บทที่ 3
วิธีการวิจัย

ในการดำเนินงานแบ่งออกเป็น การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 การวิจัยและพัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์เกษตรและสารเคลือบผลสำหรับควบคุมโรคผลเน่าของสตรอเบอรี่

3.1.1) ทดสอบความสามารถของไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจาก วิจัยปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

3.1.1.1 ทดสอบความสามารถของไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดเลือกต่อการงอกของเมล็ดพืช

ทดสอบ

ทดสอบความสามารถของไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดเลือกต่อความสามารถในการทำให้เกิดความเสียหายกับการงอกของเมล็ดพืชทดสอบในเบื้องต้น โดยได้คัดเลือกเมล็ดกะหล่ำปลีเพื่อใช้ทดสอบ ทั้งนี้เนื้อเยื่อของเมล็ดกะหล่ำปลีที่กำลังงอกจะง่ายต่อการถูกทำลายจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่เหมาะสมต่อการนำมาทำชีวภัณฑ์ โดยนำเมล็ดกะหล่ำปลีแช่ในสารแขวนลอยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคัดเลือกจากการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ (Widnyana and Widnyana, 2016) โดยเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดโคโลนีของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 3 loop ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยมีความเข้มข้นประมาณ 10^4 cfu ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเมล็ดกะหล่ำปลีแช่ในสารแขวนลอยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 1 คืน หรือ 12 ชั่วโมง แล้วผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะบนกระดาษชื้น โดยนำเมล็ดกะหล่ำปลีวางบนกระดาษในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษ Whatman No.1 ที่ชุบน้ำจนชุ่ม 2 แผ่น นำเมล็ดกะหล่ำปลีวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 เมล็ดต่อจาน โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 25 เมล็ด แล้วตรวจสอบการงอกของเมล็ดกะหล่ำปลี แล้วหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารแขวนลอยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

3.1.1.2 ทดสอบความสามารถของไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดเลือกต่อผลสตรอเบอรี่

เตรียมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis* sp. และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มาทดสอบกับผลสตรอเบอรี่ที่ไม่แสดงอาการของโรค โดยเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดโคโลนีของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 1 loop ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยมีความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดบนผลสตรอเบอรี่ 50 ไมโครลิตร ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ สังเกตและบันทึกผลจากประสิทธิภาพและผลกระทบของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อผลสตรอเบอรี่

3.1.1.3 ทดสอบความสามารถของไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดเลือกต่อใบและไหลของสตรอเบอรี่

เตรียมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis* sp. และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มาทดสอบกับใบและไหลสตรอเบอรี่ที่ไม่แสดงอาการของโรค โดยเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดโคโลนีของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 1 loop ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยมีความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำแผลที่ใบ 1 แผลด้วยเข็มปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วหยดสารแขวนลอยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบและไหลของสตรอเบอรี่ที่ทำแผล โดยมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการทดลอง 6 ซ้ำ สังเกตและบันทึกผลกระทบของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อใบและไหลของสตรอเบอรี่

3.1.2) ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อผลสตรอเบอรี่

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีจาก ข้อ 3.1.1 มาทดสอบกับผลสตรอเบอรี่ โดยเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดโคโลนี 1 plate ต่อน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นประมาณ 10^7 cfu/ml จากนั้นนำไปชุบผล ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 5 ผล) ส่วนชุดควบคุมชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นสังเกตและบันทึกผลจากประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการลดหรือยังยั้งจุลินทรีย์ที่ติดมากับผล เมื่อผ่านไป 5 วัน

3.1.3) การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อกรองปราศจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการงอกของเชื้อรา

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis* sp. และเชื้อรา *Colletotrichum* sp.โดยเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดโคโลนีของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 3 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

