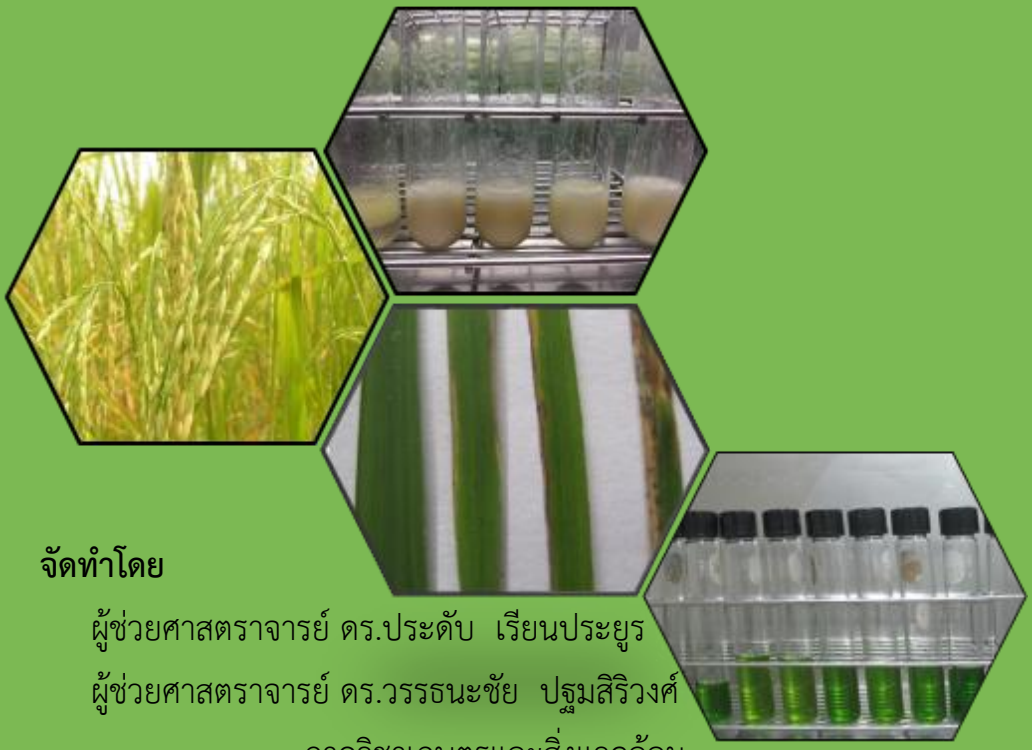
คู่มือ
การผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพสำหรับการเกษตร



จัดทำโดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประดับ เรียนประยูร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรธนะชัย ปฐมสิริวงศ์

ภาควิชาเกษตรและสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย

โครงการจัดการความรู้การวิจัยเพื่อการใช้ประโยชน์เชิงชุมชน สังคม

จาก สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2562

คู่มือการผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพสำหรับการเกษตร

ประดับ เรียนประยูร วรรธนะชัย ปฐมสิริวงศ์

ข้อมูลทางบรรณานุกรมของหอสมุดแห่งชาติ
National Library of Thailand Cataloging in Publication Data

ประดับ เรียนประยูร.

คู่มือการผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพสำหรับการเกษตร.-- สุรินทร์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์, 2563.

40 หน้า.

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ. 2. ข้าว. 3. การต้านทานโรค. I. วรรธนะชัย ปฐมสิริวงศ์, ผู้แต่งร่วม. II. ประดับ เรียนประยูร, ผู้วาดภาพประกอบ. III. ชื่อเรื่อง.

630

ISBN 978-974-448-679-0

พิมพ์ครั้งที่ 1	เมษายน 2563
จำนวนพิมพ์	300 เล่ม
จัดพิมพ์โดย	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ 186 ม. 1 ต. นอกเมือง อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000

คู่มือ
การผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพสำหรับการเกษตร

เผยแพร่โดยโครงการ
“การผลิตและการจัดการความรู้ของสารจับใบพืชทางชีวภาพ
ในทางปฏิบัติทางที่ดีสำหรับการเกษตรแบบอินทรีย์
ของจังหวัดสุรินทร์”

ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ
(วช.)

จัดทำโดย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประดับ เรียนประยูร
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรธนะชัย ปฐมสิริวงศ์

ภาควิชาเกษตรและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์

ISBN 978-974-448-679-0

กิตติกรรมประกาศ

คู่มือฉบับนี้เป็นเอกสารประกอบการเผยแพร่ความรู้ในการผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ เพื่อนำมาใช้ในการเกษตร ภายใต้โครงการ “การผลิตและการจัดการความรู้ของสารจับใบพืชทางชีวภาพในทางปฏิบัติทางที่ดีสำหรับการเกษตรแบบอินทรีย์ของจังหวัดสุรินทร์” ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2562

คำนำ

คู่มือ “การผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพสำหรับการเกษตร” เล่มนี้ที่ได้จัดทำขึ้นเพื่อเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ในการจัดการการเกษตร เพื่อลดการใช้สารเคมีและส่งเสริมให้เกษตรกรใช้องค์ความรู้เพื่อจัดการปัญหาทางการเกษตรอินทรีย์ โดยเนื้อหาของคู่มือเล่มนี้ประกอบด้วย ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสารจับใบพืชทางชีวภาพ คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารจับใบพืช การใช้สารจับใบพืชทางชีวภาพ กรรมวิธีการผลิต การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ การขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ การนำหัวเชื้อจุลินทรีย์มาขยายต่อ ตลอดจนการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพไปใช้ให้เกิดประสิทธิผลได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม เพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร และลดต้นทุนปัจจัยในการผลิต ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีความปลอดภัย เกษตรกรมีคุณภาพชีวิตที่ดี อันจะนำมาสู่ความยั่งยืนของเกษตรอินทรีย์

