โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การห่อหุ้มเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยด้วยแอลจิเนตเพื่อใช้กำจัดวัชพืช

Encapsulation of Microbial Herbicide from Young Banana Plants by Alginate

ชื่อนิสิต นางสาวดนิตา ธัมมปที

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การห่อหุ้มเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยด้วยแอลจิเนตเพื่อใช้กำจัดวัชพืช

Encapsulation of Microbial Herbicide from Young Banana Plants by Alginate

โดย

นางสาวดนิตา ธัมมปที

รายงานเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง การห่อหุ้มเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยด้วยแอลจิเนตเพื่อใช้กำจัดวัชพืช

โดย นางสาวดนิตา ธัมมปที

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 11 เดือน พ.ค. พ.ศ 2559

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การห่อหุ้มเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยด้วยแอลจิเนตเพื่อใช้กำจัดวัชพืช
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวดนิตา ธัมมปที เลขประจำตัว 5533085723
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีสำหรับกำจัดวัชพืชกันเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการทดแทนด้วยสารจากธรรมชาติเพื่อลดปัญหาที่เกิดขึ้น อีเอ็มจากหน่อกล้วยมีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืช ซึ่งในอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีจุลินทรีย์ที่สำคัญสำหรับกำจัดวัชพืช คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) ที่ผลิตสาร ALA ปริมาณสูง และ Phytotoxin ของแอคติโนมัยซีท (Actinomycete) เพื่อให้จุลินทรีย์จากหน่อกล้วยมีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์จึงทำการห่อหุ้มเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยด้วยแอลจิเนต ซึ่งแอลจิเนตเป็นสารที่นิยมใช้ในการห่อหุ้มสารอื่นๆ เช่น ยา อาหาร หรือแบคทีเรีย เนื่องจากแอลจิเนตเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีราคาถูก ไม่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นพรีไบโอติกซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ในอีเอ็มจากหน่อกล้วยและหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับขึ้นรูปบีดอีเอ็ม พบว่า บีดที่เตรียมจากแอลจิเนต 2% และ 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมจึงนำบีดทั้ง 2 ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย พบว่าบีดอีเอ็ม 2% และ 1.8% มีเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสูงสุดที่ 62% และ 61.8% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 8-10 วัน จากนั้นทำการทดสอบการออกฤทธิ์กับวัชพืช พบว่าบีดอีเอ็มจากการเตรียมด้วยแอลจิเนต 2% มีความสามารถในการควบคุมวัชพืชได้ดีกว่า 1.8% และงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการทำให้บีดแห้งด้วยอากาศกับการทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน (Fluid bed dryer) พบว่า การทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อนไม่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยอีกทั้งยังทำให้บีดแห้งเร็วกว่าอากาศถึง 22 เท่า

คำสำคัญ : อีเอ็ม, หน่อกล้วย, แอลจิเนต, จุลินทรีย์กำจัดวัชพืช, การห่อหุ้มสาร

Title Encapsulation of Microbial Herbicide from Young Banana Plants by Alginate

Student name Miss Danita Thammapatee ID 5533085723

Advisor Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrojanavanich

Co-advisor Associate Professor Dr. Nongnuj Muangsin

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2015

Abstract

Chemical herbicides have been widely used for controlling weeds, that may effect or toxic to human and the environment. Thus, chemical herbicides were replaced by natural materials. EM from the banana shoot has microbial herbicides. It can be controlled growing of weeds. In EM from banana shoot has significant material for eliminated weeds that are ALA from photosynthetic bacteria and phytotoxin from actinomycete. In this research, EM was encapsulated by alginate. Because, alginate is one of the most popular material for encapsulation drug, food or bacteria. Alginate is prebiotic that is food for microbial herbicide as a result microbial is grown. This research has been studying properly ratio for encapsulation is 2% w/v and 1.8% w/v of alginate. Then, releasing is calculated that 2% and 1.8% of EM bead have a percentage of release are 62% and 61.8% respectively. Moreover both EM bead can highly release at 8-10 days. Next, 2% of EM bead can control weeds better than 1.8% of EM bead. In addition, this research has studied drying of the bead. EM bead was dried by fluid bed dryer 22 times faster than air.

Keywords : EM, Banana shoot, Alginate, Microbial herbicides, Encapsulation

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการและรองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆ ตลอดจนเอื้อเฟื้อสถานที่ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือและสารเคมีในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า ให้เกียรติเป็นกรรมการในโครงการวิจัยนี้และกรุณาให้คำแนะนำตรวจสอบการแก้ไขรายงานเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลภา เอื้องไมตรีภิรมย์ อาจารย์ผู้ประสานงานในรายวิชา 2302499 Senior Project ที่คอยดูแลและให้คำปรึกษาในรายวิชานี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของฝ่ายจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและภาควิชาเคมีที่ได้สนับสนุนและให้ทุนอุดหนุนการทำโครงการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณความช่วยเหลือและกำลังใจจากครอบครัวผู้วิจัย เพื่อนๆภาควิชาเคมีทุกคนและพี่ๆนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอกในกลุ่มงานวิจัยที่ได้ให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคต่างๆ ให้คำปรึกษาแนะนำจนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง

กิตติกรรมประกาศ จ

สารบัญตารางประกอบ ซ

สารบัญรูปประกอบ ฌ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ญ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัชพืช (Weeds) 4

2.2 จุลินทรีย์กำจัดวัชพืช (Microbial Herbicide) 5

2.3 การห่อหุ้มเชื้อจุลินทรีย์ (Encapsulation of probiotic living cell) 5

2.4 ลักษณะทั่วไปของอีเอ็ม แอลจิเนต พิเพอรีน 6

2.4.1 อีเอ็ม (EM) 6

2.4.2 แอลจิเนต (Alginate) 7

2.4.3 พิเพอรีน (Piperine) 8

2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 9

2.6 เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน (Fluid bed dryer) 10

2.7 เทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy) 11

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี 13

3.2 เครื่องมือ 13

3.3 วิธีการทดลอง 14

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อดูการเจริญของจุลินทรีย์ 14

หน้า

3.3.2 การเตรียมสารเคมี 14
3.3.3 การเตรียมบีดและการหาอัตราส่วนที่เหมาะสม 16
3.3.4 การทดสอบการเจริญของเชื้อด้วย Microtiter Plate Reader 17
3.3.5 การหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสารด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy) 18
3.3.6 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดวัชพืชและควบคุมการงอกของวัชพืช 20
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง
4.1 ทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอีเอ็มจากหน่อยกล้วย 21
4.2 การขึ้นรูปบีด 22
4.3 การทำบีดให้แห้งด้วย Fluid bed dryer 29
4.4 การทดสอบการเจริญของเชื้อด้วย Microtiter Plate Reader 30
4.5 การหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสารด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy) 33
4.6 ทดสอบการออกฤทธิ์กับวัชพืช 35
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 40
เอกสารอ้างอิง 42
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก 45
ภาคผนวก ข 48
ประวัติผู้วิจัย 52

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงอัตราส่วนผสมของบีดอีเอ็มที่ใช้สารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 1.6% โดยมวลต่อปริมาตร	15
3.2	แสดงอัตราส่วนผสมของบีดอีเอ็มที่ใช้สารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร	15
3.3	แสดงอัตราส่วนผสมของบีดอีเอ็มที่ใช้สารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร	15
3.4	แสดงการหยดสารละลายแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 1.6%, 1.8% และ 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร ที่อัตราส่วนต่างๆในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10%, 15% โดยมวลต่อปริมาตร	16
3.5	แสดงการเตรียมเม็ดบีดต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ	17
3.6	แสดงปริมาตรที่ต้องปิเปตจาก Stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ	18
3.7	แสดงน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ต้องชั่ง	19
3.8	แสดงการใส่บีดอีเอ็มที่แตกต่างกันในภาชนะต่างๆ	20
4.1	แสดงผลการทดลองเมื่อใช้ตัว Crosslink หรือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10% โดยมวลต่อปริมาตร	23
4.2	แสดงผลการทดลองเมื่อใช้ตัว Crosslink หรือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 15% โดยมวลต่อปริมาตร	26
4.3	แสดงเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยอีเอ็มจากหน่อกล้วย	34
4.4	แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของเม็ดบีดอีเอ็มจากหน่อกล้วยกับหญ้าดอกขาวในดิน	36
4.5	แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของเม็ดบีดอีเอ็มจากหน่อกล้วยกับหญ้าดอกขาวบนทิชชู่	37
4.6	แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของเม็ดบีดอีเอ็มจากหน่อกล้วยกับหญ้าดอกขาวในน้ำ	38

สารบัญรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมแอลจิเนต (Na-Alginate)	1
2.1	เทคนิคการหยดขึ้นรูปบีด (Extrusion technique)	6
2.2	โครงสร้าง Egg-box model	7
2.3	โครงสร้างของพิเพอรีน	8
2.4	เทคนิค Spread plate	9
2.5	ส่วนประกอบของเครื่อง Microtiter Plate Reader	10
2.6	หลักการทำงานของเครื่อง Fluid bed dryer	10
2.7	แสดงส่วนประกอบหลักของเครื่องยูวีวิสซิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	11
4.1	การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอีเอ็มจากหน่อกล้วยบน Petri dish ที่เวลา 24 ชั่วโมง	21
4.2	เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน (Fluid bed dryer)	30
4.3	กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า OD กับเวลาของเม็ดบีดที่ให้แห้งด้วยสองวิธี ที่ความเข้มข้นของแอลจิเนต 2% โดยมวลต่อปริมาตร	30
4.4	กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า OD กับเวลาของเม็ดบีดที่ให้แห้งด้วยสองวิธี ที่ความเข้มข้นแอลจิเนต 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร	31
4.5	กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า OD กับเวลาของเม็ดบีดที่ให้แห้งด้วยสองวิธี ที่ความเข้มข้นแอลจิเนต 2% และ1.8% โดยมวลต่อปริมาตร	31
4.6	กราฟมาตรฐานของอีเอ็มจากหน่อยกล้วยที่ความเข้มข้นต่างๆ	33
4.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสารกับเวลา ของเม็ดบีดแอลจิเนตความเข้มข้น 2% และ1.8% โดยมวลต่อปริมาตร	34
5.1	แสดงลักษณะของเม็ดบีดอีเอ็มที่เป็นทรงกลม (Spherical)	40

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALA	5-Aminolevulinic acid
Alg.	Alginate
B2	EM bead from alginate 1.8% w/v
C2	EM bead from alginate 2% w/v
EM	Effective microorganism
Fluid	Fluid bed dryer
G	α-L-guluronic acid
hr	Hour
M	β-D-mannuronic acid
mg/mL	Milligrams per milliliter
NA	Nutrient agar
Na-Alginate	Sodium Alginate
NB	Nutrient broth
OD	Optical density
rpm	Revolutions per minute
UV	Ultraviolet
%w/v	Weight by volume percent
%w/w	Weight by weight percent

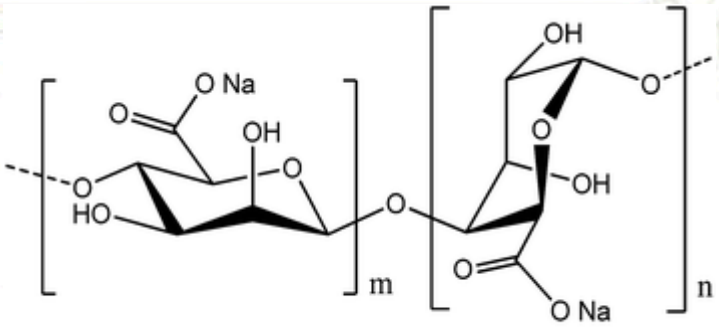
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ

วัชพืชเป็นปัญหาหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลง ในปัจจุบันการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชน่าจะเป็นวิธีที่สามารถลดปริมาณวัชพืชและควบคุมวัชพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เกษตกรจึงนิยมกำจัดวัชพืชโดยใช้สารเคมีเนื่องจากเห็นผลไว แต่การใช้สารเคมีกับการเกษตรจะเกิดผลเสียหายอย่างมากมาย เช่น เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคทำให้เกิดการสะสมสารพิษในร่างกาย ทำลายสิ่งแวดล้อม จึงมีการรณรงค์งดการใช้สารเคมีในการเกษตรและพบว่าอีเอ็ม (EM : Effective microorganism) จากหน่อกล้วยมีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืช ในส่วนหน่อกล้วยมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์อยู่จำนวนมากกว่าส่วนอื่นๆของกล้วย เนื่องจากอยู่ใกล้ดินที่สุด ดังนั้นการนำหน่อกล้วยหมักกับกากน้ำตาล จะทำให้ได้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืช *(1)*

แอลจิเนต เป็นสารที่สามารถสกัดได้จากผนังของสาหร่ายสีน้ำตาล เป็นพรีไบโอติก (Prebiotic) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ แอลจิเนตเป็นสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ (Polysacharide) มีลักษณะโครงสร้างเป็นโคพอลิเมอร์ ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ กรดแมนนูโรนิก (β-D-mannuronic acid) และกรดกูลูโรนิก (α-L-guluronic acid) ซึ่งสามารถเกิดเป็นเจลเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีประจุบวกชนิดไดวาเลนต์ เช่น แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ทำให้มีคุณสมบัติในการห่อหุ้ม (Encapsulation) สูง *(2)*



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมแอลจิเนต (Na-Alginate)

ในปี ค.ศ. 2003 Li และคณะ *(3)* ได้ทำการวิจัยศึกษาความก้าวหน้าของสารกำจัดวัชพืชจากเชื้อจุลินทรีย์และศึกษาการนำไปใช้ของเชื้อชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคนิโนมัยซีท (Actinomycete) โดยทำการวิเคราะห์สาร Phytotoxin ในแบคทีเรีย เชื้อรา และแอคนิโนมัยซีทเพื่อนำไปใช้ทดสอบการกำจัดวัชพืชหลากหลายชนิด ซึ่งพบว่า Phytotoxin ของแอคติโนมัยซีทมีฤทธิ์ในการกำจัดวัชพืช

ในปี ค.ศ. 2007 Farmowitz และคณะ *(1)* ได้ทำการวิจัยเรื่อง Effective microorganism (EM) หรืออีเอ็มที่มาจากกล้วย โดยทำการหมักหน่อกล้วยกับกากน้ำตาล และเรียกอีเอ็มจากหน่อกล้วยว่า Bokashi ซึ่งเป็นคำที่มาจากภาษาญี่ปุ่น หมายถึง การหมัก โดยพบว่าในอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีแร่ธาตุโพแทสเซียมสูงมากและยังมี Ergosterol ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อรา โดยในงานวิจัยนี้กล่าวอ้างถึงงานของ Kyan และคณะ (1999) ได้ค้นพบว่า ในอีเอ็มจากหน่อกล้วยประกอบไปด้วย แบคทีเรียกรดแลคติก, แบคทีเรียสังเคราะห์แสง, ยีสต์ และแอคติโนมัยซีท จากนั้นในปีเดียวกัน Daly และ Steward พบว่าใน 1 มิลลิลิตรของอีเอ็ม ประกอบไปด้วย *Streptomyces albus, Propionibacterium freudenreichil, Streptococcus lactis, Aspergillus oryzae, Mucor hiemalis, Saccharomyces cerevisaise Candida utillis, Lactobacillus sp., Rhodopseudomonas sp.* และ *Streptomycese griseus*

จากการวิจัยของ ดร.นภาวรรณ นพรัตนราภรณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ *(4)* ค้นพบว่า กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (5-Aminolevulinic acid หรือ ALA) เป็นสารกำจัดวัชพืชและสารกำจัดแมลงทางชีวภาพที่ไม่ทำลายพืชปลูกทางการเกษตรไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Pseudomonas riboflawin, Clostidium thermoaceticum, Methanogenecian berkari* และรวมถึงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) ซึ่งจะผลิตสาร ALA ได้ปริมาณสูง

จะเห็นได้จากงานวิจัยของ Kyan และคณะ (1999) ได้ค้นพบว่าในอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีสาร ALA ที่ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชได้และในหน่อกล้วยยังมีแอคติโนมัยซีท ซึ่งจากงานวิจัยของ Li และคณะ (2003) พบว่า Phytotoxin ของแอคติโนมัยซีทมีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืชเช่นกัน

จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า มีการเอนแคปซูเลชันของสารเคมีเพื่อใช้กำจัดวัชพืช ดังนี้