จากนั้นนำอาหารทดสอบแบ่งออกเป็นสองส่วน คือส่วนแรกนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองปราศจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการนำไปกรองด้วย nylon syringe filter ขนาด 0.44 ไมโครเมตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และส่วนที่สองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยตรงซึ่งไม่ผ่านการกรอง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองปราศจากเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังคงมีเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการงอกของ เชื้อราที่มีปริมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ในอัตราส่วน 1:1) ผสมให้เข้ากัน ชุดควบคุมใช้อาหาร NB ผสมกับสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งแบ่งเป็น 4 กรรมวิธี ดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองปราศจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์

กรรมวิธีที่ 1 หลังการรวมกันระหว่างเชื้อราสาเหตุกับอาหารเลี้ยงเชื้อกรองปราศจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ แล้วจึงดูดส่วนผสมมาปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน Water agar (WA) แล้วบ่มด้วยวิธี slide culture technique จากนั้นสังเกตการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการสร้างสปอร์ใหม่ ที่ 6, 9 และ 24 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 2 หลังการรวมกันระหว่างเชื้อราสาเหตุกับอาหารเลี้ยงเชื้อกรองปราศจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ **เมื่อแช่ไว้ 6 ชั่วโมง** แล้วจึงดูดส่วนผสมมาปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน Water agar (WA) แล้วบ่มด้วยวิธี slide culture technique จากนั้นสังเกตการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการสร้างสปอร์ ที่ 6, 9 และ 24 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการกรอง โดยมีเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์

กรรมวิธีที่ 3 หลังการรวมกันระหว่างเชื้อราสาเหตุกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ แล้วจึงดูดส่วนผสมมาปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน Water agar (WA) แล้วบ่มด้วยวิธี slide culture technique จากนั้นสังเกตการณ์งอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการสร้างสปอร์ ที่ 6, 9 และ 24 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 4 หลังการรวมกันระหว่างเชื้อราสาเหตุกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อ**แช่ทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง** แล้วจึงดูดส่วนผสมมาปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน Water agar (WA) แล้วบ่มด้วยวิธี slide culture technique จากนั้นสังเกตการณ์งอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการสร้างสปอร์ ที่ 6, 9 และ 24 ชั่วโมง

3.1.4) การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวในการยับยั้งการงอกของเชื้อรา

นำสารเคลือบผิวในความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis* sp. และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้แก่ 2% ascorbic acid, 1% citric acid และ 10% glycerol โดยเตรียมปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เตรียมในความเข้มข้น 2 เท่าของสารเคลือบผิวที่จะทดสอบ คือ 4% ascorbic acid, 2% citric acid และ 20% glycerol ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) จากนั้นนำมาผสมกับสปอร์ของเชื้อรา 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ในอัตราส่วน 1:1) ผสมให้เข้ากัน ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วผสมกับสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งแบ่งเป็น 2 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 หลังการรวมกันระหว่างเชื้อราสาเหตุกับสารเคลือบผิวที่เลือกมาทดสอบ แล้วจึงดูดส่วนผสมมาปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน Water agar (WA) แล้วบ่มด้วยวิธี slide culture technique จากนั้นสังเกตการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการสร้างสปอร์ ที่ 6, 9 และ 24 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 2 หลังรวมกันระหว่างเชื้อราสาเหตุกับสารเคลือบผิวที่เลือกมาทดสอบ แช่ไว้ 6 ชั่วโมง แล้วดูดส่วนผสมมาปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน Water agar (WA) แล้วบ่มด้วยวิธี slide culture technique จากนั้นสังเกตการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการสร้างสปอร์ ที่ 6, 9 และ 24 ชั่วโมง

3.1.5) คัดเลือกชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มปริมาณให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10^9 cfu/ml เพื่อพัฒนาเป็นต้นแบบชีวภัณฑ์

โดยเปรียบเทียบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลทรายในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis* sp. และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ซึ่งจะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจำนวน 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไว้ แล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหาร NB (beef extract 3 กรัม, peptone 5 กรัม และ น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ซึ่งจะเพิ่มกลูโคสและน้ำตาลทรายในปริมาณที่แตกต่างกัน 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่ออาหาร NB 1 ลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิห้อง (30±2ºC) เป็นเวลา 4 วัน และทำการทดลองซ้ำ โดยควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์จะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ºC ส่วนยีสต์ปฏิปักษ์จะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ºC นับจำนวนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังจากเขย่าเป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 0.85% NaCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักตะกอนที่ได้