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ		(ก)
คำนำ		(ค)
สารบัญ		(จ)
บทที่ 1	สารจับใบพืชทางชีวภาพเพื่อการเกษตร	1
บทที่ 2	การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ	13
บทที่ 3	การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ	19
บทที่ 4	การขยายเชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ	29
บทที่ 5	การติดตั้งถังผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ	31
บทที่ 6	วิธีการใช้ผลิตภัณฑ์สารจับใบพืชทางชีวภาพ	33
เอกสารอ้างอิง		35

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการใช้ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสำหรับการเกษตรในด้านต่างๆ	2
2	แสดงกลไกการชักนำให้เกิดระบบต้านทานโรคสำหรับเชื้อราไตรโคเดอร์มา	7
3	แสดงการต้านทานโรคของข้าวที่ใช้สารจับใบพืชทางชีวภาพ การเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลด์และปากใบข้าว	8
4	แสดงวัสดุและอุปกรณ์เบื้องต้นที่ใช้ในการแยกเชื้อ	14
5	แสดงเชื้อที่คัดแยกเบื้องต้นจากดินในพื้นที่การเกษตร	16
6	แสดงการคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเบื้องต้นบนอาหาร CTAB	18
7	แสดงขวดเพาะเลี้ยงหัวเชื้อและอุปกรณ์กรองเชื้อจุลินทรีย์	20
8	แสดงชุดอุปกรณ์สำหรับขวดเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ	21
9	แสดงการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดยการเกิดอิมัลชั่นเพื่อนำมาผลิตเป็นสารจับใบพืชที่ระยะเวลาแตกต่างกัน	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

10 แสดงการวัดการเกิดอิมัลชั่นของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ 25

11 แสดงการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดยวัดค่าการกระจายของน้ำมัน 27

12 แสดงชุดอุปกรณ์สำหรับผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ 31

สารบัญตาราง

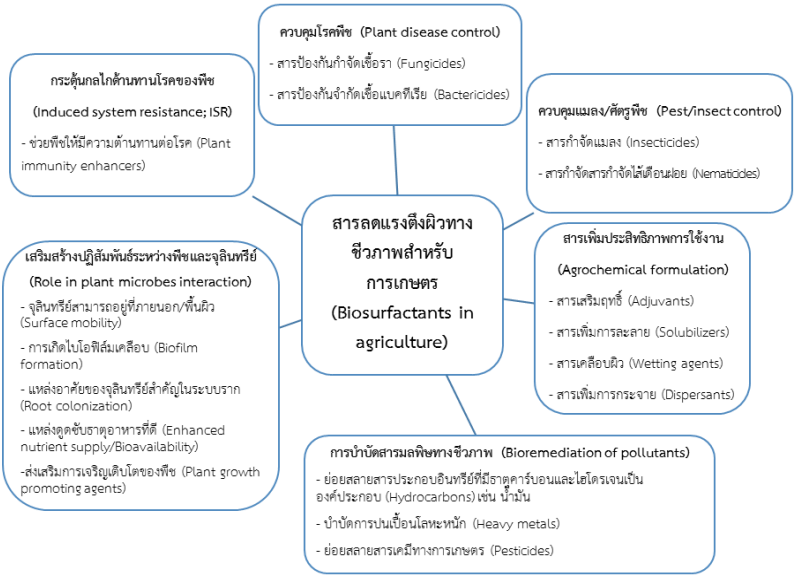
ตารางที่		หน้า
1	แสดงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ	12

บทที่ 1 สารจับใบพืชทางชีวภาพเพื่อการเกษตร

การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อการเกษตร

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) คือ สารประกอบที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบแอมฟิฟาติก (Amphipatic molecules) คือมีส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (Hydrophilic and hydrophobic moieties) จึงมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวทั้งระหว่างน้ำ/อากาศ หรือน้ำ/น้ำมัน ด้วยคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จึงได้ถูกนำมาใช้ในการเกษตร ประกอบกับเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ย่อยสลายง่าย ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง ความแตกต่างของโครงสร้างทางกายภาพเคมีที่ประกอบด้วย Glycolipids, Lipopeptides, Neutral lipids, Phospholipids, Fatty acids, และ Polymeric compounds ทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น เป็นสารชำระล้าง (Detergent) สารทำเกิดการแตกตัวหรืออิมัลชั่น (Emulsification) การเกิดฟอง (Foaming) การกระจาย (Dispersion) การเกิดสภาวะเปียกหรือหยดน้ำ (Wetting) การซึมผ่านได้ง่าย (Penetrating) การเคลือบคลุมพื้นผิว (Thickening) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

(Microbial growth enhancement) ต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรค (Antimicrobial agents) เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโลหะ (Metal sequestering) และการกำจัดน้ำมัน (Enhanced oil recovery) โดยเฉพาะด้านการเกษตร ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย เช่น ใช้ควบคุมโรคพืช ควบคุมแมลงและศัตรู สารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทางการเกษตร ย่อยสลายสารมลพิษทางการเกษตร ส่งเสริมให้เกิดการทำงานที่มีประสิทธิภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ และชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันที่ดีในพืช ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการใช้ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสำหรับการเกษตรในด้านต่างๆ

1. การใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อควบคุมโรคพืช

การใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย พบว่าควรมีความเข้มเข้นอยู่ที่ 1×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และมีระยะเวลาที่สามารถควบคุมโรค จำนวน 21 วันหลังฉีดพ่นทางใบ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สามารถควบคุมโรคต่างๆ จากเชื้อราทั้ง 18 ชนิด อันเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ ได้แก่ *Alternaria tomatophilia, A. solani, A. alternata, Aspergillus niger, Aureobasidium pullulans, Botrytis cinerea, Chaetomium globosum, Fusarium asiaticum, F. austroamericana, F. cerealis, F. graminearum, F. oxysporum, Penicillium chrysogenum, P. digitatum, P. funiculosum, Phytophthora infestans, P. capsici,* และ *Ustilago maydis* และควบคุมแบคทีเรียก่อโรคพืช จำนวน 7 ชนิด ประกอบด้วย *Acidovorax carotovorum, Erwinia amylovora, Pseudomonas cichorii, P. syringae, Pectobacterium carotovorum, Ralstonia solanacearum,* และ *Xanthomonas campestris* สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant) มีกลไกในการต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรคพืชโดยคุณสมบัติที่สามารถจับติดกับพื้นผิวได้เป็นอย่างดี ซึ่งส่งผลให้เมื่อเคลือบโครงสร้างภายนอกของพืชแล้วจุลินทรีย์ต่างๆ ไม่สามารถได้รับสารอาหารจากพืช ประกอบกับเซลล์เมเบรนหรือ