ในปี ค.ศ. 2011 Kamunee *(5)* ได้ศึกษาการเอนแคปซูเลชันของเพนดิเมทาลิน (Pendimethalin) ด้วยบีดแอลจิเนต โดยได้ทำการห่อหุ้มเพนดิเมทาลิน ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชอยู่ในกลุ่มสารเคมีที่ เรียกว่า ไดไนโตรอะนิลีน (Dinitroanilines) ซึ่งสารเคมีกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเฉพาะตัวด้านกายภาพของเนื้อสาร คือ มีสีเหลืองเข้ม จนเรียกกันว่า สารกำจัดวัชพืชสีเหลือง (Yellow herbicides) เป็นสารอันตราย *(6)*

โดยผลิตเม็ดบีดไคโทซานและไคโทซาน-แอลจิเนตเพื่อใช้ห่อหุ้มเพนดิเมทาลิน ใช้ในการกำจัดวัชพืชและควบคุมการงอกของวัชพืช

ในปี ค.ศ. 2013 Wang และคณะ *(7)* ใช้สารเคมีที่มีชื่อว่า พิคลอแรม (Picloram) ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชซึ่งพิคลอแรมจัดเป็นอนุพันธ์ที่มีคลอรีนของกรดพิโคลินิก (Picolinic acid) เป็นสารกำจัดวัชพืชกลุ่มไพริดีน และออกฤทธิ์ควบคุมการเจริญเติบโตของกลุ่มพืชที่สามารถสร้างฮอร์โมนออกซินได้ พิคลอแรมมีความคงตัวมากที่สุดในกลุ่มของสารเคมีกำจัดวัชพืช *(8)* โดยทำการห่อหุ้มพิคลอแรมด้วย Polyelectrolytes biopolymer ซึ่งก็คือ ไคโทซาน (Chitosan) และโซเดียมลิกโนซัลโฟเนต (Sodium lignosulfonate) เป็นชั้นสลับกัน และใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy) ในการตรวจวัดการปลดปล่อยของสาร

ดังนั้น จากงานวิจัยที่ผ่านมาจำนวนมากทำการเอนแคปซูเลชันสารเคมีในการกำจัดวัชพืชแต่ยังไม่มีการเอนแคปซูเลชันจุลินทรีย์ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้จุลินทรีย์จากหน่อกล้วยซึ่งเป็นโพรไบโอติก (Probiotic) หรือจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์แทนการใช้สารเคมีซึ่งมีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืชได้เช่นกัน ไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค และยังได้ทำการเติมสารพิเพอรีน (Piperine) ด้วย เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตหรือการงอกของวัชพืช โดยเลือกใช้แอลจิเนตมาห่อหุ้มอีเอ็ม เนื่องจากแอลจิเนตเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีราคาถูก ปลอดภัยต่อผู้บริโภค อีกทั้งแอลจิเนตเป็นพรีไบโอติกซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อีเอ็มเจริญได้ดี

ในงานวิจัยนี้ทำการผลิตบีดแอลจิเนตที่ห่อหุ้มอีเอ็มจากหน่อกล้วย และทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธีวัดหาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดความขุ่น (Optical density : OD) และสังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) และดูเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของสารโดยใช้เทคนิคยูวีวิสิเบิล-สเปกโตรสโคปีและทำการทดสอบการออกฤทธิ์กับวัชพืช ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกวัชพืชประเภทใบแคบ คือ หญ้าดอกขาว (*Leptochloa chinensis*) ใช้สำหรับทดสอบการออกฤทธิ์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ออกแบบเม็ดบีดแอลจิเนตที่ห่อหุ้มจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยได้
2. ทดสอบความสามารถของเม็ดบีดอีเอ็มในการควบคุมการงอกของวัชพืชได้

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ได้เม็ดบีดแอลจิเนตที่ห่อหุ้มจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม
2. ได้เม็ดบีดแอลจิเนตที่มีฤทธิ์ควบคุมการงอกของวัชพืชได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัชพืช (Weeds)

วัชพืชเป็นพืชที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยส่วนใหญ่มักไม่เป็นที่ต้องการของเกษตรกร เนื่องจากไม่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ ยังสร้างความเสียหายต่อพืชผลที่ปลูก เช่น แก่งแย่งสารอาหาร น้ำ แสงแดด ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการเกษตร เนื่องจากในสภาพธรรมชาติ วัชพืชมักมีโอกาสและความสามารถในการแย่งอาหารได้ดีกว่าพืชที่ปลูกไว้ เพราะวัชพืชมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดมายาวนานและวัชพืชมักจะมีจำนวนและความหนาแน่นสูง คนทั่วไปมักเข้าใจผิดว่าวัชพืช คือ“หญ้า” ซึ่งตามหลักวิทยาศาสตร์แล้ววัชพืชแบ่งออกเป็นประเภท ดังนี้

1. วัชพืชใบแคบ (Narrowleaf weed) หรือวัชพืชตระกูลหญ้า (Gramineae) บางครั้งอาจเรียกว่าวัชพืชใบแคบตระกูลหญ้า เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลำต้นกลมภายในกลวง มีข้อและปล้อง ใบจะแยกเป็นตัวใบและกาบใบ ตัวใบจะมีความกว้างและยาวแตกต่างกันมาก เส้นใบขนานกัน ไม่มีรากแก้ว เช่น หญ้าข้าวนก หญ้านกสีชมพู หญ้าดอกขาว หญ้าแดง
2. วัชพืชใบกว้าง (Broadleaf weed) ส่วนใหญ่เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ลำต้นอาจมีกิ่งก้านสาขา ตัวใบจะมีความกว้างและยาวแตกต่างกันน้อย เส้นใบสานเป็นร่างแห มีรากแก้ว เช่น ผักปอดนา ผักบุ้งเทียนนา
3. วัชพืชตระกูลกก (Sedge) ลักษณะคล้ายวัชพืชตระกูลหญ้า แต่ลำต้นไม่มีข้อไม่มีปล้อง ลำต้นมักเป็นรูปสามเหลี่ยมภายในตัน ใบไม่แยกเป็นกาบใบและแผ่นใบ ใบจัดเรียงตัวบนลำต้นเป็นแถว เช่น กกทราย กกสามเหลี่ยม กกขนาก หนวดปลาดุก
4. วัชพืชประเภทเฟิร์น (Fern) เป็นพืชชั้นต่ำ ไม่มีเมล็ด ขยายพันธุ์ด้วยส่วนของต้น และอับเรณู (Spore) เช่น ผักแว่น ผักกูดนา
5. วัชพืชประเภทสาหร่าย (Algae) เป็นพืชชั้นต่ำ มีรูปร่างอย่างง่ายๆ ประกอบด้วยเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์มาต่อกัน ราก ลำต้น และใบไม่มีความแตกต่างกัน เช่น สาหร่ายไฟ

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หญ้าดอกขาวเป็นวัชพืชประเภทใบแคบจัดเป็นพรรณไม้ล้มลุกขนาดเล็ก มีชื่ออื่นว่า หญ้าไม้กวาด หญ้าลิเก มีความสูง 12-120 เซนติเมตรเป็นพรรณไม้กลางแจ้งจัดเป็นพืชในเขตร้อนที่พบได้ทั่วไปในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ชอบขึ้นในสภาพพื้นที่ชื้นเมื่องอกแล้วสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำขัง แพร่โดยอาศัยน้ำพาไปและละอองจากดอกปลิวตามลม ขยายพันธุ์โดยเมล็ดและลำต้นส่งผลให้พืชที่ปลูกมีผลผลิตลดลงถึง 40%

2.2 จุลินทรีย์กำจัดวัชพืช (Microbial Herbicide)

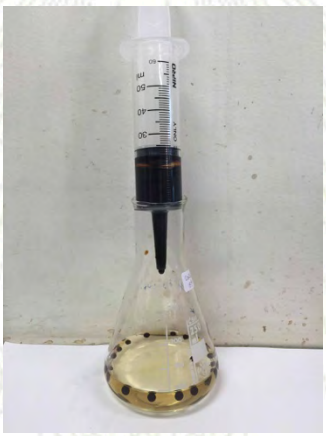
ปัจจุบันการกำจัดวัชพืชหรือควบคุมการเจริญเติบโตของวัชพืชนั้นมีวิธีที่หลากหลาย เช่น การใช้แรงงานคนในการถาง ถอน การใช้สารเคมี และไม่ใช้สารเคมี เป็นต้น ซึ่งการใช้สารเคมีในการกำจัดวัชพืชเป็นวิธีที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ เนื่องจากสะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง สารเคมีที่ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชที่สำคัญของการเกษตรไทยมีหลากหลายชนิด คือ Pendimethalin, Paraquat, Butachlor, Propanil, Fenoxaprop-p-ethyl, Pyrazosulfuron-ethyl *(9)* ซึ่งการใช้สารเคมี ถ้าใช้ไม่ถูกวิธีอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ สิ่งแวดล้อมได้ หรือทำให้เกิดการสะสมสารพิษต่อผู้บริโภคได้ จึงมีการรณรงค์ให้หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในการกำจัดวัชพืช

Microbial herbicide คือ การใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดวัชพืช ในงานวิจัยนี้เลือกใช้จุลินทรีย์จากหน่อกล้วย เนื่องจากในหน่อกล้วยมีจุลินทรีย์แอคนิโนมัยซีทและแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืช โดยการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดวัชพืช จะช่วยการลดปัญหาสภาพดินเป็นกรดซึ่งเป็นปัญหาที่มาจากการใช้สารเคมี เนื่องจากเมื่อสภาพดินเป็นกรดจะส่งผลให้พืชไม่สามารถดูดซึมสารอาหารในดินไปใช้ประโยชน์ได้

2.3 การห่อหุ้มเชื้อจุลินทรีย์ (Encapsulation of probiotic living cell)

การห่อหุ้มหรือเอนแคปซูเลชัน เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้บ่อยในการปกป้องแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยเป้าหมายของการห่อหุ้ม คือ การเพิ่มสิ่งแวดล้อมระดับไมโคร (Micro-environment) ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียมีชีวิตอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ ภายใต้การห่อหุ้มนี้โดยต้องมีสภาพที่เหมาะสม การห่อหุ้มเป็นวิธีทางเคมีกายภาพ (Physicochemical) หรือกระบวนการดักจับสารที่มีขนาดอนุภาคเล็กๆ เส้นผ่านศูนย์กลางระดับนาโนเมตรจนถึงมิลลิเมตรได้เป็นเม็ดบีดหรือแคปซูลที่มีขนาดเล็กโดยมีสารแอคทีฟ (Active agent) อยู่แกนกลาง ซึ่งถูกล้อมด้วยสารที่ใช้เอนแคปซูเลชัน สารที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มนี้มีหลายประเภท ทั้งพอลิเมอร์, คาร์โบไฮเดรต, ไขมัน และขี้ผึ้ง ขึ้นอยู่กับสารแอคทีฟที่แกนกลาง ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้สารพอลิเมอร์ เช่น แอลจิเนต (Alginate), ไคโตซาน (Chitosan) หรือคาราจีแนน (Carrageenan) ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการเกิดเจล การห่อหุ้มหรือเอนแคปซูเลชันโพรไบโอติกมีวิธีต่างๆมากมาย เช่น

การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray-drying), การพ่นฝอยแบบเย็น (Spray-cooling), การทำให้เป็นเม็ดด้วยเทคนิคฟลูอิดเบดและการเคลือบ (Fluid-bed agglomeration and coating), การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและสุญญากาศ (Freeze and vacuum-drying, Emulsion-based techniques), Coacervation และเทคนิคการหยดขึ้นรูปบีดในไมโครสเฟียร์ (Extrusion techniques to encapsulate in microspheres) การเลือกเทคนิคในการห่อหุ้มโพรไบโอติกที่ดีที่สุดต้องคำนึงถึงขนาดของโพรไบโอติกและการมีชีวิตรอดเมื่อทำการห่อหุ้มแล้ว พบว่าวิธีการหยดขึ้นรูปบีดหรือ Extrusion เป็นวิธีที่นิยมมาก เนื่องจากไม่ทำลายสารแอคทีฟเพราะไม่มีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิอีกทั้งยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและมีราคาถูกกว่าวิธีอื่นๆ *(10)*



รูปที่ 2.1 เทคนิคการหยดขึ้นรูปบีด (Extrusion technique)

2.4 ลักษณะทั่วไปของอีเอ็ม แอลจิเนต พิเพอรีน

2.4.1 อีเอ็ม (EM : Effective microorganism)

ได้จากการนำหน่อกล้วยที่ต้นสมบูรณ์ไม่เป็นโรค ความสูงไม่เกิน 1 เมตร จากพื้นดินโดยขุดมาทั้งเหง้าและรากและไม่ต้องล้างดินออกมาหมักกับกากน้ำตาลในอัตราส่วนผสม หน่อกล้วย 3 ส่วน กากน้ำตาล (Molasses) 1 ส่วน จนครบ 7 วัน จะได้ “หัวเชื้อจุลินทรีย์หน่อกล้วย” ลักษณะของอีเอ็มจากหน่อกล้วย คือ เป็นของเหลว มีความข้น มีสีน้ำตาลถึงดำ มีกลิ่นหอมอมเปรี้ยวและกลิ่นของแอลกอฮอล์ เกิดเนื่องจากการหมักของน้ำตาลและจุลินทรีย์ โดยก่อนนำมาใช้งานต้องทำการกรองกากของหน่อกล้วยออกให้หมดเหลือน้ำหมักหัวเชื้อจุลินทรีย์ ที่นำมาใช้งานได้ ซึ่งอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีประโยชน์ ดังนี้ *(1)*

- ใช้ปรับปรุงโครงสร้างของดินและกำจัดเชื้อโรคในดิน
- ใช้ป้องกันกำจัดโรคพืช
- ใช้ปรับปรุงคุณภาพน้ำในร่องสวน สระเก็บน้ำ และบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ
- ใช้ทำความสะอาดคอกสัตว์

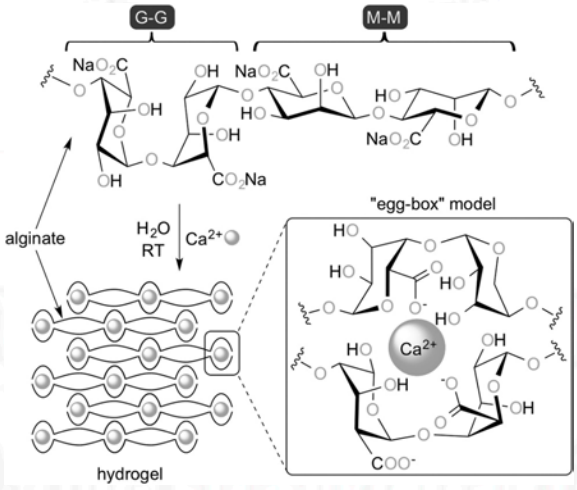
- เร่งการย่อยสลายเศษซากอินทรียวัตถุหรือดับกลิ่นเน่าเหม็นของขยะ
- ใช้กำจัดวัชพืช

โดยคุณสมบัติสำหรับใช้กำจัดวัชพืชของอีเอ็มจากหน่อกล้วย เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในอีเอ็ม ประกอบไปด้วย แบคทีเรียกรดแลคติก, แบคทีเรียสังเคราะห์แสง, ยีสต์ และแอคติโนมัยซีท *S.albus, P. freudenreichii, S. lactis, A. oryzae, M. hiemalis, S. cerevisiae, C. utilis, Lactobacillus sp., Rhodopseudomonas sp.* และ *S. griseus*

พบว่าในอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มี ALA หรือ กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ปริมาณสูง ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชและสารกำจัดแมลงทางชีวภาพที่ไม่ทำลายพืชปลูกทางการเกษตร ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ และในอีเอ็มจากหน่อกล้วยยังมี Phytotoxin ของแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืชเช่นกัน

2.4.2 แอลจิเนต (Alginate)

แอลจิเนต เป็นไบโอพอลิเมอร์ (Biopolymer) ส่วนใหญ่จะใช้สำหรับการห่อหุ้มสารหรือที่เรียกว่า เอนแคปซูเลชัน แอลจิเนตสามารถสกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล โดยแอลจิเนตในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของพอลิแซคคาไรด์ประกอบด้วย มอนอเมอร์ของ β-D-mannuronic acid (M) และ α-L-guluronic acid (G) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ 1-4 glycosidic linkages และสามารถเกิดได้ทั้งแบบ Homopolymeric M-Block (M-M), Homopolymeric G-Block (G-G) และ Heteropolymeric MG-Block (M-G) ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของแอลจิเนต เช่น ถ้าพอลิเมอร์มี G ในปริมาณสูง จะมีคุณสมบัติเป็นเจลที่แข็ง แต่ถ้าพอลิเมอร์มี M ปริมาณสูง จะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่ม แอลจิเนตสามารถเกิดเป็นไฮโดรเจลได้ง่าย เมื่อทำปฏิกิริยากับ Divalent cation เช่น Ca^{2+} ซึ่ง Ca^{2+} จะจับกับ Caboxlylate ในตำแหน่ง G-Block และเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า Egg-box model *(2)*