3.1.6) คัดเลือกชนิดวัสดุรองรับหัวเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อพัฒนาเป็นต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรผง และสูตรผงละลายน้ำ

โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis* sp. และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์สูตรผง 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 คือแป้งข้าวจ้าว สูตรที่ 2 คือ Lactose และ สูตรที่ 3 คือ MCC โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจำนวน 4 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ลงผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไว้ แล้วดูดเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 3 มิลลิลิตรต่อ 1 flask ลงเลี้ยงในอาหาร

NGB (Nutrient Glucose Broth) (beef extract 3 กรัม, peptone 5 กรัม, glucose 20 กรัม และ น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ จำนวน 3 flask ต่อเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 1 ไอโซเลท แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิห้อง (30±2 C) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 0.85% NaCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ชั่งน้ำหนักตะกอนที่ได้ หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท มาผสมเป็นชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 แป้งข้าวจ้าว และ สูตรที่ 3 MCC ปรับปริมาตรด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 มิลลิลิตร ส่วนชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 Lactose ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร (เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เลี้ยงในอาหาร NGB จำนวน 900 มิลลิลิตร) แล้วนำไปผสมกับสารประกอบต่างๆตามสูตรชีวภัณฑ์ ดังนี้

สูตรที่ 1 ชีวภัณฑ์รูปแบบผง สูตรแป้งข้าวจ้าว

ประกอบด้วย แป้งข้าวจ้าว (นึ่งฆ่าเชื้อ) 43.5 กรัม น้ำมันรำข้าว 1.5 มิลลิลิตร และน้ำตาลทราย 5 กรัม ผสมสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับน้ำตาลทรายให้เข้ากันจนน้ำตาลทรายละลาย ใส่น้ำมันรำข้าว แล้วคนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปผสมกับแป้งข้าวจ้าว จะได้ส่วนประกอบสารชีวภัณฑ์ทั้งหมด 50 กรัม นำไปอบภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่อง blender จะได้ชีวภัณฑ์สูตรผง และเก็บรักษาไว้ในถุงซิบที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

สูตรที่ 2 ชีวภัณฑ์รูปแบบผง สูตร Lactose

ประกอบด้วย lactose 48 กรัม sodium alginate 1 กรัม และ polyvinyl pyrroidone 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปผสมกับสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน รวมสารชีวภัณฑ์ทั้งหมด 50 กรัม นำไปอบภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่อง blender จะได้ชีวภัณฑ์สูตรผงละลายน้ำ และเก็บรักษาไว้ในถุงซิบที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

สูตรที่ 3 ชีวภัณฑ์รูปแบบผง สูตร MCC

ประกอบด้วย microcystaline cellulose (นึ่งฆ่าเชื้อ) 21 กรัม talcum (นึ่งฆ่าเชื้อ) 18 กรัม lactose 10 กรัม และ sodium carboxymethyl (นึ่งฆ่าเชื้อ) 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปผสมกับสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน รวมสารชีวภัณฑ์ทั้งหมด 50 กรัม นำไปอบภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่อง blender จะได้ชีวภัณฑ์สูตรผง และเก็บรักษาไว้ในถุงซิบที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