เยื่อหุ้มเซลล์พืชมีความแข็งแรงช่วยขัดขวางเชื้อราบางชนิดในการแทงเข้าสู่เซลล์พืช ขณะที่เซลล์มีโครงสร้างที่ใหญ่มากขึ้นเมื่อพืชได้รับกรดไขมันต่างๆ (Fatty acid components) ที่ได้จากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ และเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์พืชมีขนาดใหญ่ที่แข็งแรง โครงสร้างภายในเซลล์ต่างๆ จึงอยู่ห่างจากผนังเซลล์ซึ่งยากต่อการเข้าทำลายจากจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนั้นยังพบว่าพืชสามารถต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรคได้จากการที่สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพนี้ช่วยเพิ่มความสามารถในการนำไฟฟ้าและประสิทธิภาพของการเลือกผ่านสารเข้าออกนอกเซลล์ได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพมากขึ้นของเยื่อหุ้มเซลล์พืชและชั้นฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant) จึงได้ถูกนำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช (Biopesticide) อย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆ เพื่อกำจัดโรคระบาด ได้แก่ โรคไหม้ โรคจากเชื้อราสีเทา (Botrytis) โรคผลเน่าในส้ม (Sour rot) โรคราสนิม โรคเน่าและเสียจากเชื้อรา *Sclerotinia* โรคราแป้ง โรคแผลจุด และโรคราขาว เป็นต้น

2. การใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชนั้นโดยทั่วไปมีการใช้ใน 2 รูปแบบ คือ การใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวร่วมกับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

ที่ผลิตได้ทั้งแบบบริสุทธิ์และไม่บริสุทธิ์ และใช้เฉพาะสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ปราศจากจุลินทรีย์ ซึ่งการใช้ทั้งจุลินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพร่วมกันนั้นสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยทางตรงและทางอ้อม คือจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตปกคลุมบนผิวพืชเพื่อป้องกันโรคที่ต่อเนื่องและนาวนานขึ้นได้เป็นอย่างดี ส่วนการใช้แบบบริสุทธิ์หรือเฉพาะสารลดแรงตึงผิวที่ผ่านกระบวนการสกัดแล้วจะควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยทางตรงในช่วงระยะเวลาที่จำเพาะเจาะจง ทั้งนี้เป็นประโยชน์ทั้งสองแบบขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งานเป็นหลัก สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชต่างๆ ได้อาทิเช่น เพลี้ย เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว แมลงวันบ้าน หนอนตัวกลม หอย อะมีบาและปรสิต เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพตั้งแต่ 0.0075 - 5%

3. สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อประโยชน์ในการกระตุ้นกลไกต้านทานโรคของพืช

นอกจากคุณสมบัติต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรคพืชแล้ว ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพยังสามารถชักนำระบบการต้านทานในพืช (Induced Systemic resistance; ISR) เกิดการกระตุ้นระดับยีนหรือหน่วยที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมป้องกันศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องต่างๆ อาทิเช่น ROS, SOD, Oxylipins,

Phytoalexins และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ PR-proteins เป็นต้น สารจับใบพืชทางชีวภาพมีโครงสร้างที่แตกต่างกันและส่งผลต่อการกระตุ้นกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันของพืชแต่ละชนิดที่แตกต่างกันด้วยเช่นกัน โดย Cyclic lipopeptide (CLP) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* นั้นพบว่า ประกอบด้วยคุณสมบัติที่กระตุ้นระบบการต้านทานโรคของพืช ส่วนเชื้อรา พบว่า *Tichoderma* โดยเฉพาะสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีไฮโดรโฟบิน (Hydrophobin) สามารถเหนี่ยวนำกลไกการต้านทานโรคพืชได้อย่างหลากหลาย ทั้งโดยความต้านทานแบบทันทีที่เชื้อสัมผัสพืช (Hypersensitive response) ความต้านทานที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นโดยการครอบครองของจุลินทรีย์ (Induced systemic resistance; ISR) และความต้านทานที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างหลังจากได้รับเชื้อก่อโรคพืชแล้ว (Systemic acquired resistance (SAR) ดังภาพที่ 2-3

เหนี่ยวนำระบบการต้านทานโรคพืช

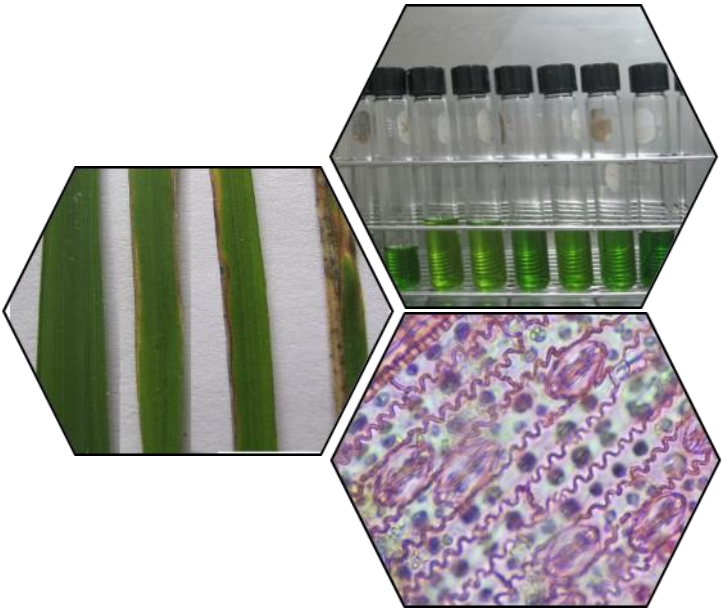
(Reduced Systemic Resistance; ISR)