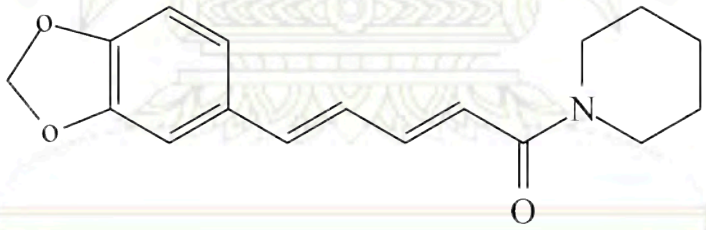


รูปที่ 2.2 โครงสร้าง Egg-box model

แอลจิเนตเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการห้อหุ่มสารต่างๆ เช่น ยา อาหาร หรือโพรไบโอติกแบคทีเรีย เนื่องจากแอลจิเนตเป็นพรีไบโอติก ไม่มีพิษ สามารถขึ้นรูปบีดได้ง่าย และมีราคาถูก และเมื่อแอลจิเนตละลายน้ำแล้วจะได้ สารละลายที่มีความหนืด โดยความหนืดของสารละลายแอลจิเนตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอลจิเนตเอง ซึ่งการละลายของแอลจิเนตขึ้นกับ pH ของตัวทำละลายด้วย ถ้า pH ต่ำกว่า 3 จะส่งผลให้แอลจิเนตตกตะกอนเป็นแอลจินิกแอซิด (Alginic acid) แอลนิเจตถูกทำมาใช้ห่อหุ้มโพรไบโอติก (Probiotic) หรือแบคทีเรีย เนื่องจากไม่ทำให้เซลล์ตาย เพิ่มประสิทธิภาพการอยู่รอดของโพรไบโอติก ทำให้เซลล์สามารถทนสภาพความเป็นกรดได้ ป้องกันเซลล์จากการถูกแรงกระแทกจากภายนอกได้ *(11)*

2.4.3 พิเพอรีน (Piperine)

พิเพอรีน (Piperine) เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทแอลคาลอยด์ (Alkaloid) ที่มีธาตุไนโตรเจนอยู่ภายในโมเลกุล สามารถสกัดได้จากพริกไทยดำ มีฤทธิ์ในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเจริญของมะเร็ง หน้าที่ของแอลคาลอยด์ในพืชยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่าอาจเป็นแหล่งสะสมไนโตรเจน เพื่อสร้างโปรตีนควบคุมการเจริญเติบโตหรือการงอกของเมล็ดพืชบางชนิด ช่วยป้องกันพืชจากแมลง ดังนั้น พิเพอรีนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชให้กับอีเอ็มจากหน่อกล้วย*(12)*



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของพิเพอรีน

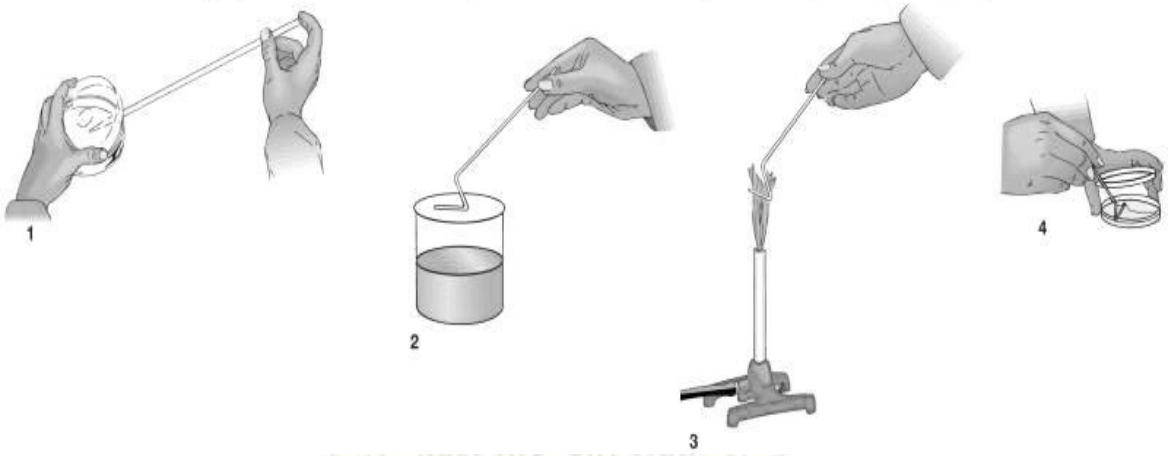
สูตรโมเลกุล	$C_{17}H_{19}NO_3$
ชื่อ IUPAC	1-[5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidine
ลักษณะทางกายภาพ	ของแข็ง มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น มีความเผ็ดร้อนเมื่อสัมผัส
ความสามารถในการละลาย	ไม่ละลายในน้ำ ละลายได้ดีในเอทานอล

2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เป็นวิธีการตรวจสอบว่าเชื้อจุลินทรีย์ยังมีชีวิตอยู่และใช้นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีวิธีการหลากหลาย แต่ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ คือวิธี Plate count ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ Pour plate, Spread plate, Drop plate, Membrane filtration และการวัดหาค่าความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่น (ค่า OD)

2.5.1 Spread plate

Spread plate เป็นวิธีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารที่มีอาหารซึ่งแข็งตัวแล้ว (Nutrient Agar : NA) เชื้อจุลินทรีย์จะถูกแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Spreader) ซึ่งวิธีนี้จะทำให้สังเกตเห็นโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย *(13)*

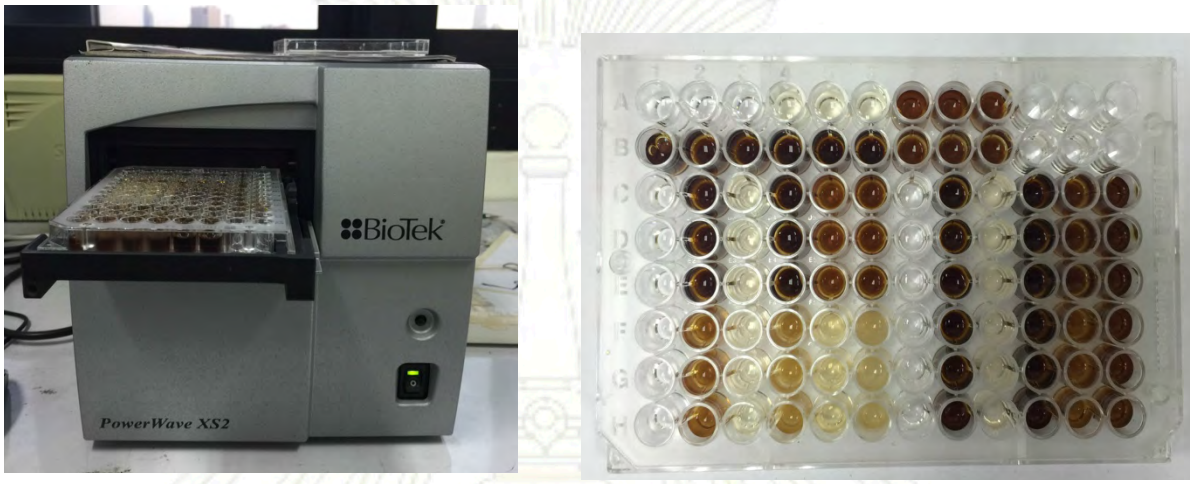


รูปที่ 2.4 เทคนิค Spread plate

2.5.2 การวัดหาค่าความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่น

ใช้หลักการดูดกลืนคลื่นแสงที่ไม่เท่ากันของจำนวนจุลินทรีย์ที่มากขึ้น ปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้และกระจายออกเป็นสัดส่วนกับความหนาแน่นของเซลล์ เครื่องมือที่ใช้ คือ เครื่อง Microtiter Plate Reader โดยการใช้ไมโครเพลท 96 หลุม ใส่สารแขวนลอยจุลินทรีย์ ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบน้ำ (Nutrient Broth : NB) แล้วนำไปบ่มเชื้อ โดยหลักการของเครื่อง Microtiter plate reader จะวัดค่า OD (Optical density) หรือการวัดความขุ่นของสารละลาย โดยการอ่านค่าเปอร์เซ็นต์แสงที่ผ่านสารละลายออกมา (%Transmittance) ถ้าสารละลายขุ่นมากเปอร์เซ็นต์ที่แสงจะผ่านออกมาได้น้อย โดยค่า OD จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นหรือจำนวนเซลล์

ข้อดีของวิธีนี้ คือ สะดวก รวดเร็ว หาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับจำนวนเซลล์ได้ด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ ข้อเสีย คือ เชื้อที่นำมาวัดต้องมีความขุ่นมากพอ *(14)*



(a) (b)

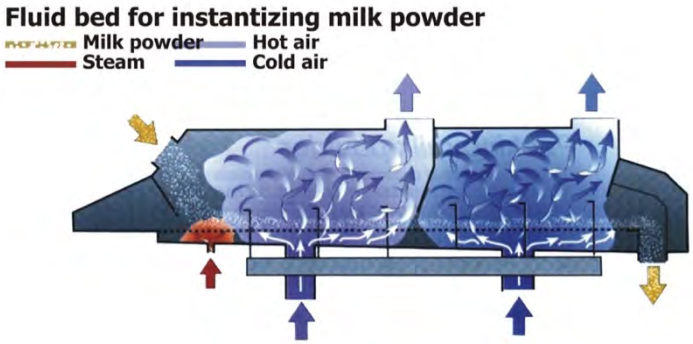
รูปที่ 2.5 ส่วนประกอบของเครื่อง Microtiter Plate Reader

(a) เครื่อง Microtiter Plate Reader

(b) ไมโครเพลท 96 หลุม

2.6 เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน (Fluid bed dryer)

เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน (Fluid bed dryer) คือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำแห้ง (Dehydration) ที่ใช้ลมร้อนเป่าผ่านชั้นวัสดุ (bed) ทำให้วัสดุลอยตัวเป็นอิสระเกิดการคลุกเคล้าและสัมผัสกับลมร้อนอย่างสม่ำเสมอ มีอัตราการถ่ายเทความร้อนและมวลสูง สามารถลดความชื้นของวัสดุลงได้อย่างรวดเร็วเหมาะกับใช้ทำแห้งวัสดุที่เป็นเม็ดเล็กที่มีรูปทรงและขนาดสม่ำเสมอ เช่น เมล็ดธัญพืช (Cereal grain) ถั่ว (Legume) เป็นต้น *(15)*

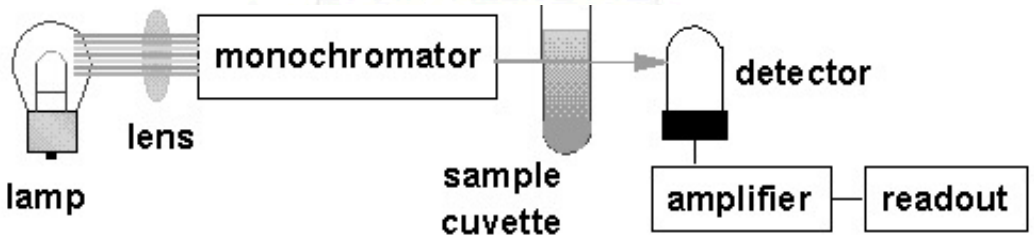


รูปที่ 2.6 หลักการทำงานของเครื่อง Fluid bed dryer

2.7 เทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy)

เทคนิคยูวีวิสซิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของสาร ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณโดยอาศัยการดูกลืนแสงของสาร เทคนิคนี้จัดเป็นพื้นฐานที่สำคัญที่มีการใช้อย่างมาก เนื่องจากมีความรวดเร็วในการวิเคราะห์ มีความแม่นยำสูง วิเคราะห์ปริมาณสารได้น้อยถึงระดับไมโครกรัม แม้ว่าสารที่ต้องการวิเคราะห์นั้นจะอยู่ในสารละลายผสม

ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า Intensity ในช่วงรังสียูวี (180-350 นาโนเมาตร) และช่วงแสงที่ตามองเห็น (350-780 นาโนเมตร) ที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงในช่วงรังสียูวีหรือแสงที่ตามองเห็นที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสง แล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง *(16)*



รูปที่ 2.7 แสดงส่วนประกอบหลักของเครื่องยูวีวิสซิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. แหล่งกำเนิดแสง (Light source) การวัดการดูดแสงในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นจะใช้ดวงไฟทังสเตน (Tungsten lamp) ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 340-800 นาโนเมตร ส่วนการวัดการดูดแสงในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตจะใช้ดวงไฟไฮโดรเจน (Hydrogen lamp) หรือดวงไฟดิวเทอเรียม (Deuterium lamp) ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 200-340 นาโนเมตร เนื่องจากดวงไฟชนิดหลังนี้มีราคาสูง

เมื่อไม่มีการใช้งานในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตควรต้องปิดดวงไฟชนิดนี้ในเครื่องมือที่มีการติดตั้งดวงไฟทั้ง 2 ชนิดนี้ไว้ด้วยกัน

2. ตัวทำแสงเอกรงค์ (Monochromator) ทำหน้าที่คัดเลือกแสงที่ออกจากแหล่งกำเนิดแสงให้ได้แถบแสงเอกรงค์หรือแสงความยาวคลื่นเดี่ยว (Monochromatic light) ตามต้องการโดยการใช้ปริซึม (Prism) หรือ เกรตติง (Diffraction grating)

3. หลอดบรรจุสารตัวอย่างหรือคิวเวต (Cuvette) ทำจากแก้วควอทซ์ (Quartz) หรือพลาสติก เช่น พอลิเมทราคลิเลต (Polymethacrylate) และพอลิสไตรีน (Polystyrene) รูปทรงที่ผลิตขึ้นมีหลายแบบ แต่ที่พบกันทั่วไปเป็นแบบหลอดสี่เหลี่ยมจัตุรัสและแบบหลอดทดลองทุกแบบส่วนใหญ่มีระยะทางที่แสงส่องผ่านเท่ากับ 1 เซนติเมตร การวิเคราะห์ในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นใช้หลอดที่ทำจากวัสดุชนิดใดก็ได้ แต่การวิเคราะห์ในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตต้องจำเพาะใช้แต่หลอดที่ทำจากควอทซ์เท่านั้น เนื่องจากวัสดุชนิดอื่นสามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นนี้ได้ทำให้ค่าการดูดแสงที่วัดได้ไม่ถูกต้อง

4. อุปกรณ์ตรวจวัดแสง (Detector) เมื่อแสงผ่านสารตัวอย่างออกมา หลอดรับแสง (Photo-multiplier tube) ทำหน้าที่วัดความเข้มของแสงที่ผ่านออกมาจากสารละลายโดยเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานไฟฟ้า แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้านั้นต่อไปยังมาตรหรือเครื่องบันทึกข้อมูล

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

1. EM (Effective microorganism)
2. Sodium Alginate (Food Grade) บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด
3. Piperine บริษัท ซิกม่า-อัลดริช (ประเทศไทย) จำกัด
4. Calcium chloride ($CaCl_2$) บริษัท Ajax Finechem Pty. Ltd.
5. Ethanol (Absolute) บริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน จำกัด
6. Mueller Hinton Broth บริษัท Hi Media Laboratories Pvt. Ltd.
7. Agar Powder ตรานางเงือก

3.2 เครื่องมือ

1. Fluid bed dryer รุ่น Tornado Model 501 บริษัท เชอร์วู้ด เคมิคอล จำกัด (มหาชน)
2. Homogenizer รุ่น RW20 Digital Mechanical Overhead Stirrer,Mixer,100-150V บริษัท IKA Works GmbH & Co.
3. Microtiter Plate Reader รุ่น Powerwave XS2 บริษัท Biotex Instruments, Inc.
4. UV-visible spectrophotometer รุ่น Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System
5. Incubator shaker รุ่น KS 4000 i control บริษัท IKA Works GmbH & Co.
6. Autoclave

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อดูการเจริญของจุลินทรีย์

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น (Nutrient Agar : NA)

1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mueller Hinton Broth) 4.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ชั่งผงวุ้นน้ำหนัก 2 กรัม ใส่ลงในสาละลายโดยให้ความร้อนในการละลายจนสมบูรณ์ จะได้สารละลายสีเหลืองใส จากนั้นบรรจุใส่ Reagent bottle นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2 พักอาหารทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ให้อุณหภูมิลดลงในระดับที่มือสัมผัสได้ จากนั้นเท NA ลงใน Petri dish ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นและแข็งตัว เก็บไว้ในตู้เย็น