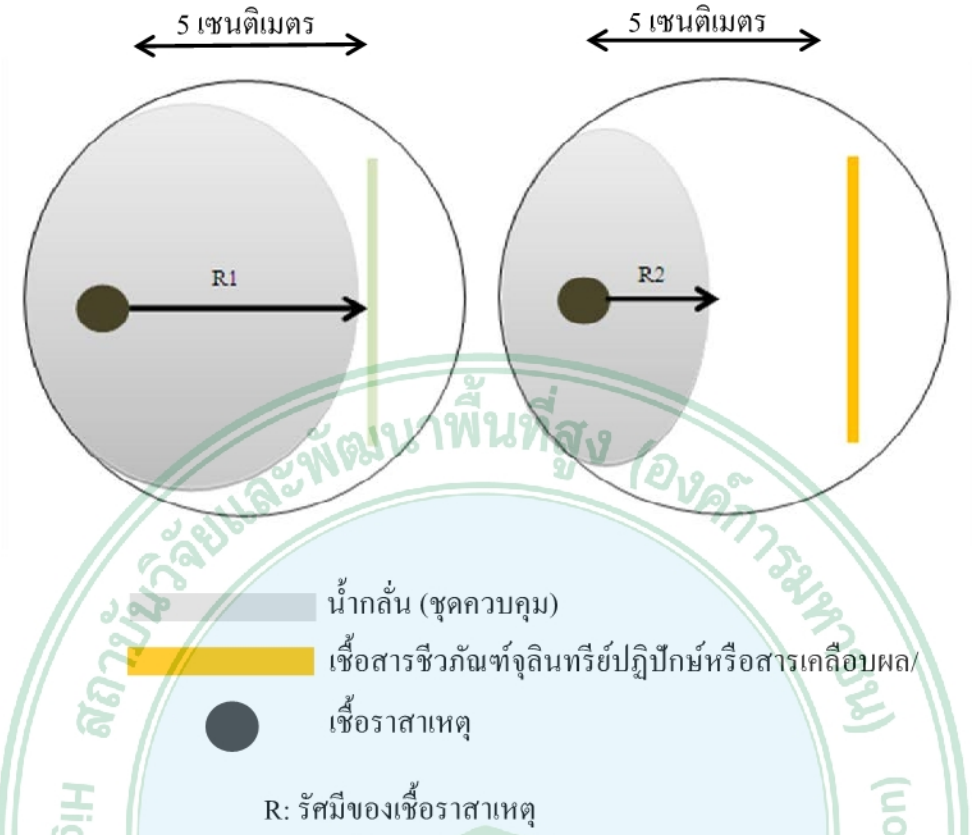
จากนั้นประเมินความมีชีวิตรอดของสารชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร ได้แก่ สูตรแป้งข้าวจ้าว สูตร Lactose และ สูตร MCC ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยชั่งสารชีวภัณฑ์สูตรผง 1 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางที่ความ

เข้มข้น 10^{-1}-10^{-8} จากนั้นดูดมา 20 ไมโครลิตร 3 ซ้ำ แล้วตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยวิธีการ drop plate โดยประเมินความมีชีวิตรอดหลังผลิต 0 , 1, 2, 3 และ 6 เดือน

3.1.7) ทดสอบประสิทธิภาพต้นแบบชีวภัณฑ์เกษตรและสารเคลือบผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

3.1.7.1 ทดสอบประสิทธิภาพต้นแบบชีวภัณฑ์เกษตรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

เตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบ เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture เปรียบเทียบกับเซลล์สดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีที่มีความสม่ำเสมอ แล้ววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำเซลล์สดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ได้แก่ ไอโซเลท K27, S17 และ N7 มาผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 10^{8} cfu ต่อมิลลิลิตร แล้วดูดสารแขวนลอยที่ได้ หยดลงในกระดาษกรองฆ่าเชื้อขนาด 0.5×5 เซนติเมตร หยดสารแขวนลอยปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วางเชื้อสาเหตุดังกล่าว โดยเว้นระยะห่างจากเชื้อราสาเหตุ 5 เซนติเมตร ส่วนชุดทดสอบที่ใช้สารชีวภัณฑ์ต้นแบบ ให้ชั่งสารชีวภัณฑ์ 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร แล้วดูดสารแขวนลอยที่ได้ หยดลงในกระดาษกรองฆ่าเชื้อขนาด 0.5×5 เซนติเมตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วางเชื้อสาเหตุ โดยเว้นระยะห่างจากเชื้อราสาเหตุดังกล่าว 5 เซนติเมตร สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25ºC บันทึกผลเมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนมีรัศมี 5 เซนติเมตร โดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุในชุดทดสอบและชุดควบคุม และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) ตามสูตร (Tronsmo and Harman, 1992) (ภาพที่ 3.2) หลังจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม Statistic 8.0