- สารประกอบฟีนอล และไฟโตอเล็กซิน สามารถยับยั้งเชื้อโรค และทำให้ข้าวทนต่อความไม่เหมาะสมของสภาพแวดล้อมได้อย่างดี
- พีอาร์โปรตีน ช่วยต้านทานการจู่โจมของโรคในระดับเซลล์ภายในพืช
- เอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคและเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตพืช/ฮอร์โมนพืช

ส่งสัญญาณการผลิตสารเคมีต่างๆ ที่มีความจำเป็นต่อการป้องกันโรค

ข้าวติดเชื้อจากโรคต่างๆ ได้ง่ายและไม่มีการเหนี่ยวนำระบบต้านทานโรค จึงได้รับความเสียหายและเกิดโรคในระดับรุนแรง ประกอบกับไม่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ ต้นข้าวจึงไม่แข็งแรง ไม่ออกรวงหรือผลผลิตต่ำและตายได้

ภาพที่ 2 แสดงกลไกการชักนำให้เกิดระบบต้านทานโรคสำหรับเชื้อราไตรโคเดอร์มา



ภาพที่ 3 แสดงการต้านทานโรคของข้าวที่ใช้สารจับใบพืชทางชีวภาพ การเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลด์ และปากใบข้าว

3. สารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทางการเกษตร

ในปัจจุบันนี้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมของสารเคมีทางการเกษตรเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพจำนวนหลายรูปแบบ เช่น อิมัลซิฟิเคชั่น (Emulsification) คือ เพื่อให้ส่วนผสมของน้ำและน้ำมันรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันไม่แยกชั้น สารที่ทำให้เกิดฟองนุ่มหรือโฟม (Foaming) สารช่วยให้เกิดการ

แพร่กระจายได้ดีขึ้น (Dispersion) สารเคลือบผิวพืช (Wetting) สารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแทรกซึมสู่เซลล์ (Penetrating) และช่วยเพิ่มความแข็งแรงหรือความหนาของใบพืช (Thickening) เป็นต้น โดยเฉพาะสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง หรือมีดัชนีการเกิดอิมัลชั่น (Emulsification index) 90% สามารถนำมาใช้เป็นสารเพิ่มการละลายหรือตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นยังถูกนำมาใช้เพื่อเป็นสารเสริมฤทธิ์ทางการเกษตร (Adjuvant) ร่วมกับสารกำจัดเชื้อรา ซึ่งมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น 53% ส่วนสารกำจัดวัชพืชนั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ประมาณ 20% และเป็นที่ยอมรับแล้วว่าสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถเพิ่มระยะเวลาการคงอยู่ของสารกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตรบนผิวใบพืชได้ยาวนาน และช่วยป้องกันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือมีการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อกำจัดสารตกค้างของสารเคมีทางการเกษตรที่อยู่ในผักและผลไม้ โดยสามารถลดสารเคมีกลุ่มไซเพอร์เมทริน (Cypermethrin) จากความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เหลือเพียง 2 พีพีเอ็มในระยะเวลา 5 นาทีของการแช่ในสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม

4. การใช้ประโยชน์สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อการปรับปรุงดินทางการเกษตร

ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในการใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพกำจัดสารเคมีทางการเกษตรสำหรับผักและผลไม้ และด้วยคุณสมบัติต่างๆ อาทิเช่น สามารถทำละลาย สารเพิ่มการกระจายตัว สามารถทำการชำระล้าง เกิดอิมัลชั่นของน้ำและน้ำมัน จึงสามารถนำมาใช้เพื่อการบำบัดมลพิษทางดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมัน โลหะหนักและสารเคมีทางการเกษตรต่างๆ นอกจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจะช่วยย่อยสลายสารมลพิษให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยแล้วยังสามารถปรับปรุงคุณภาพของดินให้เหมาะสมต่อสิ่งมีชีวิตในดินด้วย สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์จะสามารถเข้าสู่อนุภาคดินขนาดเล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงช่วยให้เกิดการย่อยสลายมลพิษทางดินร่วมกับพืชได้ด้วยเช่นกัน (Phytoremediation)

5. บทบาทของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในการเสริมสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และพืช

บทบาทสำคัญของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีต่อความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และพืชนั้น เช่น เกิดการเคลื่อนที่ การส่งสัญญาณ หรือเกิดการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งพบได้ในพืช

บริเวณรากและใบซึ่งเป็นที่อาศัยของจุลินทรีย์ จึงทำให้พืชได้รับธาตุอาหารและนำส่งสารอาหารสู่ส่วนต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์และพืชนั้นอาจเป็นในลักษณะโดยทางตรงและโดยทางอ้อมซึ่งมีกลไกที่หลากหลาย เช่น ผลิตกรดอินโดลอะซิติก (Indole acetic acid) ไซโตไคนิน (Cytokinins) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืช เอนไซม์ ACC Deaminase (1-Aminocyclopropane -1- Carboxylate Deaminase) นอกจากนั้นยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant production) จัดเป็นสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรค พืชด้วยเช่นกัน

ประเภทของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อการใช้ประโยชน์ทางการเกษตร

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอย่างแพร่หลาย ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์จำนวนมากและมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน โดยพบว่ามีทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ในปัจจุบันมีการจัดกลุ่มสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพตามกลุ่มต่างๆ ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง
Glycolipid	*Pseudomonas aeruginosa*
	Rhodococcus erithropolis
	Candida bombicola
Hydrophobins	*Trichoderma reesei*
	Schizophyllum commune
Liposaccharides	*Acinetobacter radioresistens*
	Acinetobacter calcoaceticus
Lipopeptides	*Bacillus subtilis*
	Bacillus subtilis
	Pseudomonas fluorescens
Phospholipids	*Corynebacterium lepus*
Particulate	*Acinetobacter calcoaceticus*
	Cyanobacteria