1.3 นำ Petri dish มาอบในตู้อบอุณหภูมิ 37°C โดยคว่ำจานลง เพื่อกำจัดไอน้ำที่เกาะอยู่ผิวหน้าอาหาร เมื่อผิวหน้าแห้ง ตรวจสอบดูว่าอาหารไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยสังเกตที่ผิวของอาหารต้องเรียบและใส จึงนำมาใช้งานได้

2) เตรียมตู้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เช็ดตู้เลี้ยงเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ และเปิดรังสียูวีทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

3) การ Spread plate

3.1 ดูดอีเอ็มจากหน่อกล้วย 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน Petri dish เกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอที่ฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง

3.2 นำไปบ่มด้วยตู้บ่มเชื้อ (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วในการเขย่า 150 rpm สังเกตการเจริญของเชื้อจุลิทรีย์ที่เวลา 5, 10, 24 ชั่วโมง

3.3.2 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลายพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อมวล ของแอลจิเนต โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

2) เตรียมสารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 1.6% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อัตราส่วนตัวทำละลาย 20:80, 15:85 และ 10:90 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนผสมของบีดอีเอ็มที่ใช้สารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 1.6% โดยมวลต่อปริมาตร

ชื่อสูตร	แอลจิเนต (กรัม)	อีเอ็ม (มิลลิลิตร)	น้ำ (มิลลิลิตร)	พิเพอรีน (กรัม)
A1	1.6	20	80	0.016
A2	1.6	15	85	0.016
A3	1.6	10	90	0.016

3) เตรียมสารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อัตราส่วนตัวทำละลาย 20:80, 15:85 และ 10:90 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 แสดงอัตราส่วนผสมของบีดอีเอ็มที่ใช้สารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร

ชื่อสูตร	แอลจิเนต (กรัม)	อีเอ็ม (มิลลิลิตร)	น้ำ (มิลลิลิตร)	พิเพอรีน (กรัม)
B1	1.8	20	80	0.018
B2	1.8	15	85	0.018
B3	1.8	10	90	0.018

4) เตรียมสารละลายแอลจิเนต ความเข้มข้น 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อัตราส่วนตัวทำละลาย 20:80, 15:85 และ 10:90 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 แสดงอัตราส่วนผสมของบีดอีเอ็มที่ใช้สารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร

ชื่อสูตร	แอลจิเนต (กรัม)	อีเอ็ม (มิลลิลิตร)	น้ำ (มิลลิลิตร)	พิเพอรีน (กรัม)
C1	2.0	20	80	0.020
C2	2.0	15	85	0.020
C3	2.0	10	90	0.020

5) เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10%, 15% โดยมวลต่อปริมาตร

5.1 ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

5.2 ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

6) สารละลายแอลจิเนตที่เตรียมต้องนำไปปั่นให้แอลจิเนตละลายและมีความเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง Homogenizer ที่ความเร็วประมาณ 800-1000 rpm เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง

3.3.3 การเตรียมบีดและการหาอัตราส่วนที่เหมาะสม

1) หยดสารละลายแอลจิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆด้วย Syringe ขนาด 50 มิลลิลิตรลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มเข้มต่างๆ แช่บีดทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้บีดเกิดการห่อหุ้มที่สมบูรณ์ จากนั้นล้างด้วยน้ำ DI

ตารางที่ 3.4 แสดงการหยดสารละลายแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 1.6%, 1.8% และ2.0% โดยมวลต่อปริมาตร ที่อัตราส่วนต่างๆในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10%, 15% โดยมวลต่อปริมาตร

ความเข้มข้น $CaCl_2$	Alginate 1.6% w/v			Alginate 1.8% w/v			Alginate 2.0% w/v		
10% w/v	15:85	20:80	10:90	15:85	20:80	10:90	15:85	20:80	10:90
15% w/v	15:85	20:80	10:90	15:85	20:80	10:90	15:85	20:80	10:90

2) การทำบีดให้แห้ง

2.1 การทำบีดให้แห้งด้วยอากาศ

นำบีดที่ได้พักในกระจกนาฬิกา ตั้งทิ้งไว้ในที่อากาศถ่ายเท เป็นเวลา 2 วัน

2.2 การทำบีดให้แห้งด้วยเครื่อง Fluid bed dryer

นำบีดที่ได้ใส่ในโถสแตนเลสของเครื่อง Fluid bed dryer ใส่โถให้ตรงล็อกของเครื่อง ครอบด้วยถุงผ้า ตั้งค่าเครื่องที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วลม 25 เมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.4 การทดสอบการเจริญของเชื้อด้วย Microtiter Plate Reader

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำ (Nutrient Broth : NB)

1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mueller Hinton Broth) 4.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ให้ความร้อนในการละลายจนสมบูรณ์ จะได้สารละลายสีเหลืองใส จากนั้นบรรจุใส่ Reagent bottle นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2 พักอาหารทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ให้อุณหภูมิลดลงในระดับที่มือสัมผัสได้ เก็บในตู้เย็น

1.3 นำอาหารมาอบในตู้อบอุณหภูมิ 37°C ตรวจสอบดูว่าอาหารไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยสังเกตจากอาหารต้องมีลักษณะสีเหลืองใส จึงนำมาใช้งานได้

2) เตรียมตู้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.1 เช็ดตู้เลี้ยงเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ และเปิดรังสียูวีทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ

3) เตรียมเลี้ยงเชื้อจากเม็ดบีด

3.1 ชั่งเม็ดบีดต่างๆหนัก 0.5 กรัม ใส่ในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำ 10 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.5 แสดงการเตรียมเม็ดบีดต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดของเม็ดบีด	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาตรอาหาร(มิลลิลิตร)
C2 (2% w/v) ที่ทำแห้งด้วย Fluid bed dryer	0.5	10
C2 (2% w/v) ที่ทำแห้งด้วยอากาศ	0.5	10
B2 (1.8% w/v) ที่ทำแห้งด้วย Fluid bed dryer	0.5	10
B2 (1.8% w/v) ที่ทำแห้งด้วยอากาศ	0.5	10

4) วัดค่า OD ของการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง

4.1 ปิเปตสารละลายเชื้อทั้งหมด 4 หลอดปริมตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำเป็น Blank

4.2 นำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย

3.3.5 การหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสารด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy)

1) การเตรียมสาร

1.1 เตรียม Stock solution ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งอีเอ็มหนัก 5000 มิลลิกรัม ใส่ขวดกำหนดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดกำหนดปริมาตร

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการปิเปต Stock solution ใส่ขวดกำหนดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาตรที่ต้องปิเปตจาก Stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ขวดที่	ปริมาตร Stock solution (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	1.25	23.75	0.5
2	2.50	22.50	1.0
3	3.75	21.25	1.5
4	5.00	20.00	2.0
5	6.25	18.75	2.5
6	7.50	17.50	3.0

1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 และ B2 ที่ Crosslink ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 15% โดยมวลต่อปริมาตร ใส่ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดกำหนดปริมาตร นำไปกวนโดยใช้เครื่อง Magnetic stirrer

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.7 แสดงน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ต้องชั่ง

ขวดที่	ชนิดของสารตัวอย่าง	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
1	บีดอีเอ็ม สูตร C2	100	100
2	บีดอีเอ็ม สูตร B2	100	100

2) การหาค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

2.1 นำสารละลายมาตรฐานทุกความเข้มเข้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.2 นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้จากเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 และ B2 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ทุกครั้งที่ปิเปตสารละลายตัวอย่างมาวัด ต้องเติมน้ำกลั่นกลับในปริมาตรที่เท่ากัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ 2, 4, 7, 11, 14, 18 วัน

3) การหาเปอร์เซ็นการปลดปล่อยของบีด (%Release)

3.1 สร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลายมาตรฐานกับค่าความเข้มต่างๆ

3.2 หาความเข้มของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.3 คำนวณเปอร์การปลดปล่อยของสารตัวอย่าง (%EM release) ทุกช่วงเวลา 2, 4, 7, 11, 14, 18 วัน จากสูตร

$$\%\text{EM release} = \frac{\textbf{EM release per milligram of beads}}{\textbf{Total weight of beads (milligram)}} \times 100$$

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดวัชพืชและควบคุมการงอกของวัชพืช

สังเกตการเจริญของหญ้าดอกขาว 1 วัน, 1, 2, 3 สัปดาห์

1) เตรียมกระถางใส่ดินประมาณ 2/4 ของกระถาง ใส่หญ้าดอกขาวประมาณ 0.5 กรัม
2) เตรียมกระดาษทิชชู่ 1 แผ่น วางในภาชนะใส จากนั้นใส่น้ำสะอาดปริมาณ 2/4 ของภาชนะ และใส่หญ้าดอกขาวประมาณ 0.5 กรัม
3) เตรียมภาชนะใสใส่น้ำสะอาดปริมาณ 3/4 ของภาชนะ ใส่หญ้าดอกขาวประมาณ 0.5 กรัม

ตารางที่ 3.8 แสดงการใส่บีดอีเอ็มที่แตกต่างกันในภาชนะต่างๆ

ภาชนะที่	หญ้าที่ปลูกในดิน	หญ้าที่ปลูกบนทิชชู่	หญ้าที่ปลูกในน้ำ
1	ไม่ใส่บีดอีเอ็ม	ไม่ใส่บีดอีเอ็ม	ไม่ใส่บีดอีเอ็ม
2	ใส่บีดอีเอ็มสูตร C2 หนัก 1 กรัม	ใส่บีดอีเอ็มสูตร C2 หนัก 1 กรัม	ใส่บีดอีเอ็มสูตร C2 หนัก 1 กรัม
3	ใส่บีดอีเอ็มสูตร B2 หนัก 1 กรัม	ใส่บีดอีเอ็มสูตร B2 หนัก 1 กรัม	ใส่บีดอีเอ็มสูตร B2 หนัก 1 กรัม

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอีเอ็มจากหน่อยกล้วย

จากการทดลอง เมื่อนำอีเอ็มมา Spread plate และนำไปบ่มด้วยตู้บ่มเชื้อ (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วในการเขย่า 150 rpm สังเกตการเจริญของเชื้อจุลิทรีย์ที่เวลา 5, 10, 24 ชั่วโมง

พบว่าที่เวลา 5 ชั่วโมง Petri dish ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ ดังนั้นจึงบ่มเชื้อทิ้งไว้จนครบเวลาที่ 10 ชั่วโมง Petri dish ก็ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ จึงบ่มเชื้อต่อจนครบเวลาที่ 24 ชั่วโมง พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์เจริญขึ้นใน Petri dish ทั้ง 3 เพลท ดังนั้นจากผลการทดลอง แสดงว่าในน้ำหมักอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่จริง

(a) (b) (c)

รูปที่ 4.1 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอีเอ็มจากหน่อกล้วยบน Petri dish ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(a) อีเอ็มจากหน่อกล้วย

(b) อีเอ็มจากหน่อกล้วยที่ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

(c) อีเอ็มจากหน่อกล้วยที่ผสมกับน้ำสะอาด

จากผลการทดลอง พบว่าเพลท (a) มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อย่างหนาแน่น แสดงว่าในอีเอ็มมีเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมาก ส่วนเพลท (b) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีเห็นเป็นโคโลนีชัดเจน และเพลท (c) เมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำ พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตขึ้นซึ่งแสดงถึงการนำไปใช้ที่ได้ผล เนื่องจากต้องนำเชื้อไปปลดปล่อยในน้ำเมื่อใช้งานจริง ซึ่งจากเพลท (c) ทำให้ทราบได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยจะไม่ตาย เมื่อนำไปใช้กำจัดและควบคุมวัชพืชที่อยู่ในน้ำหรือในดินชื้นแฉะ ดังนั้น จากผลการทดลอง แสดงว่าในน้ำหมักอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่จริง

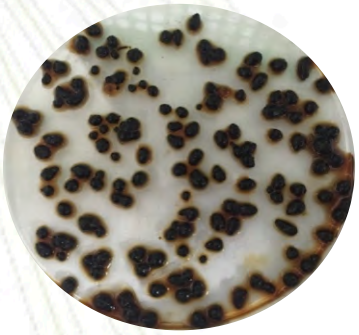
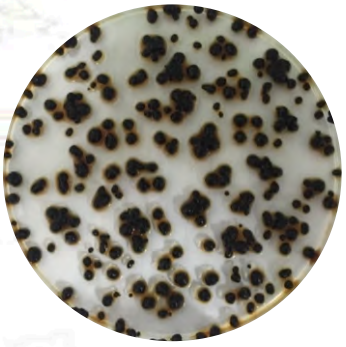
4.2 การขึ้นรูปบีด

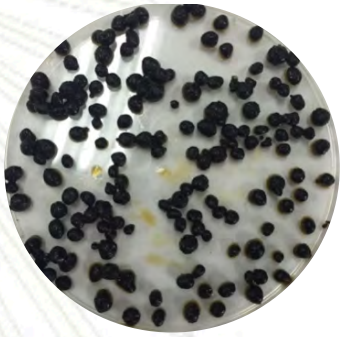
จากการทดลองมีการเตรียมสารละลายแอลจิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ (1.6%, 1.8% และ2.0% โดยมวลต่อปริมาตร) และตัวทำละลายที่อัตราส่วนต่างๆ อีเอ็ม:น้ำกลั่น (20:80, 15:85 และ10:90) และความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ต่างๆ (10%, 15% โดยมวลต่อปริมาตร) ซึ่งการขึ้นรูปบีดนี้ต้องทำการทดลองโดยการสับเปลี่ยนความเข้มข้น อัตราส่วนต่างๆอย่างครบถ้วนเพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุด (Optimum condition) ของการขึ้นรูปบีด โดยลักษณะที่งานวิจัยนี้ต้องการ คือ

- ความเป็นเนื้อเดียวกันของสาร
- ลักษณะของบีดที่มีลักษณะเป็นทรงกลม (Spherical)
- ความยากง่ายในการหยดบีด
- ความแห้งของบีด

โดยควบคุมระยะเวลาในการเกิดบีดหรือให้บีดเกิดการห่อหุ้มสมบูรณ์ที่เวลา 30-45 นาที ผลการทดลองที่ได้เป็นดังนี้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดลองเมื่อใช้ตัว Crosslink หรือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10% โดยมวลต่อปริมาตร

ความเข้มข้นแอลจิเนต	อัตราส่วนตัวทำละลาย	ผลการทดลอง
1.6% w/v	20:80	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเหลวมาก สารละลายมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันแต่ขึ้นรูปบีดได้ยาก ทำให้ได้บีดที่ขนาดเล็กใหญ่ต่างกัน เมื่อหยดบีดในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีดแต่ได้บีดที่อ่อนตัวมาก และเมื่อพักทิ้งไว้ บีดไม่แห้ง ดังภาพ 
1.6% w/v	15:85	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเหลวมากกว่าอัตราส่วน 20:80 สารละลายมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันแต่ขึ้นรูปบีดได้ยาก ส่วนใหญ่จะได้บีดที่มีขนาดเล็ก เมื่อหยดบีดในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่ได้บีดที่อ่อนตัวมาก และเมื่อพักทิ้งไว้ บีดไม่แห้ง ดังภาพ 
1.6% w/v	10:90	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเหลวมากกว่าอัตราส่วน 15:85 สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแต่ไม่สามารถขึ้นรูปบีดได้ เนื่องจากเมื่อหยดบีดในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v ไม่เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด

ความเข้มข้นแอลจิเนต	อัตราส่วนตัวทำละลาย	ผลการทดลอง
1.8% w/v	20:80	พบว่า สารละลายแอลจิเนตไม่ค่อยเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อหยดสารละลายแอลจิเนตในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด และได้บีดขนาดใหญ่กว่า 15:85 แต่เม็ดบีดมีลักษณะอ่อนตัวและเมื่อนำไปพักให้แห้ง พบว่าเม็ดบีดไม่แห้ง ดังภาพ 
1.8% w/v	15:85	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเป็นเนื้อเดียวกันดี แต่สารละลายมีความหนืด เมื่อหยดสารละลายแอลจิเนตในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เม็ดบีดมีลักษณะอ่อนตัว และเมื่อนำไปพักให้แห้ง พบว่าเม็ดบีดไม่แห้ง ดังภาพ
1.8% w/v	10:90	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเป็นเนื้อเดียวกัน แต่มีลักษณะเหลวมาก ทำให้ควบคุมการหยดบีดยาก เมื่อหยดสารละลายแอลจิเนตในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เม็ดบีดมีลักษณะอ่อนตัวและเมื่อนำไปพักให้แห้ง พบว่า เม็ดบีดไม่แห้ง ดังภาพ