ภาพที่ 3.1 ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี Dual Culture

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG) = (R1-R2)/R1 ×100

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

3.1.7.2 ทดสอบประสิทธิภาพสารเคลือบผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผลที่คัดเลือก ได้แก่ 2% ascorbic acid, 1% citric acid, และ 10% glycerol ทำการทดสอบโดยเตรียมอาหาร PDA ซึ่งมีส่วนผสมของมันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม วุ้น 20 กรัม และ น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร โดยจะแบ่งเป็น 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร PDA 100 มิลลิลิตร ผสมสารเคลือบผล ascorbic acid 2.5 กรัม ในน้ำ 25 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคลือบเท่ากับ 2% ascorbic acid)

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร PDA 100 มิลลิลิตร ผสมสารเคลือบผิว citric acid 1.25 กรัม ในน้ำ 25 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคลือบเท่ากับ 1% citric acid)

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร PDA 135.00 มิลลิลิตร ผสม glycerol 15 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคลือบ เท่ากับ 10% glycerol)

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร PDA 100 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 25 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม)

เทอาหารที่ผสมแล้วลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 15 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดขอบนอกของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคที่มีความสม่ำเสมอ แล้วย้ายเชื้อราดังกล่าววางตรงกลางในอาหาร PDA ในแต่ละกรรมวิธีต่างๆ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ หลังจากนั้นนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistix for Window version 8

3.1.8) ศึกษาวิธีการเคลือบผลสตรอเบอรี่ด้วยสารเคลือบผิวที่คัดเลือกได้ ได้แก่ ascorbic acid, citric acid และ glycerol

ทดสอบสารเคลือบผลที่คัดเลือก ได้แก่ 2% ascorbic acid, 1% citric acid, และ 10% glycerol โดยเตรียมสารเคลือบผลที่ความเข้มข้นดังกล่าวในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำผลสตรอเบอรี่ชุบสารเคลือบผิวที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยชุบให้ท่วมทั้งผล แล้วนำไปผึ่งให้แห้งประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวางไว้ในกล่องที่มีการเจาะรูระบายอากาศ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลเมื่อตั้งทิ้งไว้ 3 วัน โดยสังเกตการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับผล โดยจะแบ่งเป็น 4 กรรมวิธี ใช้ผลสตรอเบอรี่กรรมวิธีละ 9 ผล ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ชุบสารเคลือบผล 2% ascorbic acid

กรรมวิธีที่ 3 ชุบสารเคลือบผล 1% citric acid

กรรมวิธีที่ 4 ชุบสารเคลือบผล 10% glycerol

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการใช้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบชีวภัณฑ์เกษตรเปรียบเทียบกับเซลล์สดและสารเคลือบผลในการควบคุมโรคผลเน่าของสตรอเบอรี่

3.2.1) ทดสอบประสิทธิภาพสารเคลือบผล จุลินทรีย์เซลล์สด และผลิตภัณฑ์ต้นแบบชีวภัณฑ์กับผลสตรอเบอรี่

3.2.1.1 ทดสอบประสิทธิภาพสารเคลือบผลกับผลสตรอเบอรี่

คัดเลือกสารเคลือบผลที่มีประสิทธิภาพในการลดการเจริญของเชื้อราที่ติดมากับผลสตรอเบอรี่จากการทดลอง 3.1.8 โดยเตรียมสารเคลือบผล ascorbic acid และ citric acid ที่ความเข้มข้น 1%, 2% และ 4% ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำผลสตรอเบอรี่ชุบสารเคลือบผิวที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยชุบให้ท่วมทั้งผล แล้วนำไปผึ่งให้แห้งประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวางไว้ในกล่องที่มีการเจาะรูระบายอากาศ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลเมื่อตั้งทิ้งไว้ 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับผลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ผลสตรอเบอรี่กรรมวิธีละ 20 ผล ซึ่งทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