บทที่ 2 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพนั้นต้องนำเชื้อจากพื้นที่หรือแหล่งของเชื้อที่จะนำไปใช้ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงของการใช้งาน และเนื่องจากในสภาพแวดล้อมโดยทั่วไปประกอบด้วยจุลินทรีย์จำนวนมาก ดังนั้นการคัดแยกจุลินทรีย์จึงเป็นการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยมีวิธีการและอุปกรณ์ดังนี้

2.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในดิน

1. วัสดุและอุปกรณ์แยกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารจับใบพืช

1. แหล่งดินที่มีเชื้อจุลินทรีย์
2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแข็ง PDA และ NA
3. ตู้เขี่ยเชื้อ
4. จานเพาะเชื้อ
5. เข็มเขี่ยเชื้อ

6. สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. แอลกอฮอล์เข้มข้น 70%
9. หลอดทดลอง
10. ปิเปต
11. แท่งแก้วเขี่ยเชื้อ

ภาพที่ 4 แสดงวัสดุและอุปกรณ์เบื้องต้นที่ใช้ในการแยกเชื้อ

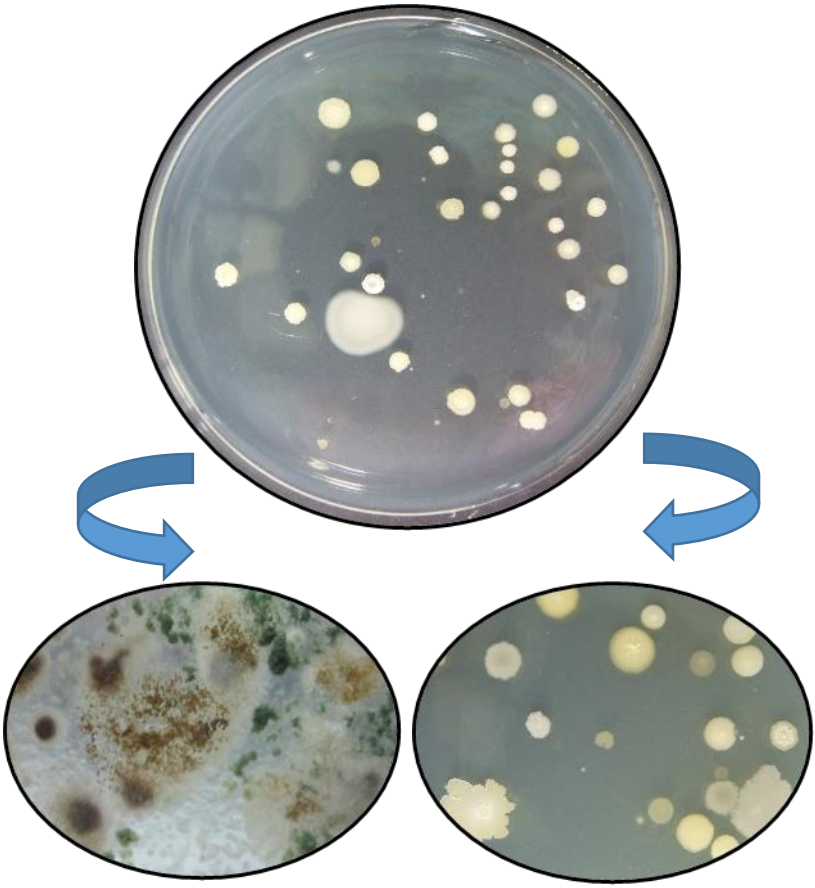
2. วิธีการคัดแยกจุลินทรีย์ในดิน

1. นำดินจากแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ จำนวน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย PBS จำนวน 9 มิลลิลิตร (1:10) และทำการเจือจางต่อไปเป็นลำดับ

2. นำตัวอย่างที่ทำการเจือจางลำดับที่ 1:100 1:1,000 และ 1:10,000 ทำการปิเปตน้ำตัวอย่างดังกล่าว จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง PDA และ NA

3. ทำการเกลี่ยเชื้อดังกล่าวให้ทั่วจาน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 7 วัน หลังจากนั้นจะปรากฏเป็นโคโลนีของจุลินทรีย์ (ดังภาพที่ 5)

4. เมื่อเชื้อปรากฏนำมาแยกใส่จานเพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ และนำไปทดสอบประสิทธิภาพของการผลิตสารลดแรงตึงผิวเพื่อใช้เป็นสารจับใบพืชต่อไป



ภาพที่ 5 แสดงเชื้อที่คัดแยกเบื้องต้นจากดินในพื้นที่การเกษตร

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของการผลิตสารลดแรงตึงผิวเบื้องต้น

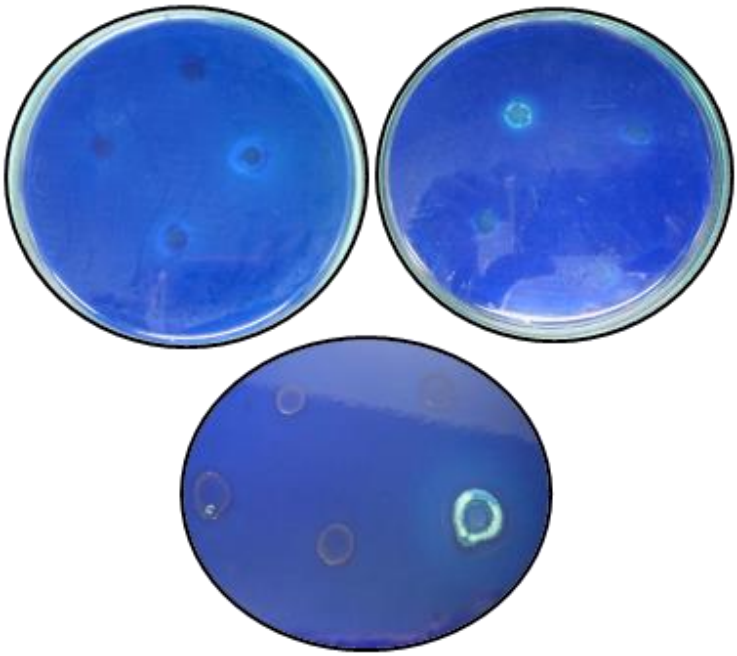
1. วัสดุและอุปกรณ์เพื่อทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

สำหรับอาหารคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวเบื้องต้นนั้น ได้แก่ CTAB-Methylene blue agar ประกอบด้วย : KH_2PO_4 0.03 %, $MgSO_4$ 0.03 %, $NaNO_3$ 0.3 %, glucose 2, Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB 0.5 mg/mL) และ Methylene blue (0.2 mg/mL)

2. วิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเบื้องต้น

1. นำเชื้อราที่คัดแยกบริสุทธิ์จากข้อ 2.1 โดยใช้ที่เจาะเส้นใย (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร หรือเข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยมาวางลงบนอาหารแข็ง CTAB (จากข้อ 1 ที่ผ่านมา) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบปฏิกิริยาบนอาหารแข็ง โดยเชื้อที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจะปรากฏวงใสสีน้ำเงินเข้ม (ดังภาพที่ 6)

2. นำจุลินทรีย์ชนิดที่แสดงผลการเกิดวงใสดังกล่าวเพื่อผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 6 แสดงการคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเบื้องต้นบนอาหาร CTAB

บทที่ 3 การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์คือ การเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติใช้ในการผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพที่คัดแยกได้จากขั้นตอนที่ผ่านมา โดยนำมาเพิ่มปริมาณให้มีความหนาแน่นมากขึ้นเหมาะสมต่อการนำไปขยายหัวเชื้อในขั้นตอนต่อไป

3.1 วัสดุและอุปกรณ์การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ

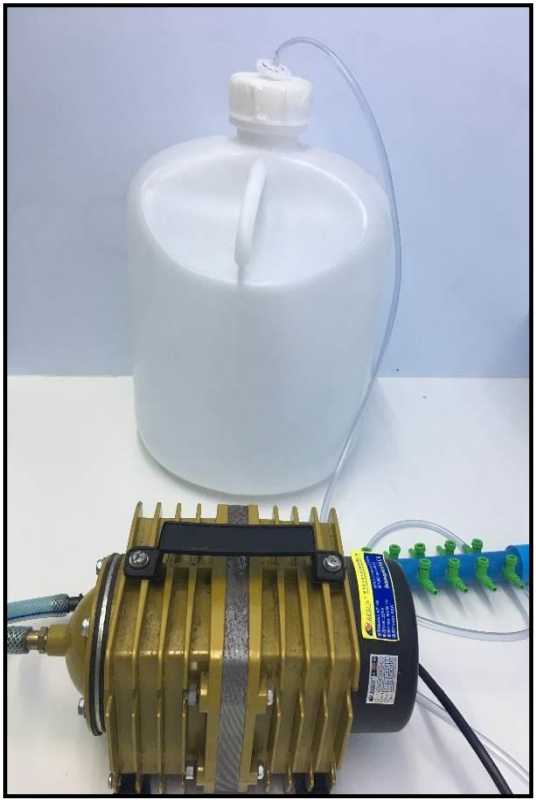
1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยกประสิทธิภาพเบื้องต้นและเป็นเชื้อบริสุทธิ์
2. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
3. ตู้เขี่ยเชื้อ
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. ขวดเลี้ยงพลาสติกขนาด 10 ลิตร โดยทำการติดฟิลเตอร์ และต่อเข้ากับชุดกรองอากาศเพื่อเติมอากาศ (ดังภาพที่ 7-8)
6. อาหาร Sabouraud broth (SAB) สำหรับเชื้อรา

ประกอบด้วย : Dextrose (Glucose) 20.00 กรัม Peptone 10.00 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

7. อาหาร LB medium (LB) สำหรับแบคทีเรีย

ประกอบด้วย : NaCl 10.00 กรัม Tryptone 10.00 กรัม Yeast extract 5.00 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

ภาพที่ 7 แสดงขวดเพาะเลี้ยงหัวเชื้อและอุปกรณ์กรองเชื้อจุลินทรีย์



ภาพที่ 8 แสดงชุดอุปกรณ์สำหรับขวดเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ

3.2 วิธีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารจับใบพืช

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าวและทำการนึ่งฆ่าเชื้อ
2. นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากการทดสอบเบื้องต้น มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1
3. นำอุปกรณ์เติมอากาศต่อเข้ากับชุดกรอง และนำมาใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14-30 วัน จะได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความหนาแน่นสูง และพร้อมจะนำไปขยายต่อ
4. ทำการทดสอบประสิทธิภาพเพื่อนำมาใช้ในการผลิตสารจับใบพืช โดยทดสอบตามวิธีการต่างๆ ได้แก่ การหาค่าอิมัลชั่น (Emulsification index (E24) การทดสอบ Drop collapse test และการหาค่าการกระจาย (Oil displacement activity) ดังลำดับต่อไปนี้

วัสดุและอุปกรณ์

1. ไมโครเวลเพลท 96 หลุม (ขนาด 8.5 x 12.7 cm)
2. ปิเปต
3. น้ำมันพืช
4. จานเพาะเชื้อ
5. น้ำกลั่น
6. เวอร์เนียคาลิปเปอร์ หรือไม้บรรทัด
7. หลอดทดลอง
8. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)

การหาค่าอิมัลชั่น (Emulsification index (E24))