ความเข้มข้นแอลจิเนต	อัตราส่วนตัวทำละลาย	ผลการทดลอง
2.0% w/v	20:80	พบว่า สารละลายแอลจิเนตไม่ค่อยเป็นเนื้อเดียวกันและมีความหนืดมาก ทำให้มีปัญหาในการหยดบีด และบีดที่ได้มักจะมีลักษณะมีหาง (Tail) เมื่อหยดสารละลายแอลจิเนตในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เม็ดบีดมีลักษณะอ่อนตัว และเมื่อนำไปพักให้แห้ง พบว่าเม็ดบีดไม่แห้ง ดังภาพ
2.0% w/v	15:85	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเป็นเนื้อเดียวกัน บีดที่ได้มักจะมีลักษณะมีหาง (Tail) เมื่อหยดสารละลายแอลจิเนตในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เม็ดบีดมีลักษณะอ่อนตัวและเมื่อนำไปพักให้แห้ง พบว่าเม็ดบีดไม่แห้ง ดังภาพ
2.0% w/v	10:90	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเป็นเนื้อเดียวกันแต่มีลักษณะเหลวมาก ทำให้มีปัญหาในการหยดบีด ควบคุมการหยดบีดยาก เมื่อหยดสารละลายแอลจิเนตในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เม็ดบีดมีลักษณะอ่อนตัว และเมื่อนำไปพักให้แห้ง พบว่า เม็ดบีดไม่แห้ง ดังภาพ

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดลองเมื่อใช้ตัว Crosslink หรือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 15% โดยมวลต่อปริมาตร

ความเข้มข้นแอลจิเนต	อัตราส่วนตัวทำละลาย	ผลการทดลอง
1.6% w/v	20:80	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเหลวมาก สารละลายมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันแต่ขึ้นรูปบีดได้ยาก ทำให้ได้บีดที่ขนาดเล็กใหญ่ต่างกัน เมื่อหยดบีดในแคลเซียมคลอไรด์ 15% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เมื่อพักทิ้งไว้ บีดไม่แห้ง
1.6% w/v	15:85	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเหลวมากกว่าอัตราส่วน 20:80 สารละลายมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันแต่ขึ้นรูปบีดได้ยาก ส่วนใหญ่จะได้บีดที่มีขนาดเล็ก เมื่อหยดบีดในแคลเซียมคลอไรด์ 15% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เมื่อพักทั้งไว้ บีดไม่แห้ง
1.6% w/v	10:90	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเหลวมากกว่าอัตราส่วน 15:85 สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแต่ไม่สามารถขึ้นรูปบีดได้ เนื่องจาก เมื่อหยดบีดในแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v ไม่เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด
1.8% w/v	20:80	พบว่า สารละลายแอลจิเนตไม่ค่อยเป็นเนื้อเดียวกันและสารละลายแอลจิเนตมีความหนืดมาก สามารถขึ้นรูปบีดได้ แต่จะควบคุมการหยดบีดยาก ทำให้ได้เม็ดบีดที่มีลักษณะมีหาง (Tail) ดังภาพ

ความเข้มข้นแอลจิเนต	อัตราส่วนตัวทำละลาย	ผลการทดลอง
1.8% w/v	15:85	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเป็นเนื้อเดียวกัน สามารถหยดขึ้นรูปบีดได้ง่าย ได้เม็ดบีดที่มีลักษณะทรงกลม (Spherical) ขนาดใกล้เคียงกัน แต่เมื่อหยดในแคลเซียมคลอไรด์ 15% w/v จะได้บีดที่เกิดการห่อหุ้มอย่างสมบูรณ์ไม่อ่อนตัว เมื่อพักทิ้งไว้จะได้ บีดที่แห้งสนิท ดังภาพ <u>เม็ดบีดอีเอ็ม สูตร B2</u>
1.8% w/v	10:90	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเป็นเนื้อเดียวกัน แต่มีลักษณะเหลวมาก ทำให้มีปัญหาในการหยดบีด ควบคุมการหยดบีดยาก เมื่อหยดสารละลายแอลจิเนต ในแคลเซียมคลอไรด์ 15% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เม็ดบีดมีลักษณะอ่อนตัว และเมื่อนำไปพักให้แห้ง พบว่าเม็ดบีดไม่แห้ง
2.0% w/v	20:80	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความหนืดมากและแอลจิเนตละลายไม่หมดทำให้หยดเป็นบีดได้ยากมาก ดังภาพ

ความเข้มข้นแอลจิเนต	อัตราส่วนตัวทำละลาย	ผลการทดลอง
2.0% w/v	15:85	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความหนืดมากกว่าแอลจิเนต 1.8% w/v ที่อัตราส่วนเดียวกัน ทำให้หยดขึ้นรูปบีดได้ยากกว่า แต่ได้เม็ดบีดที่มีลักษณะทรงกลม (Spherical) ขนาดใหญ่กว่าแอลจิเนต 1.8% w/v แต่เมื่อหยดในแคลเซียมคลอไรด์ 15% w/v จะได้บีดที่เกิดการห่อหุ้มอย่างสมบูรณ์ ไม่อ่อนตัว เมื่อพักทิ้งไว้จะได้ บีดที่แห้งสนิท ดังภาพ <u>เม็ดบีดอีเอ็ม สูตร C2</u>
2.0% w/v	10:90	พบว่า สารละลายแอลจิเนตมีความเป็นเนื้อเดียวกัน แต่มีลักษณะเหลวกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ทำให้มีปัญหาในการหยดบีด ควบคุมการหยดบีดยาก เมื่อหยดสารละลายแอลจิเนต ในแคลเซียม คลอไรด์ 15% w/v เกิดการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีด แต่เม็ดบีดมีลักษณะอ่อนตัว และเมื่อนำไปพักให้แห้ง พบว่าเม็ดบีดไม่แห้ง

จากผลการทดลองทั้งหมด ที่ความเข้มข้นของแอลจิเนต 1.8% และ 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ 15:85 ซึ่งทำให้ได้สารละลายแอลจิเนตที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีต่างจากอัตราส่วนอื่นๆ และถ้าใช้ความเข้มข้นของแอลจิเนตต่ำกว่า 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร จะได้เม็ดบีดที่ไม่แห้ง แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของแอลจิเนต 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร และใช้อัตราส่วนของอีเอ็มปริมาณมากกว่า 15 ใน 100 จะได้สารละลายที่หนืดมาก ทำให้ไม่สามารถหยดบีดได้ ส่วนความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 15% โดยมวลต่อปริมาตร ทำให้บีดเกิดการห่อหุ้มอย่างสมบูรณ์และไม่อ่อนตัว แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า 15% โดยมวลต่อปริมาตร จะทำให้บีดอ่อนตัวและได้บีดไม่แห้ง

ดังนั้น จะได้ว่าสารละลายแอลจิเนตความเข้มข้น 1.8% และ 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร ที่มีอัตราส่วนของตัวทำละลาย อีเอ็ม:น้ำกลั่น เท่ากับ 15:85 และใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นตัว Crosslink ที่ความเข้มข้น 15% โดยมวลต่อปริมาตร ถือว่าเป็นสภาวะที่ดีที่สุด (Optimun condition) ของการขึ้นรูปบีด โดยแอลจิเนตทั้งสองความเข้มข้นนี้ให้เม็ดบีดที่มีลักษณะเป็นทรงกลม (Spherical) และให้เม็ดบีดที่แห้ง ถึงแม้ว่าที่แอลจิเนตเข้มข้น 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร จะขึ้นรูปบีดได้ยากกว่า 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร แต่จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อนำบีดไปใช้ควบคุมการงอกของวัชพืช ดังนั้น จึงต้องนำบีดทั้งสองความเข้มข้นไปเปรียบเทียบคุณสมบัติของการออกฤทธิ์ โดยดูจากค่าการเจริญของจุลินทรีย์ในบีด เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสารและการออกฤทธิ์ควบคุมการงอกของวัชพืชในผลการทดลองที่ 4.4, 4.5, และ 4.6 ตามลำดับ

4.3 การทำบีดให้แห้งด้วย Fluid bed dryer

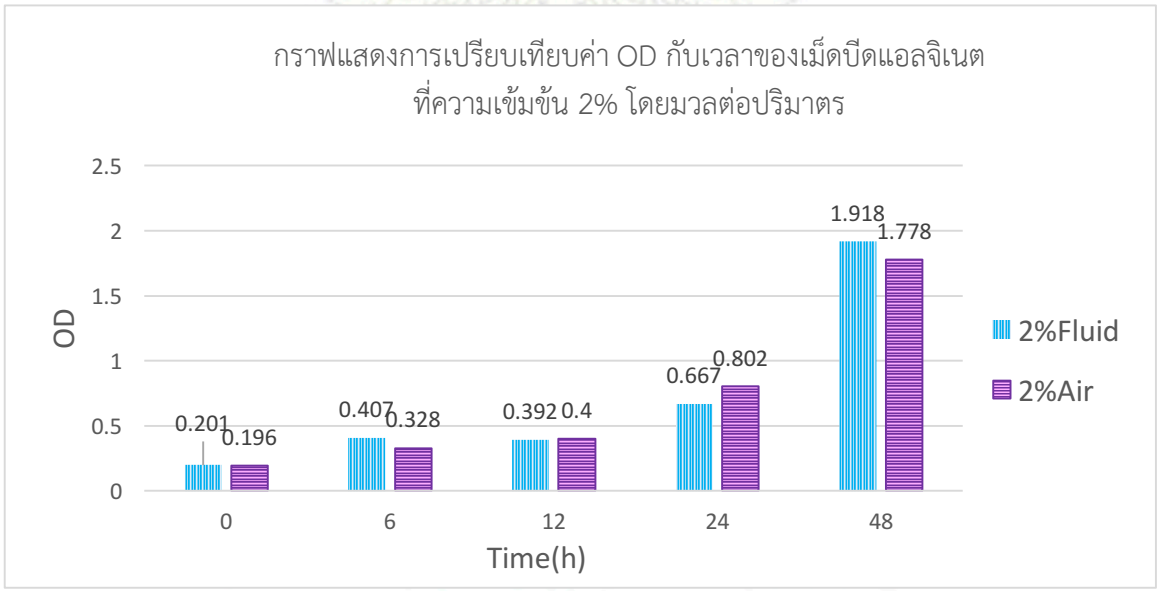
จากผลการทดลองที่ 4.2 ทำให้ได้บีดที่เหมาะสม 2 ความเข้มข้น คือ 1.8% และ 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร แต่พบว่าเมื่อต้องนำเม็ดบีดไปพักให้แห้งด้วยอากาศต้องใช้เวลาในการพักประมาณ 2-3 วัน ซึ่งถือว่าใช้เวลานาน ดังนั้น จึงได้นำบีดไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน (Fluid bed dryer) โดยพบว่า ปริมาณเม็ดบีดที่เตรียมจากสารละลายแอลจิเนตปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการทำให้บีดแห้งสนิทที่ 2 ชั่งโมง 20 นาที โดยใช้อัตราเร็วลม 25 เมตรต่อวินาที และตั้งค่าอุณหภูมิที่ 37°C ซึ่งจากบทความเรื่อง Optimum Temperature for Growth of Bacteria ของ Harold Eddleman, Ph. D. *(17)* แบคทีเรียนส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูง 25-40°C และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37°C ทำให้การใช้เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อนไม่ส่งผลให้จุลินทรีย์ตาย อีกทั้งเป็นการลดระยะเวลาในการทำบีดให้แห้งได้ดีกว่าการพักให้แห้งในอากาศถึง 22 เท่า แต่เพื่อให้ได้บีดที่มีประสิทธิภาพ จึงทำการทดสอบดูปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบระหว่างบีดที่พักให้แห้งด้วยอากาศกับบีดที่ทำให้แห้งจากเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน ว่าการใช้เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน ไม่ส่งผลให้เชื้อตายจริงและยังมีปริมาณของเชื้อใกล้เคียงกับการพักทิ้งไว้ในอากาศโดยแสดงได้จากผลการทดลองที่ 4.4

(a) (b) (c)

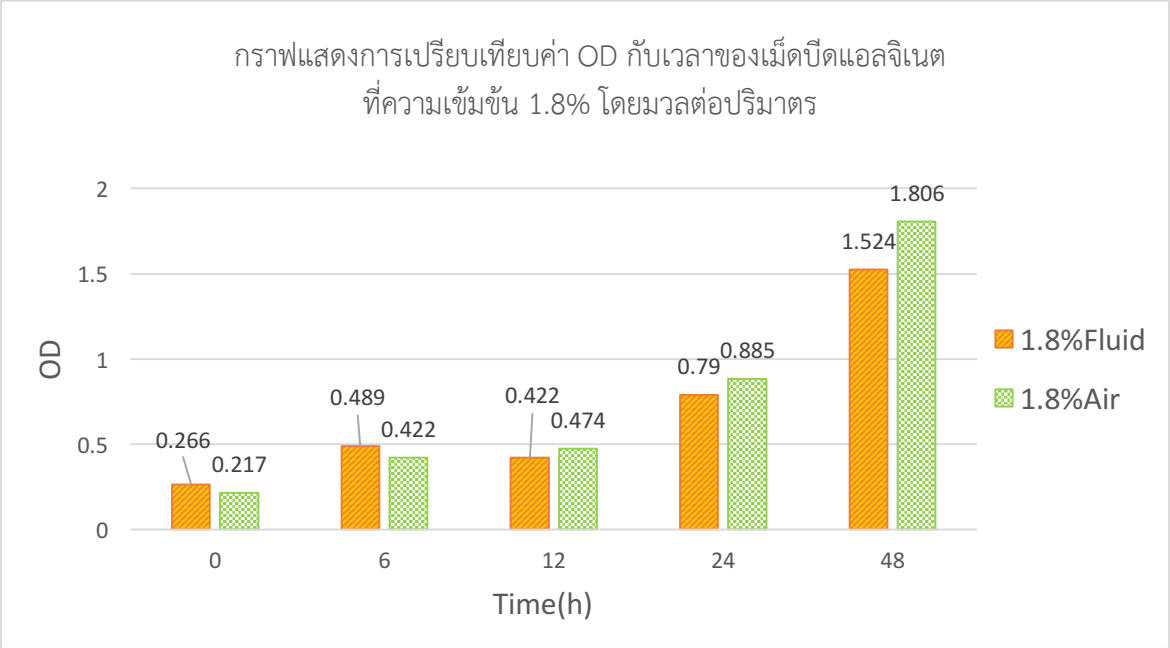
รูปที่ 4.2 เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน (Fluid bed dryer)
(a) เม็ดบีดที่ได้จากการทำให้แห้งด้วย Fluid bed dryer
(b) โถบรรจุเม็ดบีดสำหรับทำให้แห้ง
(c) เครื่อง Fluid bed dryer

4.4 การทดสอบการเจริญของเชื้อด้วย Microtiter Plate Reader

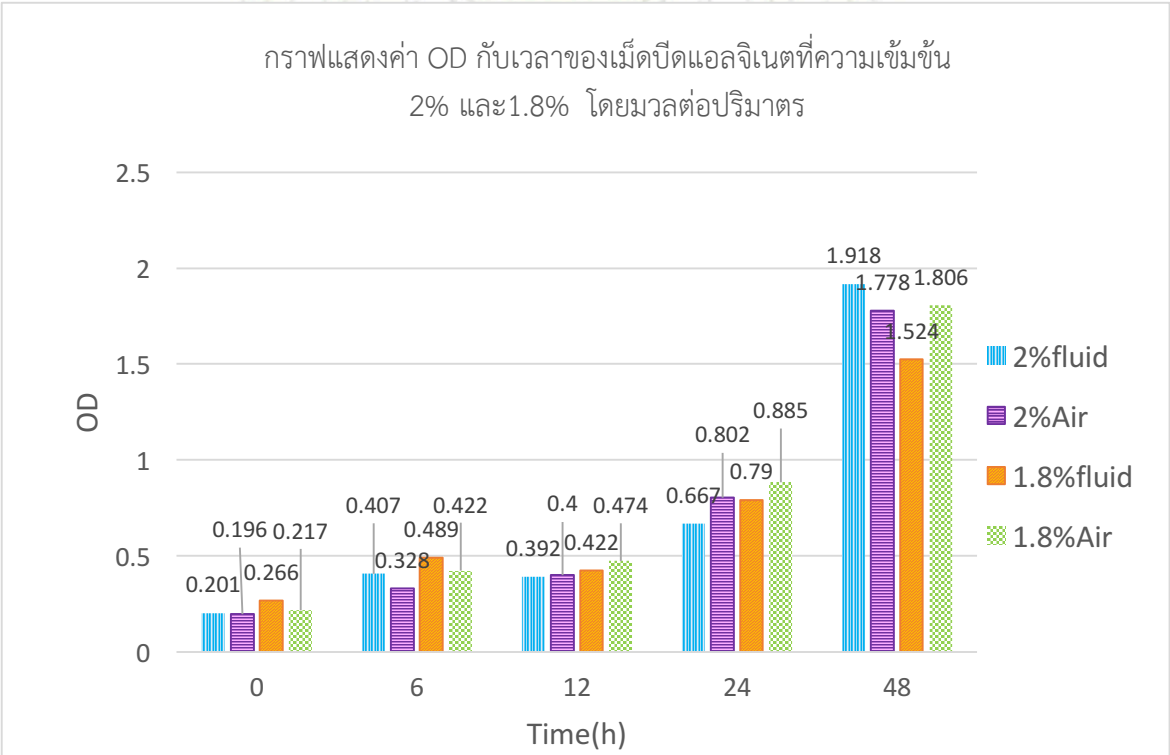
จากการทดลองนำเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 (2% w/v) และสูตร B2 (1.8% w/v) ที่ทำให้แห้งด้วยอากาศ (Air) และทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน ทำการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำ (Nutrient broth : NB) และทำการวัดค่า OD ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลอง ดังนี้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า OD กับเวลาของเม็ดบีดที่ให้แห้งด้วยสองวิธี ที่ความเข้มข้นของแอลจิเนต 2% โดยมวลต่อปริมาตร