3.2.1.2 ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เซลล์สดกับผลสตรอเบอรี่

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือก ได้แก่ ไอโซเลท K27, S17 และ N7 ให้นำเซลล์สดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร มาผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตร โดยจะเตรียมที่ความเข้มข้นประมาณ $10^7 - 10^8$ cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำผลสตรอเบอรี่ชุบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยชุบให้ท่วมทั้งผล แล้วนำไปผึ่งให้แห้งประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวางไว้ในกล่องที่มีการเจาะรูระบายอากาศ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลเมื่อตั้งทิ้งไว้ 5 วัน โดยสังเกตการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับผลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ผลสตรอเบอรี่กรรมวิธีละ 20 ผล ซึ่งทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.1.3 ทดสอบประสิทธิภาพสารเคลือบผลและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับการควบคุมโรคผลเน่าของสตรอเบอรี่

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผลบนผลสตรอเบอรี่ โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า ได้แก่ เชื้อรา *Botrytis* sp. และ *Colletotrichum* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน ปรับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราสาเหตุให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปปลูกเชื้อลงบนผลสตรอเบอรี่ โดยหยดสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุลงบนผล 20 ไมโครลิตร จากนั้นรอให้สารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุที่ปลูกเชื้อแห้ง

เลือกสารเคลือบผลที่มีประสิทธิภาพในการลดการเจริญของเชื้อราที่มีการปนเปื้อนเชื้อราที่ติดมากับผลสตรอเบอรี่จากการทดลอง 3.2.1.1 โดยเลือกจากความเข้มข้นของสารเคลือบผล ascorbic acid และ citric acid ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดการเจริญของเชื้อราที่มีการปนเปื้อนมากับผลสตรอเบอรี่ ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้แก่ ไอโซเลท K27, S17 และ N7 ให้นำ

เซลล์สดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร มาผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ $10^7 – 10^8$ cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบโดยในกรรมวิธีที่ใช้การพ่นสารเคลือบผิวและกรรมวิธีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พ่นบนผลสตรอเบอรี่ที่ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าก่อน 2 ชั่วโมง (ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อผลสตรอเบอรี่ 1 ผล) แล้วนำไปวางไว้ในกล่องที่มีการเจาะรูระบายอากาศ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลเมื่อตั้งทิ้งไว้ 5 วัน โดยสังเกตเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับผล โดยใช้ผลสตรอเบอรี่กรรมวิธีละ 8 ผล ซึ่งทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.1.4 ทดสอบประสิทธิภาพการละลายและการเกิดคราบของสารชีวภัณฑ์สูตรต่างๆ

นำสารชีวภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 สูตร (สูตรแป้งข้าวจ้าว, Lactose และ MCC) มาทดสอบประสิทธิภาพในการละลาย โดยชั่งสารชีวภัณฑ์ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากัน 15 นาที สังเกตการขุ่นของสารชีวภัณฑ์ในน้ำ แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง บันทึกผลการตกตะกอนของสารชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร

จากนั้นนำสารชีวภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 สูตร โดยชั่งสารชีวภัณฑ์ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปพ่นบนผลและต้นสตรอเบอรี่ หลังฉีดพ่น 5 วัน บันทึกผลของการเกิดคราบบนใบและผลของสตรอเบอรี่

3.2.1.5 ทดสอบประสิทธิภาพสารชีวภัณฑ์สูตรผง Lactose กับการควบคุมโรคผลเน่าของสตรอเบอรี่

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผลบนผลสตรอเบอรี่ โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า ได้แก่ เชื้อรา *Botrytis* sp. และ *Colletotrichum* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน ปรับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราสาเหตุให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปปลูกเชื้อลงบนผลสตรอเบอรี่ โดยหยดสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุลงบนผล 20 ไมโครลิตร จากนั้นรอให้สารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุที่ปลูกเชื้อแห้ง