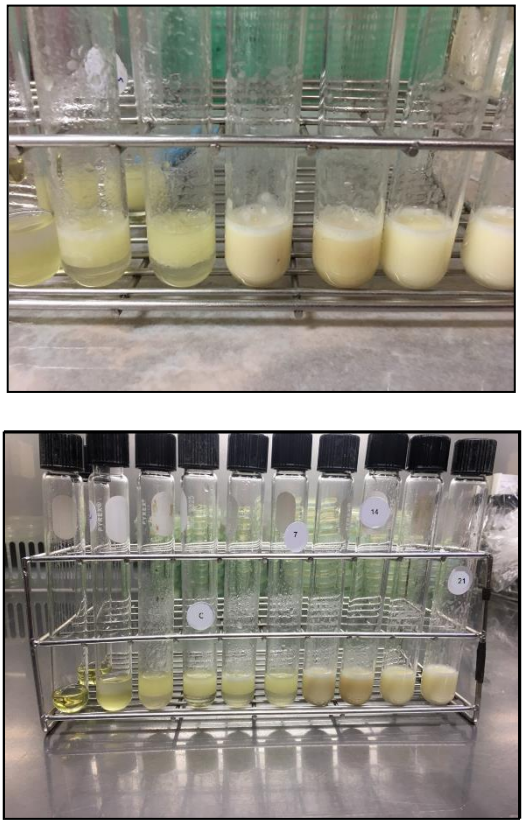
คือการทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพของการลดแรงตึงผิวทั้งระหว่างน้ำ/อากาศ หรือน้ำ/น้ำมัน หรือการแตกตัวของน้ำมันเพื่อรวมตัวกับสารละลายอื่นๆ อันจะสามารถนำมาใช้ผลิตสารจับใบพืชเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. นำสารละลายที่ได้จากจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ 4 ml ใส่หลอดทดลอง

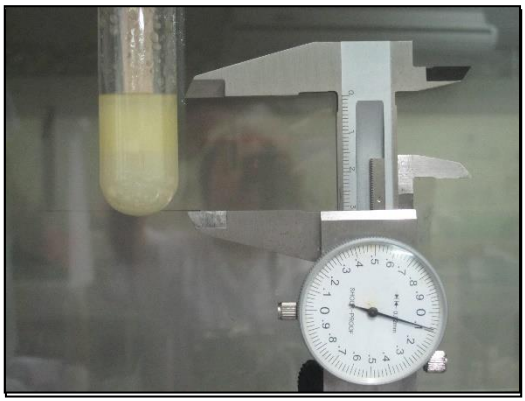
2. เติมน้ำมันพืช 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ได้ในข้อ 1 จากนั้นนำไปเขย่าเป็นระยะเวลา 2 นาที จะเกิดอิมัลชั่นตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3. ทำการตรวจผลของการแยกชั้นอิมัลชั่นที่เกิดขึ้น โดยสูตรดังต่อไปนี้

$$E24 = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชั่นที่ปรากฏ}}{\text{ความสูงทั้งหมดของของเหลว}} \times 100$$



ภาพที่ 9 แสดงการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดยการเกิดอิมัลชั่นเพื่อนำมาผลิตเป็นสารจับใบพืชที่ระยะเวลาแตกต่างกัน



ภาพที่ 10 แสดงการวัดการเกิดอิมัลชั่นของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ

การทดสอบ Drop collapse test

1. นำไมโครเวลเพลท 96 หลุม (ขนาด 8.5 x 12.7 เซนติเมตร) ล้างด้วยน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และน้ำกลั่น ตามลำดับ

2. ปิเปตน้ำมัน 7 ไมโครลิตร ลงในหลุมและทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ณ ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาทดสอบ

3. ปิเปตสารละลายที่ได้จากจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิว 20 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมไมโครเวลเพลท โดยทำมุมเพียง 45 องศาเพื่อไม่ให้เกิดฟองก๊าซ

4. เมื่อครบ 1 นาที ทำการตรวจผล โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้จะไม่ปรากฏการคงรูปหรือการคงอยู่ของหยดสารละลายดังกล่าว

การหาค่าการกระจาย (Oil displacement activity)

เป็นวิธีการที่รวดเร็วในการตรวจหาสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ โดยใช้ปริมาณตัวอย่างที่น้อย อาศัยหลักการแทนที่น้ำมันบนผิวน้ำ การแพร่กระจายของสารลดแรงตึงผิวจะส่งผลให้เกิดการกระจายออกในแนวรัศมี จึงสะดวกในการวัดและตรวจสอบที่รวดเร็วและเป็นที่นิยม โดยมีวิธีการดังนี้

1. นำน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เทใส่จานเพาะเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร)

2. เมื่อน้ำเต็มผิวหน้าจานเพาะเชื้อ ทำการปิเปตน้ำมันพืช 20 ไมโครลิตร ลงบนผิวน้ำ

3. ปิเปตสารละลายที่ได้จากจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิว 20 ไมโครลิตร ลงบนผิวน้ำมันในแต่ละจาน

4. ทำการวัดรัศมีการกระจายของน้ำมันที่ปรากฏ

ภาพที่ 11 แสดงการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดยวัดค่าการกระจายของน้ำมัน

บทที่ 4 การขยายเชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ

สำหรับขั้นตอนการขายเชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพนั้น คือ การนำหัวเชื้อที่ได้จากการคัดแยกและผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวแล้วมารขยายเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น และเพียงพอต่อการนำไปใช้ โดยผลผลิตที่ได้จากจุลินทรีย์ในขั้นตอนนี้จะนำมาขยายในอาหารเหลวที่เป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นของเชื้อจุลินทรีย์ มีการเพิ่มปริมาณของออกซิเจน คาร์บอนและไนโตรเจนให้เพียงพอกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. ถังหมักเชื้อ ขนาด 150 ลิตร
2. น้ำกลั่น
3. อุปกรณ์เติมอากาศ
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ประกอบด้วย :

หัวเชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ	1 ลิตร (ส่วน)
กากน้ำตาล	2 ลิตร (ส่วน)
น้ำสะอาด	10 ลิตร (ส่วน)
Glucose	200.00 กรัม
Peptone	40.00 กรัม

Yeast extract	10.00 กรัม
KH_2PO_4	40.00 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	28.00 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	6.00 กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	8.00 กรัม

4.2 วิธีการผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ

1. นำหัวเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในบทที่ 3 ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว และทำการปิดฝาถังหมัก

2. ทำการติดตั้งอุปกรณ์เติมอากาศ และเปิดปั๊มเติมออกซิเจนทุก 1-3 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน

3. หลังจาก 14 วัน ทำการตรวจวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวที่ได้โดยวิธีการหาค่าการกระจาย โดยควรมีค่าการกระจายประมาณ 80% เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการจับใบพืช

บทที่ 5 การติดตั้งถังผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ

ภาพที่ 12 แสดงชุดอุปกรณ์สำหรับผลิตสารจับใบพืชทางชีวภาพ

บทที่ 6 วิธีการใช้ผลิตภัณฑ์สารจับใบพืชทางชีวภาพ

วิธีการใช้สารจับใบพืช สามารถนำมาใช้ได้ในหลายรูปแบบ ได้แก่ การใช้ในลักษณะของสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์ คือ การนำสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้นั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ และโดยการใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้ร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว (แบบไม่บริสุทธิ์) สำหรับการทำให้บริสุทธิ์นั้นสามารถทำโดยการสกัดด้วยกรด หรือโดยการกรองผ่านเยื่อกระดาษ ซึ่งเป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็ว ทั้งนี้การใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพยังขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งานและสภาพแวดล้อมทางการเกษตรด้วย นอกจากนั้นยังสามารถใช้ร่วมกับชีวภัณฑ์อื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีหลักการใช้งานดังนี้

1. อัตราส่วนการใช้สารจับใบพืชทางชีวภาพ 100 มิลลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร
2. สามารถนำจุลินทรีย์อื่นๆ มาผสมก่อนการใช้งานตามอัตราส่วนที่กำหนดได้ทดแทนการผสมด้วยน้ำ
3. ควรฉีดพ่นในช่วงเย็นหรือในช่วงเวลาที่มีแสงแดดไม่รุนแรง เพื่อให้จุลินทรีย์ร่วมที่นำมาใช้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น
4. ถ้าใช้เพื่อควบคุมโรคข้าวควรใช้สารที่ผลิตได้ในรูปแบบไม่บริสุทธิ์จะช่วยให้ควบคุมโรคข้าวได้เป็นระยะเวลา 21 วัน

เอกสารอ้างอิง

Federica Spinaa, Giulia Spinib, Anna Polia, Alice Romagnoloa, Andrea Zanellatia, Nicolò G. Bentivegnaa, Najoi El-Azharic, Tiffanie Regnierc, Anne-Laure Blieuxc, Abdelwahad Echairic, Valeria Prigionea, Edoardo Puglisib, & Varesea, G. C. (2018). Screening of Anionic Biosurfactants Production among Fungi and Bacteria. *Chemical engineering transactions,* 64, 493-498.

Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology, 6*(59). doi: 10.3389/fmicb.2015.00059

Hellen Holanda Sena, Michele Alves Sanches, Diego Fernando Silva Rocha, Walter Oliva Pinto Filho Segundo, Érica Simplíciode Souza, & JoãoVicente BragadeSouz. (2018). Production of Biosurfactants

by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. *International Journal of Microbiology,* 2018, 1-8.

K. Revathi Sushma, G. Sai Kiranmai, D. Nandini, G. G., L. Mallikarjunarao, & Babu, D. A. M. S. S. (2018). Isolation, screening and identification of biosurfactant producing fungal strains. *International Journal of Advanced Reasearch (IJAR),* 6(4), 1036-1041.

Kosaric, N., & Sukan, F. V. (2014). *Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics*: CRC Press.

Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., & Prasad, R. (2017). *Probiotics and Plant Health*: Springer Singapore.

Pele, M. A., Ribeaux, D. R., Vieira, E. R., Souza, A. F., Luna, M. A. C., Rodríguez, D. M., Andrade, R. F. S., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Barreto-Bergter, E., Santiago, A. L. C. M. A., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. *Electronic Journal of*

Biotechnology, 38, 40-48. doi: https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.12.003

S. Askolin, T. Nakari-Setälä, & M. Tenkanen. (2001). Overproduction, purification, and characterization of the Trichoderma reesei hydrophobin HFBI. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 57(1-2), 124-130.

Surachai Techaoei, Pimporn Leelapornpisid, Dammrong Santiarwarn, & S. Lumyong. (2007). Preliminary screening of biosurfactantproducing microorganisms isolated from hot spring and garages in northern Thailand *KMITL Sci. Tech. J.,* 7(S1), 38-43.

Tugrul, T., & Cansunar, E. (2005). Detecting Surfactant-producing Microorganisms by the Drop-collapse Test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 21(6), 851-853. doi: 10.1007/s11274-004-5958-y

ดัชนี

กรดอินโดลอะซิติก	11
การกระจายของน้ำมัน	27
การคัดแยกจุลินทรีย์	15
การใช้ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ	2
คลอโรฟิลด์	8
ควบคุมโรคพืช	3
ค่าการกระจาย	22
คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	1
โครงสร้างทางกายภาพเคมี	1
ปากใบข้าว	8
ระบบการต้านทานโรค	5
โรคระบาด	4
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	1
อิมัลชั่น	22, 24, 25
อิมัลซิฟิเคชั่น	8
Bacillus	6
Biosurfactant	1
CTAB-Methylene blue agar	17
Drop collapse test	22, 25

Emulsification	8
Emulsification index	23
Indole acetic acid	11
Induced Systemic resistance	5
Oil displacement activity	22
Phytoremediation	10
Systemic acquired resistance	6
Tichoderma	6