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า OD กับเวลาของเม็ดบีดที่ให้แห้งด้วยสองวิธี ที่ความเข้มข้นแอลจิเนต 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า OD กับเวลาของเม็ดบีดที่ให้แห้งด้วยสองวิธี ที่ความเข้มข้นแอลจิเนต 2% และ1.8% โดยมวลต่อปริมาตร

จากรูปที่ 4.3 จะได้ว่า เม็ดบีดแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 2% โดยมวลต่อปริมาตร มีค่า OD เพิ่มขึ้นที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง ซึ่งแสดงว่า ในการห่อหุ้มอีเอ็มจากหน่อกล้วยด้วยสารละลายแอลจิเนตไม่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตาย เนื่องจากแอลจิเนตเป็นพรีไบโอติคซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์หรือโพรไบโอติคนั่นเอง และจากกราฟเปรียบเทียบเม็ดบีดที่ทำให้แห้งด้วยอากาศ (Air) และทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน (Fluid bed dryer) พบว่า วิธีการทำแห้งทั้ง 2 วิธี ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากค่า OD ที่ตรวจวัดได้ของบีดที่เวลา 48 ชั่วโมง บีดที่ทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน มีค่า OD เท่ากับ 1.918 และบีดที่ทำให้แห้งด้วยอากาศ มีค่า OD เท่ากับ 1.778 จะเห็นว่าค่า OD ใกล้เคียงกันมาก แสดงถึงวิธีที่ใช้ในการทำให้บีดแห้งไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยแอลจิเนต ดังนั้น การใช้เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อนจึงเป็นวิธีการทำแห้งที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากไม่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายและยังช่วยลดเวลาในการทำแห้งของบีดด้วย

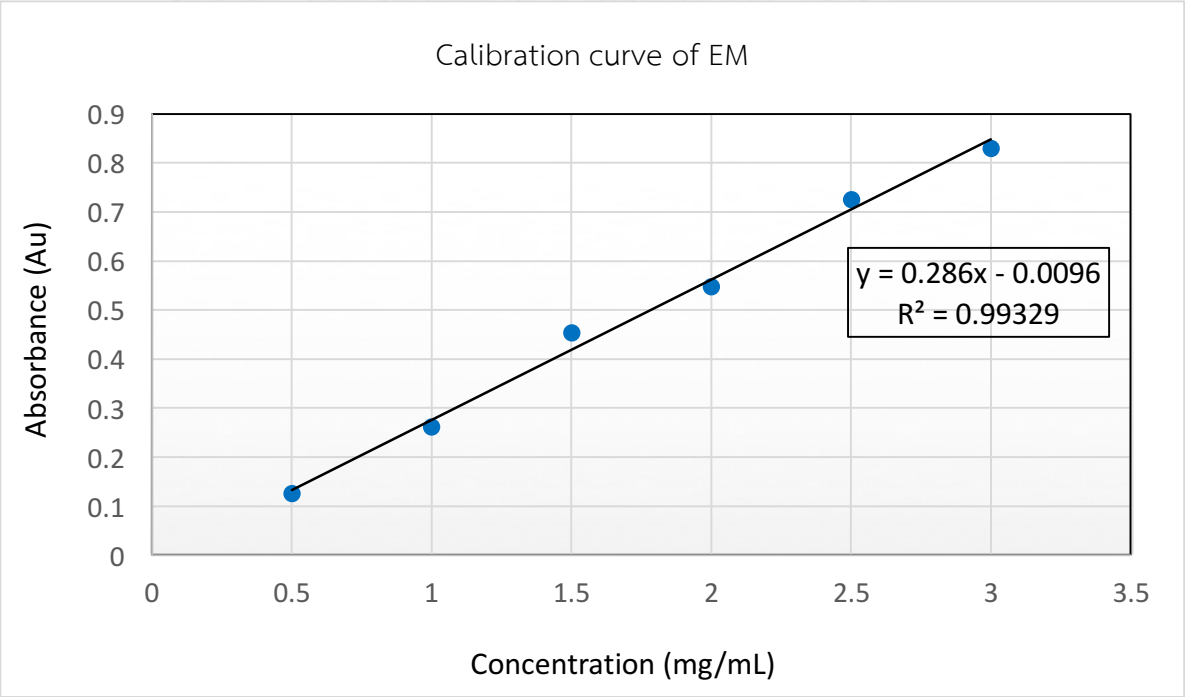
จากรูปที่ 4.4 จะได้ว่า เม็ดบีดแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร มีค่า OD เพิ่มขึ้นที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง ซึ่งแสดงว่า เม็ดบีดที่ทำให้แห้งด้วยอากาศและทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อนทั้ง 2 วิธี ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจาก ค่า OD ที่ตรวจวัดได้ของบีดที่เวลา 48 ชั่วโมง บีดที่ทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน มีค่า OD เท่ากับ 1.524 และบีดที่ทำให้แห้งด้วยอากาศ มีค่า OD เท่ากับ 1.806 จะเห็นว่าค่า OD ของวิธีทั้ง 2 มีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยค่า OD ของการทำให้แห้งด้วยอากาศจะมากกว่า แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเวลาที่ทำให้แห้งด้วยอากาศที่ต้องทิ้งไว้ 2-3 วัน ซึ่งถือว่านานมาก ดังนั้น การใช้เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อนจึงยังเป็นวิธีการทำแห้งที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากไม่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายและยังช่วยลดเวลาในการทำแห้งของบีดด้วย

จากรูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า OD กับเวลาของเม็ดบีดแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 2% และ 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร จะเห็นว่า ค่า OD มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่เวลา 0, 6, 12, 24, และเพิ่มอย่างเห็นได้ชัดที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งแสดงถึงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด และเม็ดบีดที่เตรียมจากแอลจิเนตความเข้มข้น 2% โดยมวลต่อปริมาตร จะให้ค่า OD สูงกว่าความเข้มข้น 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นแอลจิเนต 2% โดยมวลต่อปริมาตร มีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยมากกว่าความเข้มข้นแอลจิเนต 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสารด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy)

จากการทดลองเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของอีเอ็มด้วยเทคนิคยูวีวิสซิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-visible spectroscopy) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณปริมาณที่สารปลดปล่อย (Release) ออกมาซึ่งจากผลการทดลองจะได้กราฟมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณหาปริมาณของอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีสมการ คือ Y = 0.286X - 0.0096 และมีค่า R^2 = 0.99329 ได้กราฟดังรูปที่ 4.6

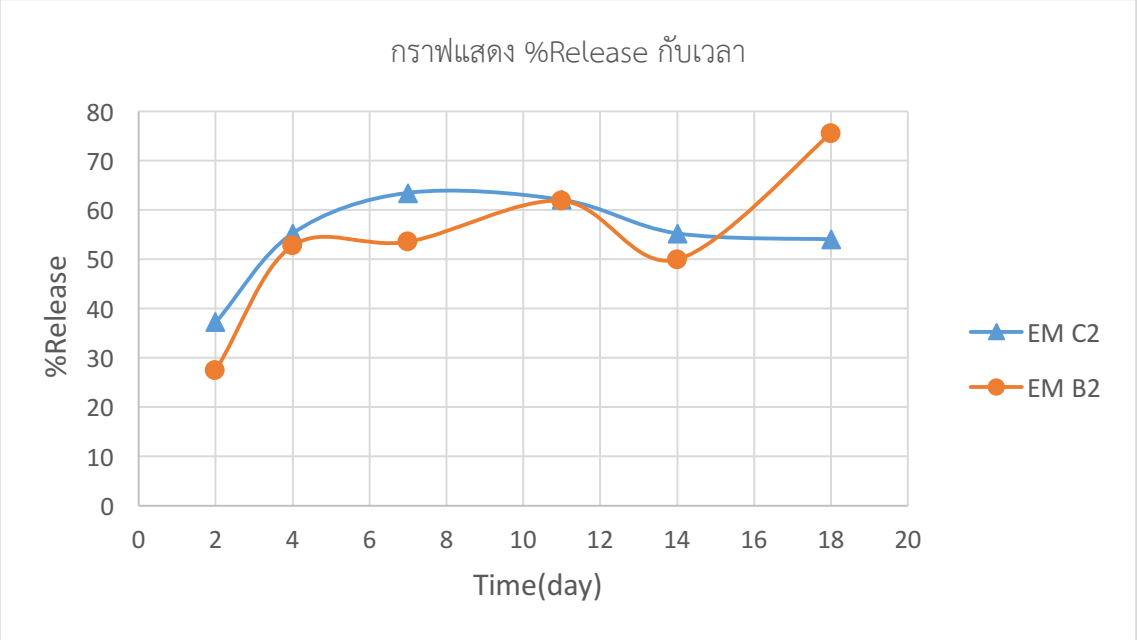


รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานของอีเอ็มจากหน่อยกล้วยที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจากเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 และ B2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงเวลา ต่างๆ ดังนี้ 2, 4, 7, 11, 14, 18 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย (%Release) ของอีเอ็มในสารตัวอย่างได้ผลการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยอีเอ็มจากหน่อกล้วย

เวลา (วัน)	เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของอีเอ็มจากหน่อกล้วย (% Release)	
	บีดอีเอ็มสูตร C2	บีดอีเอ็มสูตร B2
2	37.2	27.4
4	55.2	52.7
7	63.4	53.5
11	62.0	61.8
14	55.2	49.9
18	54.0	75.5



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสารกับเวลา ของเม็ดบีดแอลจิเนตความเข้มข้น 2% และ1.8% โดยมวลต่อปริมาตร

สารตัวอย่างหรือเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 ที่ระยะเวลา 2 วัน สามารถปลดปล่อยสารออกมาได้ 37.2% และค่าเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 4 วัน ปลดปล่อยสารออกมาได้ 55.2% จนระยะเวลา 8 และ 11 วัน มีเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสารใกล้เคียงกัน เท่ากับ 63.4% และ 62.0% ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเป็นช่วงที่มีอัตราการปลดปล่อยสารอีเอ็มสูงสุด เนื่องจากเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 อาจมีการกักเก็บสารที่หนาแน่น ทำให้การปลดปล่อยสารค่อยๆออกมา ซึ่งส่งผลดีต่อการออกฤทธิ์ต่อวัชพืชและอัตราการปลดปล่อยสารจะค่อยๆลดลงเรื่อยๆในระยะเวลา 14 และ 18 วัน

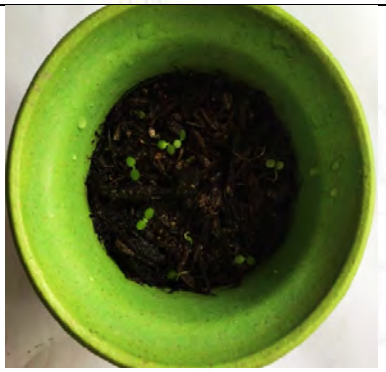
สารตัวอย่างหรือเม็ดบีดอีเอ็มสูตร B2 ที่ระยะเวลา 2 วัน สามารถปลดปล่อยสารออกมาได้ 27.4% และ ที่ระยะเวลา 4 และ 7 วัน ปลดปล่อยสารออกมาได้ 52.7% และ 53.5% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันแสดงถึงอัตราการปลดปล่อยสารคงที่ในช่วงเวลา 4-7 วัน และเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 11 วัน ซึ่งเท่ากับ 61.8% และค่อยๆลดลงที่เวลา 14 วัน จนถึงวันที่ 18 พบว่าเม็ดบีดอีเอ็มสูตร B2 มีลักษณะเปื่อยและนิ่ม และละลายเป็นขุยอยู่ในสารละลาย เนื่องจากเม็ดบีดอีเอ็มสูตร B2 มีความเข้มข้นของแอลจิเนต 1.8% ทำให้เมื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยผิดพลาดไปจากค่าจริง

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าที่ช่วงเวลาเริ่มต้นสารจะถูกปลดปล่อยออกมาได้น้อย จากนั้นจะค่อยๆเริ่มปลดปล่อยออกมาปริมาณมากขึ้นและลดปริมาณลงเมื่อเวลานานขึ้น เนื่องจากอีเอ็มที่อยู่ในเม็ดบีดได้ถูกปลดปล่อยออกมาจนถึงจุดสูงสุดแล้ว นั่นคือ ที่ช่วงเวลาประมาณ 8-10 วัน ซึ่งพบว่า %Release สูงสุดของการปลดปล่อยอีเอ็มมีค่าเท่ากับ 62% ในเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 และ %Release สูงสุดของการปลดปล่อยอีเอ็มมีค่าเท่ากับ 61.8% ในเม็ดบีดอีเอ็มสูตร B2

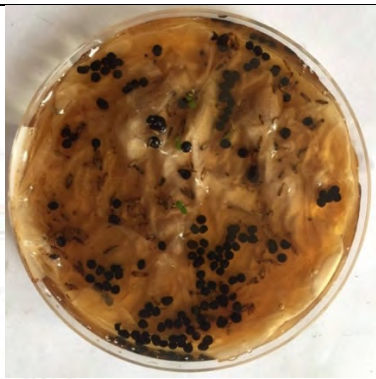
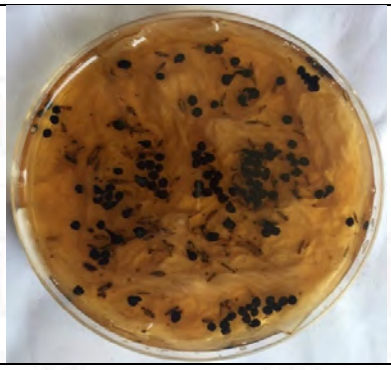
4.6 การทดสอบการออกฤทธิ์กับวัชพืช

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ เพื่อต้องการนำเม็ดบีดอีเอ็มที่ห่อหุ้มด้วยแอลจิเนตไปใช้ออกฤทธิ์ควบคุมการงอกของวัชพืชได้ เพื่อป้องกันการรบกวนของวัชพืชต่อพืชปลูกโดยมีระยะเวลาในการศึกษาการออกฤทธิ์ที่ 21 วัน เลือกใช้วัชพืช คือ หญ้าดอกขาวและปลูกในลักษณะต่างกัน 3 ลักษณะ คือ ในภาชนะที่ใส่ดิน ภาชนะที่ใส่กระดาษทิชชู่เปียก และภาชนะที่ใส่น้ำ โดยในแต่ละลักษณะจะแบ่งเป็น 3 ภาชนะ คือ 1. ไม่ใส่บีดอีเอ็ม 2. ใส่บีดอีเอ็มสูตร C2 และ 3. ใส่บีดอีเอ็มสูตร B2 จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาที่ 11 วัน มีหญ้าดอกขาวเริ่มขึ้นในภาชนะที่มีเม็ดบีดอีเอ็ม ดังนั้น จึงทำการเติมเม็ดบีดอีเอ็มเพิ่มน้ำหนัก 1 กรัม ได้ผลการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของเม็ดบีดอีเอ็มจากหน่อกล้วยกับหญ้าดอกขาวในดิน