คัดเลือกสารชีวภัณฑ์สูตรผงที่สามารถเคลือบผลได้ ไม่ส่งผลให้เกิดคราบติดกับผลสตรอเบอรี่ คือ ชีวภัณฑ์สูตรผง Lactose (ประกอบด้วย lactose 48 กรัม sodium alginate 1 กรัม polyvinyl pyrroidone 1 กรัม และสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 10 มิลลิลิตร รวมสารชีวภัณฑ์ทั้งหมด 50 กรัม) โดยทำการชั่งสารชีวภัณฑ์ ได้แก่ ไอโซเลท K27, S17 และ N7 ในอัตราส่วนสารชีวภัณฑ์ 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร พ่นที่ผลสตรอเบอรี่ที่ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าก่อน 2 ชั่วโมง (ประมาณ 152 ไมโครลิตรต่อผลสตรอเบอรี่ 1 ผล) จากนั้นนำไปวางไว้ในกล่องที่มีการเจาะรูระบายอากาศ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลเมื่อตั้งทิ้งไว้ 5 วัน โดยสังเกตเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับผล โดยใช้ผลสตรอเบอรี่กรรมวิธีละ 8 ผล ซึ่งทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.2) ทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดโรคผลเน่าของต้นแบบชีวภัณฑ์กับต้นสตรอเบอรี่

จากการทดลองปลูกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าที่ใบสตรอเบอรี่ ได้แก่ เชื้อรา *Botrytis* sp. และ *Colletotrichum* sp. พบว่าเชื้อรา *Botrytis* sp. ไม่ทำให้ใบสตรอเบอรี่เกิดโรค จึงได้เลือกเชื้อรา ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* sp. ทำการทดลองบนใบสตรอเบอรี่ร่วมกับการป้องกันโรคโดยใช้สารชีวภัณฑ์ควบคุม

ทำการทดสอบในโรงเรือนโดยใช้ต้นสตรอเบอรี่ พันธุ์พระราชทาน 80 อายุประมาณ 5 เดือน ก่อนการทดลองนำไปไว้ในที่มืด 3 วัน โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน ปรับความเข้มข้นของเชื้อราสาเหตุให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสารจับใบ (Tween 20) 1 หยด ต่อสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุโรค 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปลูกเชื้อลงบนใบของต้นสตรอเบอรี่ โดยใช้เข็มทำแผลที่ใบ 1 แผล แล้วหยดสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุลงบนแผล 20 ไมโครลิตร สำหรับสารชีวภัณฑ์ ให้ชั่งสารชีวภัณฑ์มา 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปพ่นบนใบสตรอเบอรี่ ต้นละประมาณ 35 มิลลิลิตร ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุ โดยทำการทดลอง 11 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร แป้งข้าวจ้าว เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร Lactose เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร MCC เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 6 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร แป้งข้าวจ้าว ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 1 วัน
กรรมวิธีที่ 7 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร แป้งข้าวจ้าว หลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 1 วัน
กรรมวิธีที่ 8 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร Lactose ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 1 วัน
กรรมวิธีที่ 9 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร Lactose หลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 1 วัน
กรรมวิธีที่ 10 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร MCC ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 1 วัน
กรรมวิธีที่ 11 ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ สูตร MCC หลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 1 วัน

โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 40 แผล (เก็บผล 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 แผล) ควบคุมความชื้น แล้วบันทึกผลหลังทดลอง 10 วัน โดยทำการบันทึกขนาดของแผล และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม Statistic 8.0

3.2.3 การผลิตและต้นทุนชีวภัณฑ์

คำนวณหาต้นทุนการผลิตของสารชีวภัณฑ์สูตรผง 3 สูตรที่ได้คัดเลือก ได้แก่ สูตรที่ 1 คือแป้งข้าวจ้าว สูตรที่ 2 คือ Lactose และ สูตรที่ 3 คือ MCC

สถานที่ดำเนินการวิจัย/เก็บข้อมูล

1) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง/โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง (เก็บตัวอย่างพืช)