization of slow release microbial fertilizer from composites of bentonite and alginate. *Appl. Clay Sci*. 109-110: 68-75.
- Kloepper, J.W., R. Lifshitz, and R.M. Zablotowicz. (1989). Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*. 7: 39-44.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plants Soil* 255: 571-586.