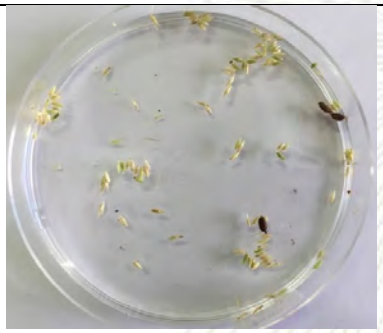
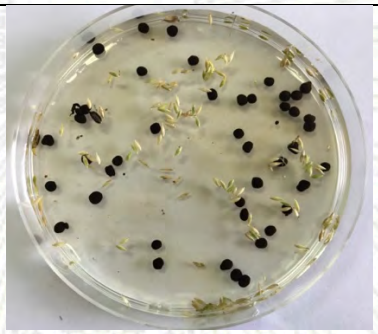
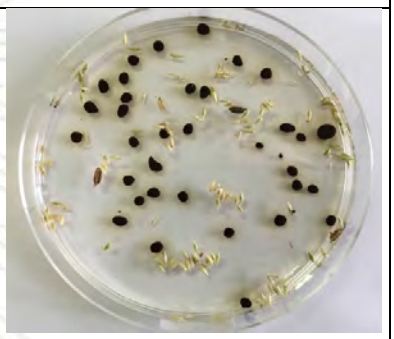
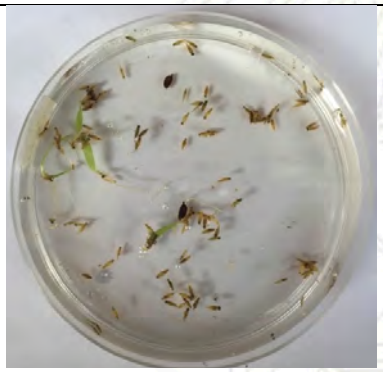
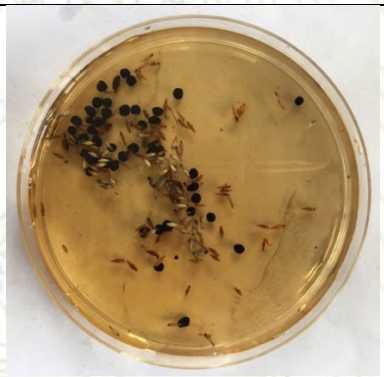
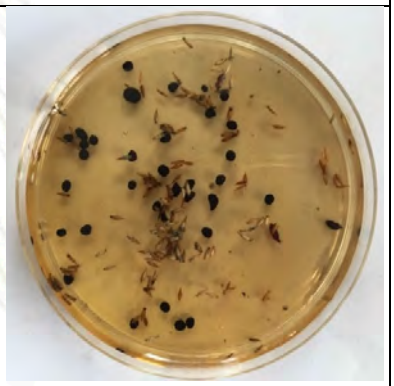
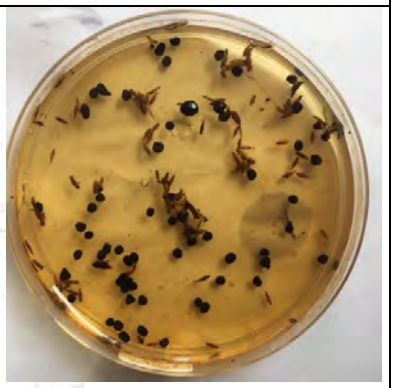
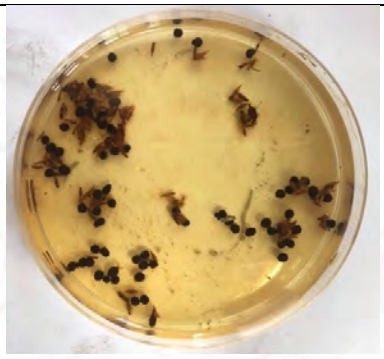
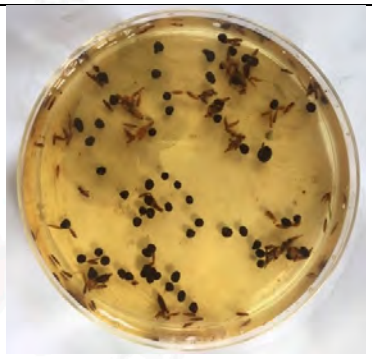
เวลา	ไม่มีเม็ดบีดอีเอ็ม	บีดอีเอ็มสูตร C2	บีดอีเอ็มสูตร B2
1 วัน			
1 สัปดาห์			
2 สัปดาห์			
3 สัปดาห์			

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของเม็ดบีดอีเอ็มจากหน่อกล้วยกับหญ้าดอกขาวบนทิชชู่

เวลา	ไม่มีเม็ดบีดอีเอ็ม	บีดอีเอ็มสูตร C2	บีดอีเอ็มสูตร B2
1 วัน			
1 สัปดาห์			
2 สัปดาห์			
3 สัปดาห์			

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของเม็ดบีดอีเอ็มจากหน่อกล้วยกับหญ้าดอกขาวในน้ำ

เวลา	ไม่มีเม็ดบีดอีเอ็ม	บีดอีเอ็มสูตร C2	บีดอีเอ็มสูตร B2
1 วัน			
1 สัปดาห์			
2 สัปดาห์			
3 สัปดาห์			

จากผลการทดลองตารางที่ 4.4 ได้ทำการทดลองโดยการปลูกหญ้าดอกขาวในดิน และมีการควบคุมลักษณะการปลูกที่แตกต่างกัน 3 แบบ พบว่าระยะเวลา 3 สัปดาห์ ในภาชนะที่ไม่มีการเติมเม็ดบีดอีเอ็ม หญ้าดอกขาวเจริญเติบโตตามปกติ ส่วนภาชนะที่ 2 มีการเติมเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 และภาชนะที่ 3 เติมเม็ดบีดอีเอ็มสูตร B2 พบว่าทั้ง 2 ภาชนะในช่วง 1-10 วันแรก สามารถควบคุมการงอกของวัชพืชได้ แต่ในวันที่ 11 เริ่มมีหญ้างอกขึ้นมาเล็กน้อย อาจเกิดจากปริมาณความเข้มข้นของเม็ดบีดไม่เพียงพอ จึงได้ทำการใส่เม็ดบีดอีเอ็มเพิ่ม 1 กรัม ในทั้ง 2 ภาชนะ พบว่าที่ระยะเวลา 2 และ 3 สัปดาห์ ภาชนะที่ 2 ที่มีเม็ดบีดอีเอ็ม C2 ควบคุมการงอกของหญ้าดอกขาวได้ดี โดยไม่มีหญ้าดอกขาวใหม่และหญ้าดอกขาวที่เคยงอกก็ค่อยๆตายลง ส่วนภาชนะที่ 3 ที่มีเม็ดบีดอีเอ็ม B2 ก็สามารถควบคุมการงอกของหญ้าดอกขาวได้ดี โดยไม่มีหญ้าดอกขาวใหม่เกิดขึ้นแต่หญ้าดอกขาวที่เคยงอกอยู่แล้วก็ไม่ได้ตายลง

จากผลการทดลองตารางที่ 4.5 ได้ทำการทดลองปลูกหญ้าดอกขาวบนกระดาษทิชชู่ พบว่าภาชนะที่ไม่มีการใส่เม็ดบีดลงไป หญ้าดอกขาวเจริญเติบโตได้ตามปกติในระยะเวลา 3 สัปดาห์ และในภาชนะที่ 2 มีเม็ดบีด อีเอ็มสูตร C2 สามารถควบคุมการงอกของหญ้าดอกขาวได้ เนื่องจากในระยะเวลา 3 สัปดาห์ ไม่มีหญ้าดอกขาวเกิดขึ้นในภาชนะที่ 2 นี้ ส่วนภาชนะที่ 3 ที่มีเม็ดบีดอีเอ็มสูตร B2 พบว่าที่ระยะเวลา 1- 10 วัน สามารถ ควบคุมการงอกของหญ้าดอกขาวได้ดี แต่ในวันที่ 11 เริ่มมีหญ้างอกขึ้นมาเล็กน้อย จึงได้ทำการใส่เม็ดบีดอีเอ็มเพิ่ม 1 กรัม พบว่าที่เวลา 2 สัปดาห์ ไม่มีหญ้าใหม่เกิดขึ้น แต่หญ้าที่เคยงอกแล้วยังไม่ตายลงจนระยะเวลา 3 สัปดาห์ หญ้าที่เคยงอกก็ตายลง อาจเกิดจากอัตราการปลดปล่อยสารเพิ่มขึ้นและการปลูกบนทิชชู่มีความชื้นแฉะมากกว่าในดิน ทำให้การปลดปล่อยสารได้ดีกว่า ความเข้มข้นของอีเอ็มจึงมากกกว่า ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดบีดอีเอ็มดีกว่าในดิน

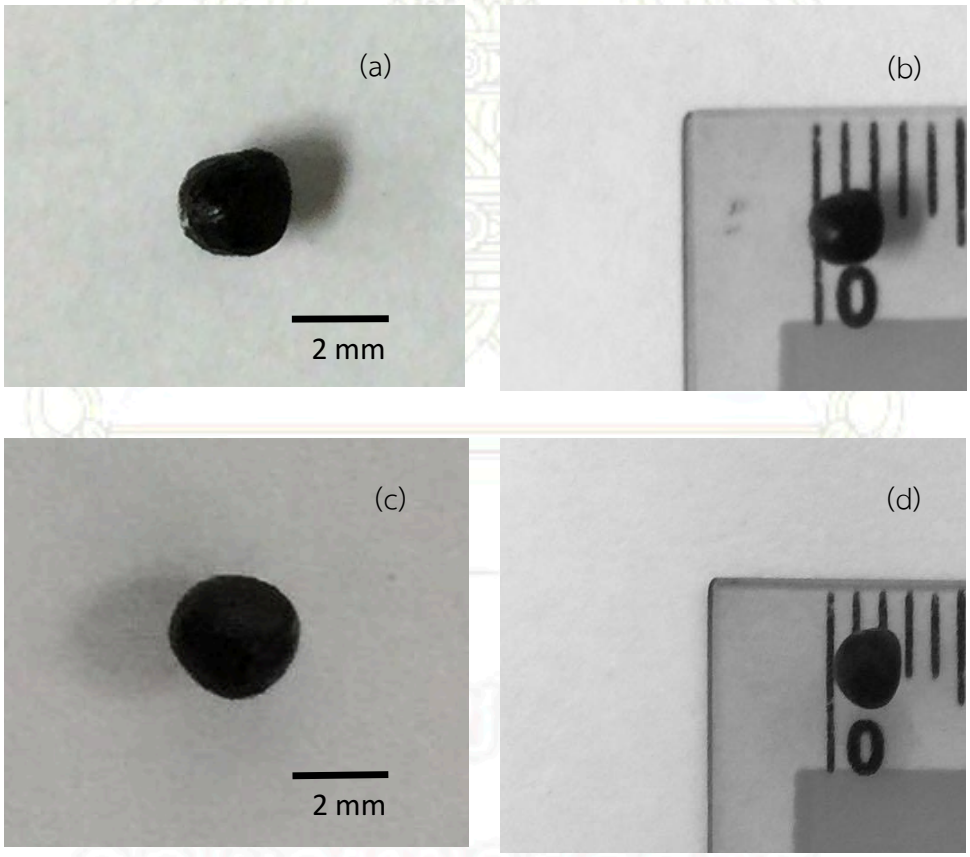
จากผลการทดลองตารางที่ 4.6 ได้ทำการทดลองปลูกหญ้าดอกขาวในน้ำ พบว่าที่ภาชนะที่ไม่มีการใส่เม็ดบีดอีเอ็มลงไป หญ้าดอกขาวเจริญเติบโตได้ตามปกติ ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ ในภาชนะที่ 2 ที่มีเม็ดบีดอีเอ็มสูตร C2 และภาชนะที่ 3 ที่มีเม็ดบีดอีเอ็มสูตร B2 สามารถควบคุมการงอกของหญ้าดอกขาวได้ดี เนื่องจากการปลูกหญ้าในน้ำทำให้เม็ดบีดอีเอ็มมีประสิทธิภาพในการปลดปล่อยได้ดีกว่าในดินและบนกระดาษทิชชู่ ส่งผลให้มีความเข้มข้นของอีเอ็มมากกว่า จึงควบคุมการเจริญเติบโตของหญ้าได้ดีกว่า

จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยอีเอ็ม (%EM release) มีความสัมพันธ์กับการงอกของหญ้า กล่าวคือ ช่วงเวลาที่เม็ดบีดอีเอ็มปลดปล่อยสารได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุด คือ 8-10 วัน คือช่วงเวลาที่หญ้าไม่งอก แต่พบว่าหลังจาก 11 วัน หญ้าจะเริ่มงอกขึ้นมา และจากการทดลองทดสอบกับหญ้าดอกขาว พบว่า เม็ดบีดอีเอ็มที่มีความเข้มข้นของแอลจิเนต 2.0% มีประสิทธิภาพในการควบคุมการงอกหรือการเจริญเติบโตของวัชพืชได้ดี กว่าเม็ดบีดอีเอ็มที่มีความเข้มข้นแอลจิเนต 1.8%

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมและออกแบบเม็ดบีดแอลจิเนตที่ห่อหุ้มจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยหรืออีเอ็มได้ และทำการทดสอบความสามารถของเม็ดบีดอีเอ็มเพื่อให้ได้เม็ดบีดอีเอ็มที่มีฤทธิ์ต่อการควบคุมการงอกของวัชพืชได้ โดยเม็ดบีดอีเอ็มที่ได้ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

จากการทดลอง ทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอีเอ็มจากหน่อกล้วยโดยการ Spread plate พบว่า ในอีเอ็มจากหน่อกล้วยมีเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตอยู่จริง จากนั้นจึงทำการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับขึ้นรูปบีด พบว่า ความเข้มข้นของแอลจิเนต 2% และ 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร ที่มีอัตราส่วนตัวทำละลาย อีเอ็ม:น้ำ เป็น 15:85 ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 15% โดยมวลต่อปริมาตร ให้เม็ดบีดอีเอ็มที่แห้งสนิทและมีลักษณะเป็นทรงกลม (Spherical)



รูปที่ 5.1 แสดงลักษณะของเม็ดบีดอีเอ็มที่เป็นทรงกลม (Spherical)
(a) และ (b) เม็ดบีดอีเอ็มจากแอลจิเนต 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร
(b) และ (d) เม็ดบีดอีเอ็มจากแอลจิเนต 2.0% โดยมวลต่อปริมาตร

นำเม็ดบีดอีเอ็มที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยอากาศและเครื่องทำแห้งด้วยลมร้อน พบว่า เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อนสามารถทำให้บีดแห้งได้เร็วกว่าอากาศ 22 เท่าและนำเม็ดบีดอีเอ็มไปเลี้ยงเชื้อ พบว่า ความเข้มข้นแอลจิเนต 2% โดยมวลต่อปริมาตร มีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์จากหน่อกล้วยมากกว่าความเข้มข้นแอลจิเนต 1.8% โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นทำการทดลองหาเปอร์เซ็นการปลดปล่อย เม็ดบีดอีเอ็ม 2% ให้เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสูงสุดที่ 62% และเม็ดบีดอีเอ็ม 1.8% ให้เปอร์เซ็นการปลดปล่อยสูงสุดที่ 61.8% และอัตราการปลดปล่อยสูงสุดอยู่ที่ระยะเวลา 8-10 วัน จึงได้นำเม็ดบีดอีเอ็มทั้งสองแบบไปทดสอบการออกฤทธิ์กับหญ้าดอกขาว พบว่า เม็ดบีดอีเอ็ม 2% มีความสามารถในการควบคุมวัชพืชได้ดีกว่าเม็ดบีดอีเอ็ม 1.8 %

ดังนั้น จากงานวิจัยนี้สามารถผลิตเม็ดบีดแอลจิเนตที่ห่อหุ้มอีเอ็มที่ความเข้มข้น 2% โดยมวลต่อปริมาตรที่มีความสามารถในการควบคุมการงอกของวัชพืชได้ดีในระยะเวลา 8-10 วัน

แนวทางการทำวิจัยในอนาคต

จากงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตเม็ดบีดอีเอ็ม ซึ่งมีความสามารถควบคุมการงอกของวัชพืชได้ แต่ระยะเวลาในการออกฤทธิ์กับวัชพืชยังอยู่ในระยะเวลาสั้น ดังนั้น แนวทางในอนาคตต้องทำการศึกษาระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของอีเอ็มต่อวัชพืชให้มีความยาวนานขึ้นและมีประสิทธิภาพสูง โดยอาจทำการปรับปรุงอัตราส่วนของอีเอ็มต่อน้ำให้มากขึ้นและต้องคำนึงถึงว่าเมื่ออัตราส่วนอีเอ็มที่มากขึ้นจะทำให้สารละลายมีความหนืดมาก จึงต้องทำทดลองหาวิธีการสำหรับแก้ปัญหานี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Formowitz, B.; Elango, F.; Okumoto, S.; Muller, T.; Buerkert, A. The Role of Effective Microorganisms in the Composting of Banana (Musa ssp.) Residues. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2007**, *170*, 649-656.
2. Voo, W.; Ooi, C.; Islam, A.; Tey, B.; Chan, E. Calcium Alginate Hydrogel Beads with Stiffness and Extended Dissolution Behavior. *EUR POLYM J.* **2016**, *75*, 343-353.
3. Li, Y.; Sun, Z.; Zhuang, X.; Xu, ling.; Chen, S.; Li, M. Research Progress on Microbial Herbicides. *Crop Prot.* **2003**, *22*, 247-252.
4. Noparatnaraporn, N.; Ngernmesri, K.; Santisopasri, V.; Suwannaketnikom, R. Production of New Herbicide by Photosynthetic Bacteria. Proceedings of the 30th Kasetsart University Annual Conference. **2535**, 605-621.
5. Kumanee, K.; Encapsulation of Pendimethalin Alginate Composite Beads. *MS.Thesis.* **2011**, *110.*
6. Grey,T.L.; Webster,T.M.; Culpepper,A.S. Weed control as Affected by Pendimethalin Timing and Application Method in conservation Tillage cotton (Gossypium hirsutum L.). *J Cotton Sci*. **2008**, *12*, 318-324.
7. Wang, X.; Zhao, J. Encapsulation of the Herbicide Picloram by Using Polyelectrolyte Biopolymers as Layer-by-Layer Materials. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3789-3796.
8. Massaroppi, Marli R. C.; Machado, Sergio A. S.; Avaca, Luis A. Electroanalytical Determination of the Herbicide Picloram in Natural Waters by Square Wave Voltammetry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14.*
9. Pesticide Biochemistry and Physiology. *J.M. Clark.* **2016**, *129*, 1-94.
10. Chávarri, M.; Marañón, I.; Villarán, M, C. Encapsulation Technology to Probiotic Bacteria. *Probiotic.* **2012**, 503-514.

11. Sathyabama, S.; Kumar, R, M.; Devi, P, B.; Vijayabharathi, R.; Priyadharisri, V, B. Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Alginate Matrix and Its Effect on Viability in Simulated Gastric Environment. *Food Sci Technol.* **2014**, *57*, 419-425.
12. Epstein, W, W.; Netz, D, F.; Seidel, J, L. Isolation of Piperine from Black Pepper. *J. Chem. Ed.* **1993**, *70 (7)*, 598.
13. Thoha, T, B.; Izuka, E, H.; Sikirat, M, O.; Tayin, A, M.; Omobowale, A, K.; Oluwabunmi, O.; Oluwadun, A.; Enumeration of Microorganism in Dried Cassava Powder (Garri) a Comparative Study of Four Methods. *New York Science Journal.* **2012**, *5(1)*, 63-66.
14. Warren, C, R. Rapid Measurement of Chlorophylls with Microplate Reader. *J Plant Nutr.* **2008**, *37(7),* 1321-1332.
15. Pedro, M, A, M.; Romero, J, T.; Telis, V, R, N. Effect of Drying Method on the Adsorption Isotherms and Isosteric Heat of Passion Fruit Pulp Powder. *Food Sci Technol.* **2010**, *30*.
16. Soovali, L.; Room, E, I.; Kutt, A. Uncertainty Sources in UV-Vis Spectrophotometric Measurement. *Accreditation and Quality Assurance*. **2006**, *11*, 246–255.
17. Eddleman, H. Optimum Temperature for Growth of Bacteria. *Ph. D., President*, **1998**, *14045*.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองหาค่า OD ที่ได้จากเครื่อง Microtiter plate reader

ตารางที่ 1 แสดงค่า OD ของเม็ดบีดอีเอ็มที่เวลา 0 ชั่วโมง

ชนิดของบีด / ครั้งที่	2% w/v Fluid	2.0 % w/v Air	1.8 % w/v Fluid	1.8 % w/v Air
1	0.272	0.267	0.371	0.288
2	0.268	0.264	0.35	0.288
3	0.265	0.258	0.279	0.275

ตารางที่ 2 แสดงค่า OD ของเม็ดบีดอีเอ็มที่เวลา 6 ชั่วโมง

ชนิดของบีด / ครั้งที่	2% w/v Fluid	2.0 % w/v Air	1.8 % w/v Fluid	1.8 % w/v Air
1	0.460	0.404	0.566	0.477
2	0.529	0.399	0.564	0.551
3	0.432	0.383	0.537	0.438

ตารางที่ 3 แสดงค่า OD ของเม็ดบีดอีเอ็มที่เวลา 12 ชั่วโมง

ชนิดของบีด / ครั้งที่	2% w/v Fluid	2.0 % w/v Air	1.8 % w/v Fluid	1.8 % w/v Air
1	0.464	0.470	0.475	0.545
2	0.066	0.465	0.524	0.553
3	0.064	0.447	0.467	0.525

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงค่า OD ของเม็ดบีดอีเอ็มที่เวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดของบีด / ครั้งที่	2% w/v Fluid	2.0 % w/v Air	1.8 % w/v Fluid	1.8 % w/v Air
1	0.979	0.886	0.788	0.969
2	0.602	0.878	0.792	0.991
3	0.603	0.843	0.754	0.895

ตารางที่ 5 แสดงค่า OD ของเม็ดบีดอีเอ็มที่เวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดของบีด / ครั้งที่	2% w/v Fluid	2.0 % w/v Air	1.8 % w/v Fluid	1.8 % w/v Air
1	1.928	1.835	1.574	1.826
2	2.210	1.856	1.593	1.894
3	1.818	1.844	1.605	1.898

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

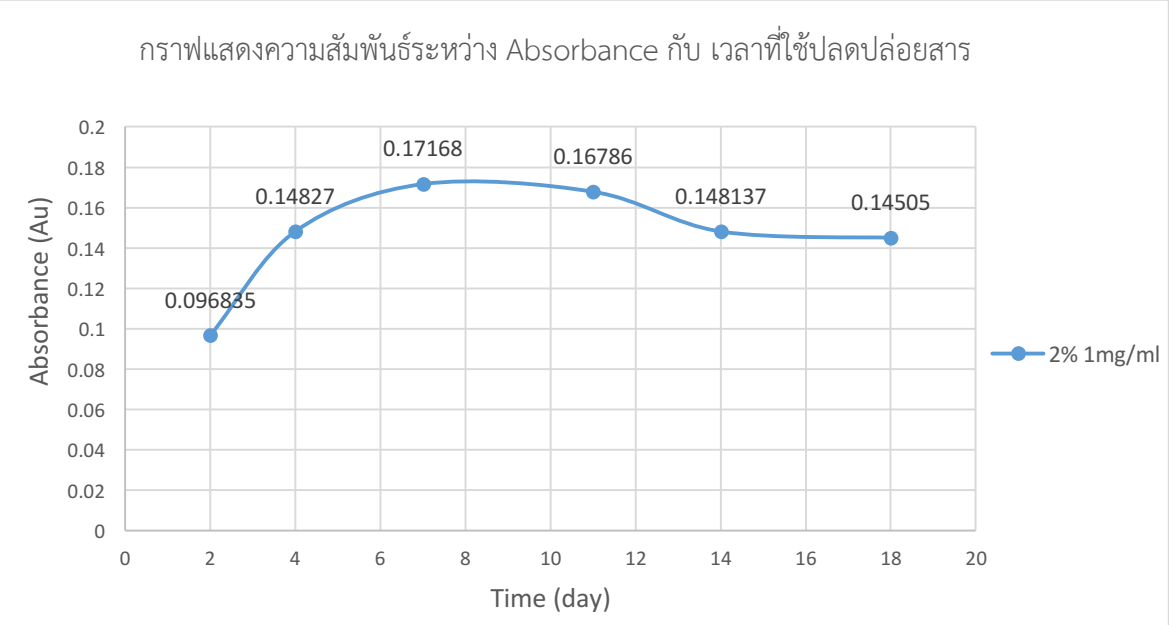
ภาคผนวก ข

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

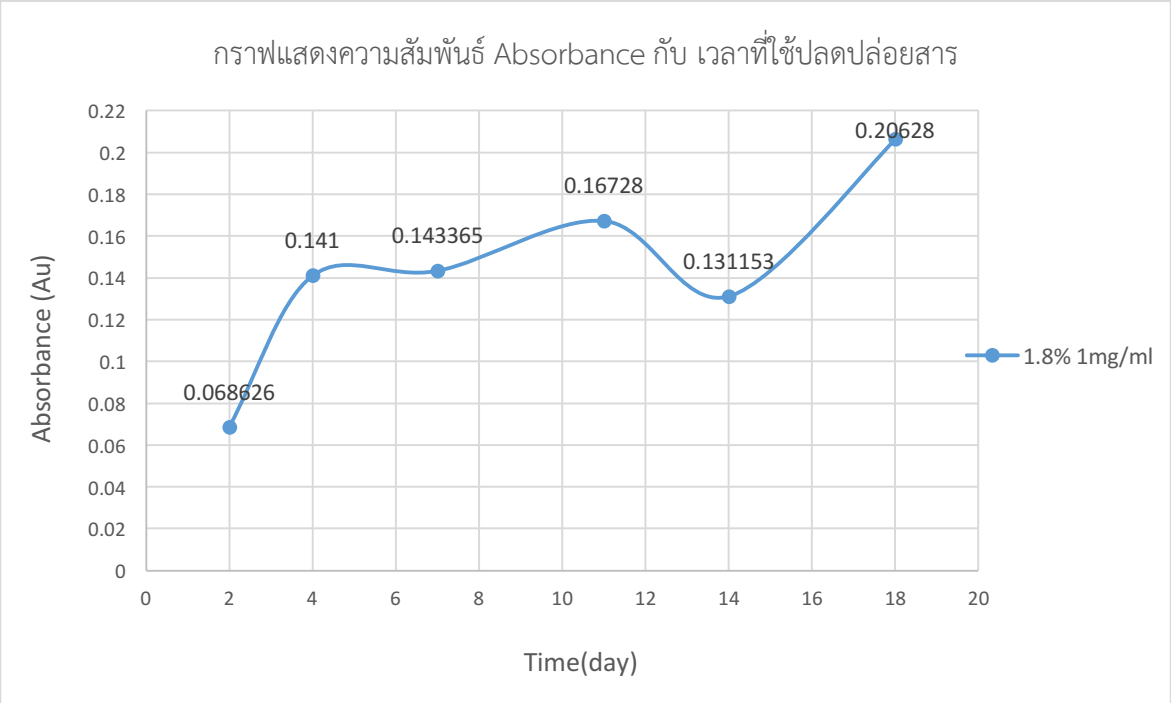
ผลการคำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 mg/mL

ตารางที่ 6 แสดงความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

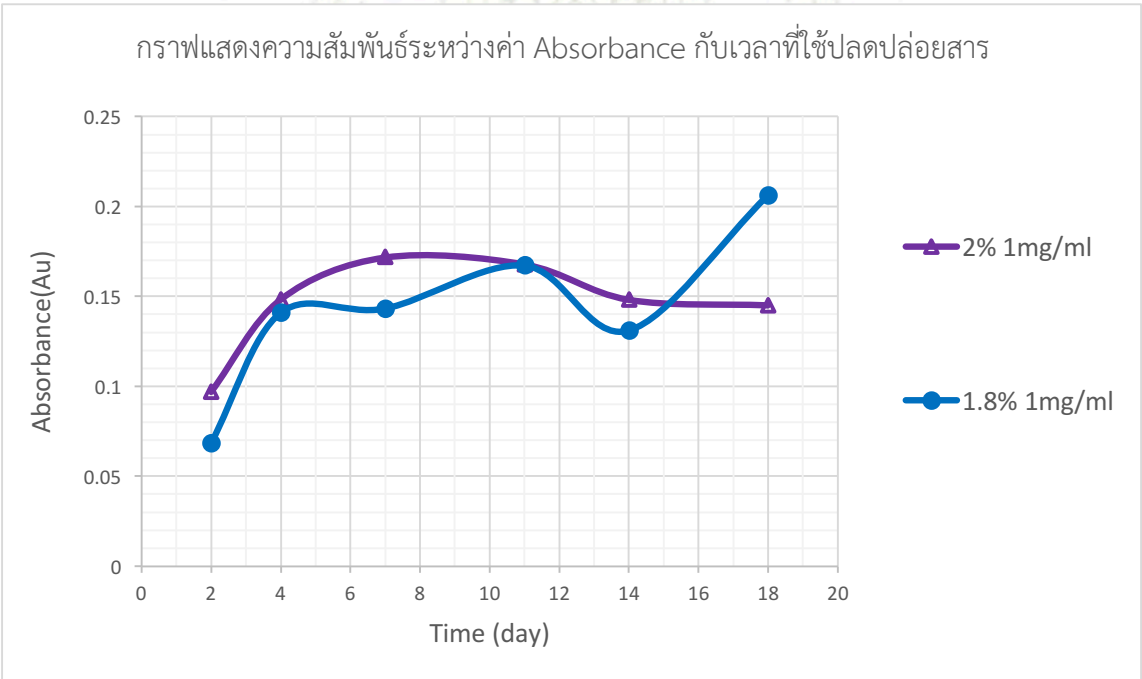
เวลา (วัน)	ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (mg/mL)	
	เม็ดบีด 2% w/v	เม็ดบีด 1.8% w/v
2	0.372	0.274
4	0.552	0.527
7	0.634	0.535
11	0.620	0.618
14	0.552	0.499
18	0.540	0.755



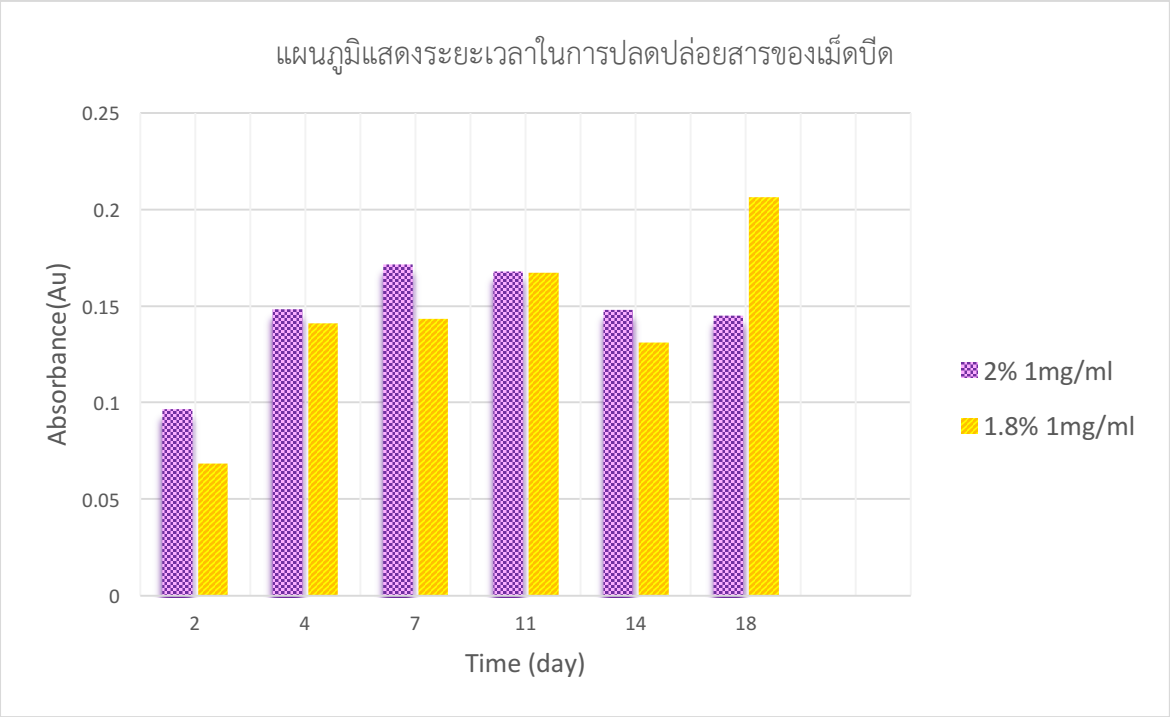
รูปที่ 1 กราฟระหว่าง Absorbance กับเวลาที่ใช้ปลดปล่อยอีเอ็มที่ห่อหุ้มด้วยแอลจิเนต 2% w/v



รูปที่ 2 กราฟระหว่าง Absorbance กับเวลาที่ใช้ปลดปล่อยอีเอ็มที่ห่อหุ้มด้วยแอลจิเนต 1.8% w/v



รูปที่ 3 กราฟระหว่าง Absorbance กับเวลาที่ใช้ปลดปล่อยอีเอ็มที่ห่อหุ้มด้วยแอลจิเนต 1.8% w/v และ 2% w/v



รูปที่ 4 แผนภูมิระหว่าง Absorbance กับเวลาที่ใช้ปลดปล่อยอีเอ็มที่ห่อหุ้มด้วยแอลจิเนต 1.8% w/v และ 2% w/v

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้ทำวิจัย

นางสาวดนิตา ธัมมปที เกิดเมื่อวันที่ 9 สิงหาคม พ.ศ. 2536 กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนวัดทรงธรรม จังหวัดสมุทรปราการ เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 69/30 หมู่ 3 ตำบล บางครุ อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ 10130 อีเมล : d-thammapatee@hotmail.com

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย