สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวโดย *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

Optimization of Culture Conditions for Production of Antagonistic Substances against Fungal Pathogens of Rice by *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 and *Bacillus* sp. LN 007

วาสนา มู่สา

Vassana Musa

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2542

Order Key 17620
BIB Key 156124

เลขหมู่ QB608.R5 ว165
เลขทะเบียน 15412 ว.1
5 เม.ย. 2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าว โดย *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

ผู้เขียน นางสาววาสนา มู่สา

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าว โดย *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

ผู้เขียน นางสาววาสนา มู่สา

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

สารที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว 2 ชนิด คือ *Pyricularia oryzae* และ *Rhizoctonia solani* จากการคัดเลือกสูตรอาหารเหลว 4 สูตร คือ Mckeen, Glucose Asparagine Mineral Salt Medium (GAM), Glucose Meat Extract Peptone medium (GMP) และ No.3 medium พบว่าอาหารเหลวสูตร Mckeen เป็นสูตรที่เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราได้ดีที่สุด พบว่าสามารถใช้ซูโครสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส และใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทน DL glutamic acid ของอาหาร Mckeen โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา คือมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 ใช้ความเร็วของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 94.5 และ 95.7 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุดร้อยละ 98.5 และ 96.2 ตามลำดับ เมื่อใช้โมลาสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนซูโครส และหรือใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30.0 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทน $(NH_4)_2HPO_4$ หรือการที่ไม่เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยในอาหารเหลวสูตร Mckeen มีผลทำให้การเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราลดลง เมื่อเติมสารกำจัดฟอง 2 ชนิด คือ silicone ร้อยละ 1.0 และ polypropylene glycol 2000 ร้อยละ 1.0 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวของเชื้อ *B. subtilis* และ *Bacillus* sp. ผลของการศึกษาในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มี

ปริมาตรของอาหารเหลวสูตร Mckeen ที่ปรับปรุงจากการศึกษาบนเครื่องเขย่า 1.5 ลิตร ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส 50.0 ก/ล, $(NH_4)_2HPO_4$ 10.0 ก/ล, $MgSO_4.7H_2O$ 1.02 ก/ล, K_2HPO_4 1.0 ก/ล, KCl 0.5 ก/ล, และ trace elements 1.0 มล/ล ($MnSO_4.4H_2O$ 0.5 ก, $CuSO_4.5H_2O$ 0.16 ก, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 ก ในน้ำกลั่น 100 มล.) และมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 พบว่า *Bacillus*ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราได้ดีเมื่อไม่มีการควบคุมพีเอช มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 VVM โดย *B. subtilis* มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตร สำหรับ *Bacillus* sp. มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.096 ต่อชั่วโมง และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ *B. subtilis* สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 100.0 และ 97.9 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุดร้อยละ 100 และ 98.5 ตามลำดับ สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง รวมทั้งมีความคงตัวต่อพีเอช 3-11 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 49 วัน โดยที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้มากกว่าร้อยละ 80

Thesis Title	Optimization of Culture Conditions for Production of Antagonistic Substances against Fungal Pathogens of Rice by *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 and *Bacillus* sp. LN 007
Author	Ms. Vassana Musa
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1998

Abstract

Supernates of *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 and *Bacillus* sp. LN 007 exhibited an effective inhibition of the growth of the fungal rice pathogens, *Pyricularia oryzae* and *Rhizoctonia solani.* Optimization of media and cultivation conditions for maximizing the antifungal properties of the supernates were investigated. Preliminary studies using four different types of media revealed that the Mckeen medium showed optimal growth and antifungal substance production. Glucose (carbon source) and D-glutamic acid (nitrogen source) in the Mckeen medium could be replaced by 5% sucrose and 1% $(NH_4)_2HPO_4$, respectively. Optimal cultivation conditions using 250 ml conical flasks were found to be 100 ml medium, initial pH 7.0, 200 rpm shaker speed and 35°C. Under these conditions, the highest antifungal substance activity was obtained against both fungal rice pathogens with the supernatant of *B.subtilis* exhibiting a 94-95% and *Bacillus* sp a 96-98% inhibition. Replacing the carbon source sucrose with molasses and/or the nitrogen source $(NH_4)_2HPO_4$ (1.0 %) with 30% soybean whey in the Mckeen medium or omitting the trace elements $MnSO_4.4H_20$, $CuSO_4.5H_20$, and $FeSO_4.7H_2O$

from the medium reduced growth and inhibitory effect. The addition of 1% antifoam, silicone or propyleneglycol-2000 , on the other hand, did neither affect growth or antifungal substance production. Scaling-up experiments were carried out using a 3 L fermenter with a 1.5 L working volume. Using the optimized medium containing 50 g/l sucrose, 10 g/l $(NH_4)_2HPO_4$, 1.02 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 1 g/l K_2HPO_4, 0.5 g/l KCl and 1 ml/l trace element solution containing in 100 ml: 0.5 g $MnSO_4.4H_2O$, 0.16 g $CuSO_4.5H_2O$ and 0.015 g $FeSO_4.7H_2O$, an initial pH 7.0, an agitation speed of 300 rpm, an aeration rate of 2.0 vvm at 35°C without pH control and a 48 h cultivation time, both bacilli exhibited good growth and antifungal activity in their respective supernates. The specific growth rate and cell dry weight of *B.subtilis* were 0.14 h^{-1} and 4.4 g/l and for *Bacillus* sp. 0.096 h^{-1} and 4.0 g/l, respectively. *Bacillus subtilis* supernates showed the highest antifungal activity with a 100 % and 97.9% inhibition of *P.oryzae* and *R.solani*, respectively, while *Bacillus* sp. supernate gave a 100% and 98.5% inhibition. The inhibitory activity in both supernatants were stable at 121 °C for 15 min and 90 °C for 12 h, and at pH 3-11 for 24 h. More than 80% of the antifungal activity was still found after 49 days at room temperature storage.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ชูฤทธิ์ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์ คุณนลินี จาริกภากร ที่ให้คำแนะนำด้านโรคข้าวและคุณลัดดา นิลรัตน์ ที่อำนวยความสะดวกเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณปิยสุดา พานิช คุณราตรี ศรีเพ็งแก้ว คุณอิงอร ดิลกธราดล ร.ต.อ (หญิง) ธิติมา ธรรมเมศรานนท์ คุณนิศาชล สิโรตมรัตน์ คุณมัณฑนา วงษ์ประเสริฐ คุณรุ่งฤทธิ์ ศรีเมฆารัตน์ พญ. ปฏิมา อภิชาติเมธา นพ. อดิศร อภิวัฒน์การุณ คุณวราภา หุยนันท์ คุณทิพมาส ชิณวงศ์ และชาวสภากาแฟ ที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา รวมถึงเพื่อนๆพี่ๆน้องๆทุกคนในคณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีในทุกๆ ด้าน

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ที่ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย ที่ให้โอกาสในการศึกษาให้ทั้งกำลังใจ ความเข้าใจและกำลังทรัพย์มาโดยตลอด

วาสนา มู่สา

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการตารางภาคผนวก	(10)
รายการภาพ	(16)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	22
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	23
วัสดุ	23
อุปกรณ์	24
การวิเคราะห์	24
วิธีการ	26
3. ผลและวิจารณ์	31
4. สรุป	86
เอกสารอ้างอิง	89
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	100
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน	104
ภาคผนวก ค ผลการทดลอง	105
ประวัติผู้เขียน	169

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่างๆที่ผลิตและจำหน่าย เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช	5
2	การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี	17
3	องค์ประกอบทางเคมีของโมลาส	64

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1	ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	105
2	ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	106
3	ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	107
4	ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	108
5	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	109
6	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	110
7	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	111
8	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	112
9	ผลของซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	113
10	ผลของซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	114

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
11	ผลของซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	115
12	ผลของซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	116
13	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	117
14	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	118
15	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	119
16	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	120
17	ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	121
18	ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	122
19	ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	123
20	ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	124
21	ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	125
22	ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	126

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
23	ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	127
24	ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	128
25	ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	129
26	ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	130
27	ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	131
28	ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	132
29	ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	133
30	ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	134
31	ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	135
32	ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	136
33	ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	137
34	ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solanii* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	138

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
35	ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	139
36	ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	140
37	ผลของ silicone ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	141
38	ผลของ silicone ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	142
39	ผลของ silicone ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	143
40	ผลของ silicone ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	144
41	ผลของ PG-2000 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	145
42	ผลของ PG-2000 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	146
43	ผลของ PG-2000 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	147
44	ผลของ PG-2000 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	148
45	ผลของโมลาสและซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	149
46	ผลของโมลาสและซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	150

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
47	ผลของโมลาสและซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	151
48	ผลของโมลาส และซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	152
49	ผลของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	153
50	ผลของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	154
51	ผลของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	155
52	ผลของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	156
53	ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	157
54	ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	158

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
55	ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	159
56	ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	160
57	ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	161
58	ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	162
59	ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	163
60	ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	164
61	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	165
62	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	166
63	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007	167
64	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007	168

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของ Iturin A	9
2	โครงสร้างทั่วไปของ Surfactin	10
3	โครงสร้างทั่วไปของ Difficidin และ Oxydifficidin	10
4	ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	33
5	ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	34
6	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	36
7	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อ 36 เชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	37
8	ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	39
9	ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	40
10	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	41
11	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	42
12	ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	44
13	ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	45

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	46
15	ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	47
16	ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	50
17	ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	51
18	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	52
19	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	53
20	ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	55
21	ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	56
22	ผลของ silicone ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	58
23	ผลของ silicone ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	59
24	ผลของ PG-2000 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	60
25	ผลของ PG-2000 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	61

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	62
27	ผลของโมลาส และซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	63
28	ผลของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	65
29	ผลของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	66
30	ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	68
31	ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	69
32	ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	72
33	ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	73
34	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	74
35	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007	75
36	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง พีเอช และการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง	77

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
37	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง พีเอช และการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007 ระหว่างการเจริญในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง	78
38	ผลของพีเอชต่อการแสดงฤทธิ์ (A) และความคงตัว (B) ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	81
39	ผลของพีเอชต่อการแสดงฤทธิ์ (A) และความคงตัว (B) ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. LN 007	82
40	ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการแสดงฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* NSRS 89-24	84
41	ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการแสดงฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. LN 007	85

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ข้าว (*Oryzae sativa*) เป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ มีการเพาะปลูกทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศ เนื่องจากเป็นอาหารหลักของคนไทย นอกจากนั้นยังส่งเป็นสินค้าออกอันดับ 1 ของโลก ในปีการเพาะปลูก 2538-2539 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมด 63.353 ล้านไร่ (กรมเศรษฐกิจการพานิชย์, 2540) และในปี 2539 ประเทศไทยส่งข้าวออก 5.46 ล้านตันข้าวสาร คิดเป็นมูลค่า 50,734.5 ล้านบาท (พรรณี บุญงามอนงค์, 2540) ปัจจุบันมีการระบาดของโรคข้าวทำให้ผลผลิตลดต่ำลง ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นกับชาวนาทั่วทุกภาคของประเทศไทย (บุญชัย แซ่ด่าง, 2535) โรคข้าวที่ทำความเสียหายและระบาดอย่างกว้างขวางคือ โรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้ง ซึ่งโรคเหล่านี้เกิดจากเชื้อรา (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2534) การป้องกันและการรักษาในอดีตส่วนใหญ่จะใช้สารเคมี แต่ในปัจจุบันการเกษตรแผนใหม่ได้เริ่มทดลองควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิต และแก้ไขปัญหามลพิษจากสารเคมี เนื่องจากการใช้สารเคมีในการกำจัดโรคพืช ทำให้เกิดการทำลายสมดุลทางธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต และก่อปัญหาที่ไม่สามารถแก้ไขได้ในระยะยาว

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ได้มีผู้ทำการศึกษาและวิจัยกันอย่างแพร่หลาย เช่น มีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั่วไปที่ไม่ทำให้เกิดโรคต่อคนหรือสัตว์ แต่สามารถต่อต้านหรือควบคุมเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของโรคพืชชนิดต่างๆ โดยเฉพาะราที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้ง ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงได้มีการแยกเชื้อ antagonist *Bacillus subtilis* จากแปลงทดลองข้าว พบว่า *B. subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ NSRS 89-24 89-26 และ NSRS B_1 (Charigkapakorn *et al.*, 1991; นลินี จาริกภากร และคณะ, 2534) สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญหรือการแพร่กระจายของเชื้อราและแบคทีเรียของโรคข้าวทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* จึงได้ทำการศึกษาเบื้องต้นทั้งในระดับแปลงทดลองและในห้องปฏิบัติการพบว่า antagonist *B. subtilis* สามารถ

ควบคุมโรคข้าวที่สำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น ลดการใช้ปุ๋ยซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิต (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2537)

ในการวิจัยครั้งนี้ มุ่งศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง จังหวัดพัทลุง และเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ซึ่งแยกได้ใหม่ เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะสำหรับป้องกันและทำลายเชื้อราที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้ง โดยเลือกวัตถุดิบที่มีราคาถูกเป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อ

ตรวจเอกสาร

1. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

ประเทศไทยมีการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ปีหนึ่งเกือบห้าพันล้านบาท ข้อมูลล่าสุดในปี 2539 มีการนำเข้าเป็นมูลค่าประมาณ 197.5 ล้านดอลล่าร์สหรัฐหรือ 5,095.5 ล้านบาท (ธวัชชัย สิชฌวัฒน์, 2541) มูลค่าการนำเข้าเพิ่มขึ้นทุกๆปี สารเคมีเหล่านี้นอกจากจะเป็นอันตรายต่อผู้ใช้เองแล้วยังกระทบไปถึงผู้บริโภค ซึ่งอาจได้รับผลกระทบจากสารตกค้างในผลไม้และพืชผักต่างๆ นอกจากนั้นยังก่อให้เกิดปัญหาสภาพแวดล้อมเป็นพิษอีกด้วย ดังนั้นในทศวรรษที่ผ่านมานี้นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามใช้วิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีขึ้น การนำจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชเรียกว่าการควบคุมโดยการใช้จุลินทรีย์ (Microbial Control) ในปี ค.ศ 1949 Steinhaus ได้ให้คำจำกัดความของการควบคุมโดยการใช้จุลินทรีย์ว่า "การควบคุมโดยการใช้จุลินทรีย์เป็นส่วนหนึ่งของการควบคุมโดยชีววิธี เป็นการใช้จุลินทรีย์โดยมนุษย์เพื่อการควบคุมและรักษาระดับจำนวนของสัตว์หรือพืชในพื้นที่แห่งหนึ่ง" (จิราพร เพชรรัตน์, 2534) มีรายงานทั้งในประเทศและต่างประเทศที่ใช้จุลินทรีย์ต่อต้านโรคพืช เช่น เกษม สร้อยทอง (2532) ได้ใช้เชื้อรา *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าวสาเหตุจากเชื้อรา *Helminthosporium* sp. จิรเดช แจ่มสว่าง (2534) ได้ทดลองควบคุมโรคต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* นลินี จาริกภากร และคณะ (2535) ได้ศึกษาการป้องกันกำจัดโรคข้าวโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* Baker และคณะ (1985) ได้ใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการควบคุมโรคราสนิมถั่วโดยชีววิธี Broadbent และคณะ

(1971) ได้ใช้เชื้อแบคเรียและactinomycetes ในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora cinnamoni* สาเหตุของโรครากเน่าของสับปะรดในประเทศออสเตรเลีย Howell และ Stipanovic (1980) ได้รายงานว่าเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ Pf-5 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ 2 ชนิด คือ Pyrrolnitrin และ Pyoluteorin โดยที่ Pyrrolnitrin จะมีปฏิกิริยาต่อต้าน *Rhizoctonia solani* ส่วน Pyoluteorin จะมีปฏิกิริยาต่อต้าน *Pythium ultimum* แต่ไม่มีผลต่อ *R. solani* ดังนั้นจึงใช้เชื้อ *P. fluorescens* สายพันธุ์ Pf-5 ป้องกันโรคโคนเน่าระดับดินของต้นกล้า (damping-off) ที่มีเชื้อ *P. ultimum* และ *R. solani* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค Rytter และคณะ (1989) ใช้เชื้อ *B. subtilis* ป้องกันโรคราสนิมของไม้ดอกที่เกิดจากเชื้อ *Puccinia pelargonii-zonalis* ส่วน Ferreira และคณะ (1991) ได้แยกเชื้อ *B. subtilis* จากต้นองุ่น ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของ *Eutypa lata* สายสนม เอนกผลิน (2535) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด คือ *Pestalotia* sp. *Helminthosporium mydis* *Sclerotium rolfsii* และ *Curvularia lunata* เป็นต้น

ในปัจจุบันพบว่ามีหลายบริษัทที่ประสบความสำเร็จในการผลิตจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปเชิงการค้าและนำมาควบคุมโรคพืชต่างๆกันบ้างแล้ว ดังตารางที่ 1

2. โรคข้าวที่สำคัญ

พืชที่สนใจคือ ข้าว เนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นอาหารหลักของคนไทย โรคพืชที่ระบาดและก่อความเสียหายต่อนาข้าวอย่างรุนแรง ทำให้สูญเสียผลผลิตเป็นมูลค่ามหาศาล คือ

2.1 โรคใบไหม้ (Rice blast) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เชื้อชนิดนี้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะ ตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวในพื้นที่ที่มีความชื้นสูง โรคนี้จะเกิดขึ้นได้อย่างรุนแรงและรวดเร็ว โรคใบไหม้ในระยะกล้า ลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่กลางใบข้าว ถ้าไม่ป้องกันตั้งแต่ระยะแรก จุดสีน้ำตาลจะขยายลุกลามไปทั่วใบ ถ้าเป็นรุนแรง กล้าข้าวจะแห้ง และฟุบตายคล้ายถูกไฟไหม้ โรคใบไหม้อาจจะพบตรงข้อต่อ กาบใบหรือคอรวงก็ได้ อาการจะเหมือนกับในระยะกล้า แต่แผลจุดสีน้ำตาลจะใหญ่ขึ้นและขอบแผลจะเป็นสีน้ำตาลเข้ม บริเวณข้อต่อใบเป็นสีน้ำตาลดำ และใบจะหลุดออกจากกาบใบในที่สุด โรคใบไหม้ของข้าวจะเป็นในระยะต้นฤดูนาปี โดย

เฉพาะในแปลงกล้าที่ตกกล้าหนาแน่น ใส่ปุ๋ยสูงอับลม แห้งแล้งในเวลากลางวันและชื้นจัดในตอนกลางคืนและอีกสาเหตุหนึ่งคือ เชื้อโรคแพร่กระจายมาตามลม (สมคิด ดิสถาพร, 2532)

ในปี 2535 พบโรคใบไหม้ระยะคอรวงระบาดทำความเสียหายแก่นาข้าวในเขตภาคเหนือตอนบนและอีสานทั้งหมด 12 จังหวัด รวมพื้นที่เสียหายเนื่องจากโรคนี้ประมาณ 1.37 ล้านไร่ สาเหตุของการระบาดเนื่องจากสภาวะอากาศแปรปรวนและก่อให้เกิดสภาพที่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของเชื้อรา (สมคิด ดิสถาพร, 2536)

วงจรของโรค conidia ของเชื้อรา *P. oryzae* ถูกปล่อยออกมาจากพืชที่เป็นโรคซึ่งส่วนมากเกิดในตอนกลางคืนที่มีน้ำค้างหรือมีฝนตก ในช่วงฤดูร้อนพบเชื้อนี้ในปริมาณน้อยและลมสามารถพา conodia ไปตกในที่ไกลๆได้ และเมื่อ conidia ตกลงบนต้นข้าวในสภาวะที่เหมาะสม conidia จะงอกโดยการสร้าง germ tube ออกมาภายในเวลาประมาณ 4 ชั่วโมงบริเวณปลายของ germ tube นั้นจะสร้าง appressorium ออกมาซึ่งมีหน้าที่ช่วยยึดกับส่วนของพืชแล้วเชื้อราก็จะสร้างปมเล็กๆ มีลักษณะเป็นเส้นใยบางๆ แทงเข้าไปในผนังชั้นนอกของ epidermal cell แล้วเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของ host เมื่อเจริญเต็มที่ก็มีการสร้าง conidia เข้าสู่วงจรของโรคต่อไป (Ou, 1973)

วิธีการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้มักมุ่งเน้นการใช้พันธุ์ต้านทาน และการใช้สารเคมีควบคุมเชื้อราหรือการใช้ร่วมกันแบบผสมผสาน แม้ว่าสารเคมีควบคุมเชื้อราใช้ได้ผลดีแต่ก็ไม่คุ้มค่า และปัจจุบันพบว่าสารเคมีเป็นตัวทำลายสิ่งแวดล้อมก่อให้เกิดมลภาวะต่อสภาพแวดล้อม จึงต้องหากรรมวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ได้ผลดีในทุกด้านนั่นคือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) เข้าควบคุมการเกิดโรค

2.2 โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* พบได้ทุกภาคของประเทศ และจะระบาดรุนแรงในแปลงที่ใส่ปุ๋ยอย่างดี โดยเฉพาะเมื่อปักดำถี่หรือเมื่อข้าวแตกกอมาก โรคนี้จะพบมากในระยะข้าวแตกกอ และจะระบาดรุนแรงยิ่งขึ้น ถ้าข้าวแตกกอมากและเบียดเสียดกันแน่น โดยมีแผลเกิดขึ้นตรงระดับน้ำ และแผลจะมีสีเขียวปนเทา ถ้าไม่ป้องกันกำจัดตั้งแต่แรก แผลจะลุกลามขยายใหญ่ ขอบแผลจะมีสีน้ำตาลไหม้ เริ่มจากใบล่างขึ้นมา และลุกลามถึงใบ ทำให้กาบใบและใบข้าวแห้ง

วงจรของโรค sclerotium ของเชื้อรา *R. solani* ซึ่งส่วนมากอยู่ตามพื้นดินและถ้าบริเวณนั้นมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมเชื้อนี้สามารถดำรงชีพอยู่ได้นาน 1-2 ปี

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่างๆที่ผลิตและจำหน่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

ประเภทจุลินทรีย์ (ชื่อผลิตภัณฑ์)	โรคที่ควบคุม	ประเทศ/บริษัทที่ผลิต
กลุ่มเชื้อรา		
Chaetomium globosum	โรคเน่าระดับดินในผักกาดหวาน	สวิสเซอร์แลนด์
C. minitans	ควบคุมเชื้อ *Botrytis* และ *Sclerotinia*	เนเธอร์แลนด์
Gliocladium viren	โรคเน่าระดับดินในไม้ประดับ	อเมริกาจำหน่ายและผ่านการจดทะเบียนโดยองค์กรเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม (EPA)แล้ว
G. roseum	โรคเหี่ยวในมันฝรั่ง	อเมริกา
Trichoderma tri-4	โรคเน่าระดับดินในไม้ประดับ	อเมริกา
T. harzianum	โรคเน่าในผักกาดหวาน	อิตาลี
T. harzianum	โรคเน่าในหอม	อิยิปต์
T. harzianum	ควบคุมโรคพืชหลังเก็บ	อเมริกา
และ *T. polysporum*	เกี่ยวในผักและผลไม้	
T. polysporum ATCC 2045	ควบคุมเชื้อ Basidiomycetes	Eastman Kodak
และ *T. harzianum* ATCC 20476	และเชื้ออื่นๆที่เกิดในดิน	
T. harzianum F-stop	โรคที่เกิดจากเชื้อราในดิน	Bionab Bioinnovation-AB

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ประเภทจุลินทรีย์ (ชื่อผลิตภัณฑ์)	โรคที่ควบคุม	ประเทศ/บริษัทที่ผลิต
กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย		
Agrobacterium radiobacter (Strain 84)(Galltrol-A)	ควบคุมโรคปุ่มปมของโคนต้นไม้และผลไม้	Ag Biochem
Bacillus subtilis (Kodiak)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Bacillus subtilis (Quantum 4000 HB)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Bacillus subtilis (Quantum 4000 P)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Pseudomonas fluorescens (Dagger G)	ควบคุมโรคในกล้าจากเชื้อ *Pythium* และ *Rhizoctonia*	Ecogen
Streptomyces griseoviridis (Mycostop)	ควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราหลายชนิด	Kemira OY.

ที่มา: เปรมปรีย์ ณ. สงขลา (2537)

หลังจากที่ sclerotium ติดเข้าสู่ส่วนลำต้นของข้าวแล้วก็จะเจริญเป็นเส้นใยไมซีเลียม โดยไมซีเลียมจะเจริญอย่างรวดเร็วทั้งบนเซลล์และในเซลล์พืช หลังจากเจริญไประยะหนึ่งเส้นใยจะมีการสร้างแขนงแตกออกไปเรื่อยๆซ้ำหลายๆครั้ง ทำให้เส้นใยที่ได้นี้มีลักษณะเป็นเส้นสั้นๆ เรียกช่วงของการเจริญนี้ว่า infection cushions หลังจากนั้นเส้นใยจะเจาะผ่านชั้น epidermisเข้าไปเจริญในเซลล์ของก้านใบแล้วผลิต sclerotium เข้าสู่วงจรต่อไป (Matsuura,1986 : Ou, 1973)

3. ลักษณะและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*

ผู้ที่ตั้งชื่อจีนัสนี้คือ Ferdinand Cohn ในปี 1872 โดยเปลี่ยนชื่อจาก *Vibrio subtilis* เป็น *B. subtilis* (Harwood, 1989)

B. subtilis จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง มีการสร้างสปอร์ มีแฟลกเจลลาออกทางด้านข้าง มีสปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์ สปอร์สามารถทนความร้อนได้ เซลล์เรียงตัวกันเป็นสาย สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ 5-20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูง 45-55 องศาเซลเซียส พบได้ทั่วไปตามพื้นดิน ในอากาศ และในน้ำ ดำรงชีวิตทั้งแบบต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและพีเอช (Harwood, 1989) แต่เจริญได้ดีเมื่อมีอากาศและมีพีเอชเป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น อะไมเลส และโปรติเอส รวมทั้งจัดเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคแก่คนและสัตว์ (Bore and Diderichsen, 1991) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็งจะได้โคโลนีที่มีรูปร่างกลม หรือมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ผิวด้านหนาทึบแสงบางครั้งจะมีรอยย่น โคโลนีเป็นสีครีมจนถึงสีน้ำตาล เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่ต่างกัน ลักษณะโคโลนีที่ได้จะแตกต่างกัน *B. subtilis* สามารถเจริญได้รวดเร็วเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีความชื้นสูง การเลี้ยงในอาหารเหลวจะทำให้อาหารมีสีคล้ำขึ้นมีฝ้าที่มีลักษณะย่นติดต่อกัน อาจทำให้อาหารขุ่นเล็กน้อยหรือไม่ขุ่นเลย (Buchanan *et al.*, 1974)

4. กลไกการยับยั้งของสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *B. subtilis* จะมีผลไปทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ซึ่งแบ่งออกได้ตามความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ได้ 5 ประเภท (สมใจ เอี่ยมพรรัตน์, 2531)

4.1 มีผลต่อผนังเซลล์ ส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะจะไปมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้

4.2 มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเป็น semipermeable membrane โดยสารส่วนใหญ่จะผ่านเข้าสู่เซลล์แบบ active transport ซึ่งต้องใช้พลังงานและเยื่อหุ้มเซลล์จะควบคุมการปล่อยสารบางอย่างออกนอกเซลล์ด้วย สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์จะไปทำให้การนำสารเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ผิดปกติ ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้นานทำให้เซลล์ตายได้

4.3 มีผลขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิตเป็นกระบวนการที่สำคัญสำหรับการซ่อมแซมและสร้างเสริมเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการเจริญ ดังนั้นการยับยั้งหรือการขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจึงทำให้เซลล์ตายได้

4.4 มีผลขัดขวางหน้าที่ของกรดนิวคลีอิก กรดนิวคลีอิกเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญในการควบคุมเมตาโบลิซึมของเซลล์ ดังนั้นการขัดขวางการทำงานของกรดนิวคลีอิกจะทำให้เมตาโบลิซึมของเซลล์ผิดปกติไปด้วย

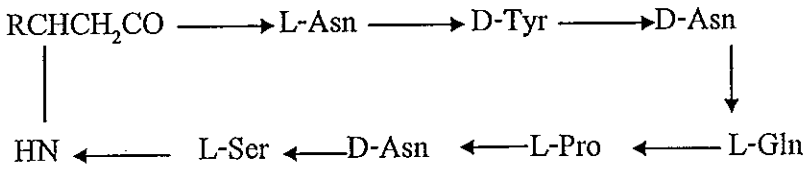
4.5 มีผลขัดขวางการสร้างพลังงานของเซลล์ พลังงานเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตเพราะต้องใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่นการสังเคราะห์โปรตีน ถ้าการสร้างพลังงานถูกขัดขวางกิจกรรมของเซลล์จะลดต่ำลง ทำให้เซลล์ตายได้

5. สารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*

Katz และ Demain (1977) รายงานว่าจีนัส *Bacillus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ทั้งหมด 167 ชนิด และเป็นสารปฏิชีวนะประเภทเปปไทด์ (peptide) ที่ผลิตจาก *B. subtilis* 68 ชนิด เช่น Mycobacillin, Subtilin, Bacilycin, Bacillomycin, Fungistatin, Bulbiformin, Bacillin, Subsporin, Bacillocin, Mycosubtilin, Fungocin, Iturin, Neocidin และ Eumycin ส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* มักจะถูกสร้างในระยะ stationary phase (Nakano *et al.*, 1988) เพราะเป็นช่วงที่เซลล์ของ *B. subtilis* เริ่มเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์และเซลล์อยู่ในสภาวะที่เริ่มขาดแคลนสารอาหารที่ใช้ในการดำรงชีวิต แต่ก็มีสารปฏิชีวนะบางชนิดที่เริ่มสร้างในระยะ exponential phase เป็นต้นไป เช่น Surfactin (Cooper *et al.*, 1981) สารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *B. subtilis* สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มๆ ดังนี้

5.1) lipopeptide ซึ่งประกอบด้วย

5.1.1 Iturin สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้จะประกอบด้วยกรดแอลฟาอะมิโน 7 ตัวต่อกันด้วยกรดเบต้าอะมิโน (Bland, 1996; Ohno *et al.*, 1992 a, 1995 b,1996; Asaka *et al.*,1995; Besson and Michel, 1992; Pusey, 1989) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้เช่น iturin A-E, mycosubtilin และ bacillomycins D, F และ L (Bland, 1996) โครงสร้างทั่วไปแสดงได้ดังภาพที่ 1



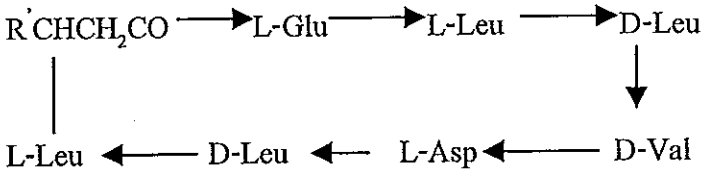
R คือ สายอะลิฟาติก (aliphatic side chain)

ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Iturin A (Ohno *et al.*, 1995 b)

สารปฏิชีวนะในกลุ่ม Iturin ส่วนใหญ่แล้วจะมีผลต่อต้านยีสต์และเชื้อรา และพบว่าIturin A จะได้รับความสนใจมากที่สุดเพราะว่า Iturin A สามารถที่จะยับยั้งเชื้อราในโรคพืชได้หลายชนิด (Sandrin *et al.*, 1990) เช่น

Ohno และคณะ (1996) พบว่า Iturin A สามารถต่อต้านโรคพืชได้หลายชนิด ซึ่งให้ผลการทดสอบได้ดีในแปลงต้นมะเขือเทศและต้นอ่อนของแตงโมในขณะที่ Pusey (1989) รายงานว่า Iturin ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้น้อยแต่สามารถต่อต้านเชื้อราได้ดี และจากการทดลองในคนและสัตว์พบว่า Iturin สามารถใช้รักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อราได้ ประเทศญี่ปุ่นได้จดลิขสิทธิ์ในหัวข้อที่พบว่า Iturin A สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในแตงกวา โรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้งในข้าว Kajamura และคณะ (1995) รายงานว่าได้ค้นพบ Iturin ชนิดใหม่ชื่อ Bacillopeptins ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา โดยผลิตจาก *B. subtilis* FR-2 และเป็นสารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Bacillomycin L

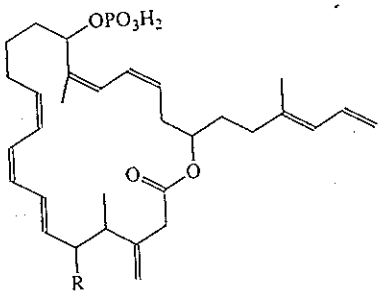
5.1.2 Surfactin เป็นสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติยับยั้งการรวมกลุ่มของ fibrin และเป็น biosurfactant ซึ่งมีคุณสมบัติลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 เป็น 27 mN/m^3 และประกอบด้วยสายของเปปไทด์ 7 ตัว คือ L-Glu, L-Leu, D-Leu, L-Val, L-Asp, D-Leu และ L-Leu เชื่อมกับกรดไขมัน β-hydroxy โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2 (Ohno *et al.*, 1995 a)



R' คือ สายอะลิฟาติก (aliphatic side chain)

ภาพที่ 2 โครงสร้างทั่วไปของ Surfactin (Ohno *et al.*, 1995 a)

5.2) difficidin และอนุพันธุ์ ได้แก่ difficidin และ oxydifficidin ส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนเช่น *Morganella morgnii, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, P. mirabilis* และ *E. aerugenes* (Zimmerman *et al.*, 1987; Wilson *et al.*, 1987 อ้างโดย สุชล แก้วพรหม, 2539) โครงสร้างทั่วไปแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างทั่วไปของ difficidin (R=H) และ oxydifficidin (R=OH) (Suphantharika *et al.*, 1994)

5.3) สารระเหย สารระเหยที่ผลิตจาก *B. subtilis* สามารถยับยั้งเชื้อราบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคได้ แต่สารชนิดนี้ยังไม่ทราบสูตรโครงสร้างที่แน่นอน (Fiddaman and Rossall, 1993) และรายงานฉบับนี้เป็นฉบับแรกที่พบว่าสารระเหยที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* มีความสามารถที่จะยับยั้งส่วนสืบพันธุ์ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคได้ ในทำนองเดียวกัน

สุชล แก้วพรหม (2539) พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถผลิตสารระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ค่อนข้างสูง และมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ ด้วยซึ่งสารระเหยที่ผลิตได้นี้ผลิตได้มากที่สุดในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* เป็นแบบการยับยั้งชั่วคราว สามารถยับยั้งหน่วยสืบพันธุ์ของเชื้อราโรคข้าวได้ทั้งสปอร์ของ *R. oryzae* และ sclerotium ของ *R. solani* โดยเฉพาะสปอร์ของ *R. oryzae* การยับยั้งจะเกิดภายใน 48 ชั่วโมง

6. หลักทั่วไปในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคพืชแบบชีววิธี (Cook and Baker, 1983 อ้างโดย สุชล แก้วพรหม, 2539)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชได้นั้นควรมีสมบัติดังนี้

6.1 ลดจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค หรือควบคุมให้มีระดับต่ำกว่าที่จะก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ

6.2 ทำให้พืชสามารถป้องกันตนเองจากการติดเชื้อก่อโรค

6.3 ควบคุมหรือจำกัดขอบเขตของการเกิดโรคหลังจากที่พืชติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแล้วไม่ให้แพร่กระจายมากขึ้น

7. สาเหตุที่ *B. subtilis* เหมาะที่จะเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (นลินี จาริกภากร, 2534)

7.1 สามารถเข้าทำลายโดยตรง ทั้งยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิดในขณะเดียวกันและสามารถแก่งแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน

7.2 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มักจะพบอาศัยอยู่ภายในพืชโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืชที่อยู่อาศัย

7.3 มีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสภาพอากาศร้อนชื้นได้ดี

7.4 บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารพวก toxic metabolite บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการนำมาใช้กระตุ้นการเกิดความต้านทานของพืชต่อเชื้อสาเหตุของโรคพืชที่เข้าทำลาย จากเหตุผลดังกล่าว พอสรุปได้ว่า *B. subtilis* มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานความสามารถในการควบคุมโรคพืช แบคทีเรียและรา เช่น *R. solani, Sclerotinia sclerotiorum*

8. การใช้ประโยชน์ของสารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp.

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญที่สุดที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและโรคพืชโดยเฉพาะ *B. thuringiensis* (B.T) มีการนำมาใช้ในการกำจัดแมลงอย่างกว้างขวางและสามารถผลิตเป็นการค้าได้ (จิราพร เพชรรัตน์, 2534) *B.thuringiensis* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก สร้างสปอร์และผลิตโปรตีนเนื่องจากโปรตีนที่สร้างขึ้นมีฤทธิ์ในการทำลายแมลงศัตรูชนิดต่าง ๆ ทำให้เชื้อแบคทีเรียนี้เข้ามามีบทบาทในการควบคุมแมลงศัตรูพืชซึ่งมีความสำคัญทั้งทางด้านการเกษตรและการแพทย์ และพบว่า *B. thuringiensis* สามารถใช้ร่วมกับสารเคมีอื่นได้หลายชนิด เช่น รวมกับสารกำจัดเชื้อราสารฆ่าแมลง สารกำจัดวัชพืช รวม 26 ชนิด (Falcon, 1977 อ้างโดย จิราพร เพชรรัตน์, 2534)

ในปัจจุบันแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ศึกษากันมากคือ *B. subtilis* เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราซึ่งต่างจาก *B. thuringiensis* ที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในสหรัฐอเมริกามีการจดลิขสิทธิ์ *B. subtilis* เพื่อผลิตทางการค้าโดยมีชื่อทางการค้าว่า Kodia โดยใช้เป็นสารคลุกเมล็ดพันธุ์พืชป้องกันเชื้อราก่อโรคจากดิน (Cook, 1993 อ้างโดย สุชล แก้วพรหม, 2539)

นลินี จาริกภากร และคณะ (2534) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ 89-26 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* และ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถลดอาการโรคขอบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข1 โดยที่ *B. subtilis* NSRS 89-26 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดีกว่าสายพันธุ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 สำหรับโรคขอบใบแห้งนั้นสามารถถูกควบคุมจากการเป็นโรคร้อยละ 94 เหลือเพียง ร้อยละ 10 โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-26 และร้อยละ 19 โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และสายพันธุ์รวม ดังนั้นจากการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง

สองสายพันธุ์มีแนวโน้มที่จะเป็นจุลินทรีย์ต่อต้านโรคข้าวที่ดีต่อไปในอนาคต

การทดสอบการควบคุมโดยวิธีคลุกเมล็ด พบว่าสายพันธุ์ *B. subtilis* NSRS 89-26 ช่วยลดอัตราการเกิดโรคของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าได้ดี ไม่มีผลกระทบต่อร้อยละของการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดต้นกล้า และเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่มีการคลุกเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ในสภาพที่มีโรคระบาดหรือมีโรคที่ติดมากับเมล็ด (นลินี จาริกภากร, 2534)

มานะ กาญจนมณีเสถียร (2539) ทดสอบและเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ No.1 No.24 และ No.26 ในการยับยั้งการงอกของโครงสร้าง sclerotium ของเชื้อ *R. solani* ในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ No. 26 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของโครงสร้าง sclerotium การตรวจสอบโครงสร้าง sclerotium โดยกล้องจุลทรรศ์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scaning Electron Microscope) พบว่าเส้นใยที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง sclerotium ถูกทำลายเสียหาย ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *B. subtilis* No. 26 มาใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคกาบใบแห้งโดยวิธีราดดินพบว่า เชื้อ *B. subtilis* No. 26 สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวได้

มณเฑียร เมฆธน (2536) คัดเลือกเชื้อ *B. subtilis* 5 สายพันธุ์ โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนเป็นตัวคัดสายพันธุ์ได้สายพันธุ์ที่ดีที่สุดคือ *B. subtilis* AP 01 เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *X.campestris* pv. *citri* สาเหตุของโรคแคงเกอร์ในส้ม เชื้อรา *Fusarium roseum* สาเหตุโรคเหี่ยวและโคนเน่าของกล้วยไม้ *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโอ พบว่า *B. subtilis* AP 01 สามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา 2 ชนิด แบบเข้าครอบครอง (colonization) โดย *B. subtilis* AP01 สามารถเจริญเข้าครอบคลุมเชื้อสาเหตุของโรคพืชได้ แต่การควบคุมการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่า โคนเน่าในทุเรียน *Colletotricum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของถั่วเหลือง และ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคโคนเน่า ต้นเน่าในของถั่วลิสง เป็นแบบสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) โดยจะเห็นวงใสระหว่างการทดลอง เมื่อนำเชื้อ *B. subtilis* AP 01 เข้มข้นไปทดลองป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนหมอนทอง โดยการทาแผล ราดดิน และฉีดพ่นบนต้นทุเรียน พบว่าแผลของต้นทุเรียนที่เป็นโรคแห้งสนิทและแตกใบอ่อนหลังจาก

การทดลองภายใน 30 วัน

Ohno และคณะ (1992 b) พบว่า *B. subtilis* RB 14 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผสมโดยเลี้ยงในอาหาร No. 3S medium สามารถผลิตสาร surfactin ได้

Ohno และคณะ (1996) ศึกษาการนำ okara (soybean curd residues) โดยใช้เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NB22 ซึ่งเลี้ยงแบบอาหารแข็ง (Solid State Fermentation) พบว่า *B. subtilis* NB 22 สามารถใช้ okara เป็นสับสเตรทที่ดีในการผลิตสารปฏิชีวนะ Iturin A

Phae และ คณะ (1990) รายงานว่า *B. subtilis* NB 22 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด เช่น *R. solani* *Pyricularia oryzae* และ *Cochliobolus miyabeanus*

Ferreira และคณะ (1991) แยกเชื้อ *B. subtilis* จากต้นองุ่น (*Vitis vinifera* L.) พบว่า *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะในห้องปฏิบัติการได้อย่างน้อย 2 ชนิด และมีผลยับยั้งการเจริญของ *Eutypa lata* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค dieback ในต้นองุ่น

จากรายงานหลายๆฉบับ จะเห็นได้ว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถสร้างสารเปปไทด์ที่มีผลต่อต้านเชื้อราและต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้ หลายชนิดดังตารางที่ 2

9. การผลิตสารปฏิชีวนะ

การผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ แบ่งได้ 2 แบบใหญ่ คือแบบที่เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (surface culture method) ซึ่งจะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ต้องการบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและแบบที่เลี้ยงในอาหารเหลว (submerged-culture method) ซึ่งเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ต้องการในอาหารเลี้ยงชนิดเหลว เป็นที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากสามารถควบคุมการผลิตได้ดีกว่า และสามารถทำการผลิตแบบต่อเนื่องได้โดยทั่วไปการผลิตสารปฏิชีวนะจะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารภายใต้สภาวะที่เหมาะสำหรับการเจริญและการให้ผลผลิตโดย Iwai และ Omura (1982) ได้แบ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเป็น 2 ประการใหญ่ๆ คือ

9.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

9.2 สภาวะของการเลี้ยงเชื้อ

9.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

9.1.1 แหล่งคาร์บอน คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับการเจริญ และการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ในการผลิตสารปฏิชีวนะนั้น พบว่ากลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ในขณะเดียวกันกลูโคสก็ทำให้เกิด carbon catabolite regulation ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด (Martin and Demain, 1980) ซึ่งการแก้ปัญหาทำได้หลายวิธี เช่น การใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (Iwai and Omura, 1982) หรือการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือกลูโคสสำหรับให้จุลินทรีย์เจริญ และคาร์บอนชนิดอื่นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะหรือโดยการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นระยะ หรือเติมแหล่งคาร์บอนทีละน้อย (Martin and Demain, 1980) นอกจากนี้อาจทำได้โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ โดยพันธุ์กลายที่ได้นี้จะสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีในอาหารที่มีกลูโคสอยู่สูง

Haavik (1974 a,b) รายงานว่าในการเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ Bacitracin นั้น เชื้อสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี แต่เมื่อกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 1 จะทำให้มีผลยับยั้งการผลิต Bacitracin เนื่องจากกลูโคสที่มีปริมาณมากเกินไปนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและกรดไพรูวิก โดยที่กรดสองชนิดนี้มีผลยับยั้งการผลิต Bacitracin เช่นเดียวกับรายงานของ Chevanet และคณะ (1986) ที่พบว่าในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NCIB 8872 เพื่อผลิต Bacilomycin-L เชื้อสามารถผลิต Bacilomycin-L ได้สูงที่สุดเมื่อใช้กลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และกลูโคสที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรจะมีผลทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะ Bacilomycin-L ลดลง

สุชล แก้วพรหม (2539) พบว่าอาหารสูตร PDB เป็นอาหารที่ช่วยส่งเสริมหรือชักนำให้เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีการผลิตสารปฏิชีวนะมากที่สุด รองลงมาคือ Czapek Dox Broth (CDB) และ NB ตามลำดับ ซึ่งในอาหารสูตร PDB นี้ แหล่งคาร์บอนคือกลูโคสร้อยละ 2.0

นอกจากกลูโคสแล้วก็ยังมีการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น การผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* ใช้แมนนิทอล ฟรุกโตสและซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิต Iturin A ได้มากกว่าใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Besson *et al.*, 1987) การผลิต Surfactin ร่วมกับการผลิต Iturin A จาก *B. subtilis*

ATCC 21332 ใช้ ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี (Sandrin *et al.*, 1990) การผลิต Aurantinin จาก *B. aurantinus* ที่ใช้กลีเซอรอลและแป้งร่วมกันเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจุลินทรีย์มีการใช้กลีเซอรอลในการเจริญและใช้แป้งในการผลิต Aurantinin โดยจะผลิต Aurantinin เมื่อกลีเซอรอลเกือบหมดแล้วและเริ่มใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นกลีเซอรอลจึงเป็น carbon catabolite เช่นกัน (Nishikiori *et al.*, 1978 อ้างโดย สุชาดา คูชัยสิทธิ์, 2535) แสดงว่ายังมีแหล่งคาร์บอนอื่นที่ทำให้เกิด carbon catabolite ได้ นอกจากนี้ในการทดลองของ อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรัตน์ (2532 ก) พบว่า *Bacillus* KUBA 8601.2 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพดหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารปฏิชีวนะที่ผลิตและพบว่าน้ำตาลชนิดที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างช้าๆจะให้ผลผลิตของสารปฏิชีวนะสูง (Hu and Demain, 1979)

9.1.2 แหล่งไนโตรเจน การผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่พบว่าอะมิโนไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด และทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีด้วย อะมิโนไนโตรเจนที่ใช้กันมาก ได้แก่ L-asparagine glycine arginine และ aspatic acid (Aharonowitz and Demain, 1979; Byrne and Greenstein, 1986) การเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะมีการควบคุมโดย nitrogen metabolite ซึ่งการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะสามารถถูกกดการสร้างได้โดยแอมโมเนีย (ammonia) และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้ได้เร็ว (Aharonowitz, 1980)

Hanlon และคณะ (1982) รายงานผลของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อการผลิต bacitracin จากเชื้อ *B. licheniformis* พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสูงในระดับหนึ่งจะมีผลไปยับยั้งการสร้าง Bacitracin แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสารปฏิชีวนะที่ผลิตเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน เช่นการเลี้ยงเชื้อ *B. brevis* เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะไทโรซิดีน (tyrocidine) พบว่า ถ้าไม่เติมกรดอะมิโนในอาหารไทโรซิดีนที่ผลิตได้เป็นชนิด A B และ C แต่ถ้าเติมทริปโตเฟนในอาหารสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้เป็นชนิด C และ D และถ้าเติมฟีนีลอะลานีนสารปฏิชีวนะเป็นชนิด A และ B ถ้าเติมฟีนีลอะลานีนและทริปโตเฟนเชื้อสามารถผลิตสารปฏิชีวนะชนิด A B C และ D (Katz and Demain, 1977)

ตารางที่ 2 การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

พืช	เชื้อที่ทำให้เกิดโรค
Apple	*Nectria galligena* Bres.
	Phytophthora cactorum Leb.
Carnation	*Fusarium oxysporum* Schlecht.
Cherry	*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler
	Monilinia fructicola (Wint.) Honey
Citrus	*Alternaria citri* Ellis & Pierce
Corn	*Fusarium roseum* (LK.) emend. Snyd. & Hans
Cotton	*Fusarium oxysporum* Schlecht.
Onion	*Sclerotium cepivorum* Berk.
Stone fruit	*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey
Potato	*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid
	Botryodiplodia solani-tuberosi Thirum. & O'Brien
Snap dry bean	*Uromyces appendiculatus* (Pers. ex Pers.) Unger
Soybean	*Phomopsis* sp. Sacc.
	Rhizoctonia solani Kuhn
Sugarbeet	*Rhizoctonia* sp. DC.

ที่มา : Pusey (1989)

Besson (1987) พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ Iturin แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตคือ L-glutamic acid L และ D-aspatic และ L-asparagine ส่วน D-asparagine จะยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะ

Chevanet และคณะ (1986) รายงานว่า DL-alanine ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมล และ L-glutamic acid ความเข้มข้น 34 มิลลิโมลจะส่งเสริมการผลิต Bacilomycin-L

สุชาดา ดูชัยสิทธิ์ (2535) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* B31 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ก็คือ L-glutamic acid ร้อยละ 0.4 หรือ monosodium glutamate ร้อยละ 0.8 จุลินทรีย์บางชนิดต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปของไนโตรเจนเชิงซ้อน (complex nitrogen) เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* KUBA 8601.2 พบว่าสามารถใช้กากถั่วเขียวเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตได้ (อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรัตน์, 2532ข) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่แล้วไม่ค่อยพบว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะ (Pusey and Wilson, 1984)

9.1.3 ฟอสเฟตอนินทรีย์ (inorganic phosphate) การที่มีฟอสเฟตอนินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะเร่งการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและกระบวนการหายใจทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดี แต่จะมีการผลิตสารปฏิชีวนะต่ำ (Weinberg, 1973; Kleinkauf and Dohren, 1985) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น ฟอสเฟตอนินทรีย์ 10 มิลลิโมล เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (Martin and Demain, 1980) กล่าวคือการผลิต Candicidin จาก *Streptomyces niveus* Oxytetracycline จาก *Streptomyces rimusus* และ Bacitracin จาก *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

9.1.4 เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) ที่นิยมใช้เพิ่มผลผลิตสารปฏิชีวนะคือโซเดียมคลอไรด์ เช่น การผลิต Streptomycin จากเชื้อ *Streptomyces griseus* ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ผลผลิตจะเพิ่มขึ้น แต่ถ้ามากเกินไปจะยับยั้งการผลิต (ดวงพร คันธโชติ, 2530) และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่า ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อเจริญได้ดี (ธีรโชติ มณีโชติ, 2537)

9.1.5 โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace elements) โลหะมีความจำเป็นเนื่องจากเป็น activator ของเอนไซม์ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากสารปฏิชีวนะจัดเป็น secondary metabolites โลหะที่ต้องการและมีบทบาทสำคัญคือ Mg Mn Fe และ Zn

เช่น Leifert และคณะ (1995) รายงานว่า *B. subtilis* CL 27 และ *B. pumilus* CL 45 ในอาหาร NB ที่มี Mn จะชักนำให้เพิ่มกิจกรรมการต่อต้าน *Botrytis cinerea* และเพิ่มการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ในทำนองเดียวกัน Oyama และ Kubota (1993) ก็ได้รายงานว่า *B. brevis* ATCC 818 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สองชนิดคือ Tyrocidine และ Gramicidine ในระยะแรกของ stationary phase จากนั้นจะสร้างสปอร์โดยที่ Mn^{2+} มีความสำคัญในการชักนำให้แบคทีเรียนี้สร้างสปอร์และผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิต Bacitracin โดย *B. licheniformis* ส่งเสริมได้โดยการเติม Mg ลงในอาหาร (Hanlon *et al.*, 1982) การเติมเหล็กลงในอาหาร PDB พบว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* AF 1 (Podile *et al.*, 1987)

ความต้องการโลหะของ *B. subtilis* อยู่ในปริมาณน้อย และปริมาณของโลหะที่ต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะและการเจริญจะต่างกัน โดยความต้องการสำหรับขบวนการผลิตสารปฏิชีวนะจะมากกว่าความต้องการสำหรับการเจริญ 10 ถึง 100 เท่า (Iwai and Omura, 1982)

9.2 สภาวะการเลี้ยงเชื้อ

9.2.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ พบว่าการยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะเนื่องจากกลูโคสไม่ได้เป็นผลมาจาก carbon catabolite repression เพียงอย่างเดียว แต่เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการผลิตเช่นการยับยั้งการผลิต Bacitracin โดย *B. licheniformis* เนื่องจากพีเอชที่ลดลง ซึ่งเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์จากการใช้กลูโคสของจุลินทรีย์ (Haavik, 1974 b) โดยทั่วไปจะพบว่าช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการผลิตสารปฏิชีวนะค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดต่ำลงเสมอ *B. subtilis* เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-8.5 (Buchanan *et al.*, 1974) และการรักษาพีเอชในอาหารไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก อาจทำได้โดยการเติม buffering agent เช่น $CaCO_3$ และ K_2HPO_4 (Iwai and Omura, 1982) และการควบคุมพีเอชในอาหารระหว่างการผลิตให้เหมาะสมจะทำให้ผลิตเพิ่มขึ้นได้

9.2.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะเพราะพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิหนึ่งที่ค่อนข้างคงที่ แต่มักไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ

CENTRAL LIBRARY
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ของจุลินทรีย์ (ดวงพร คันธโชติ, 2530) เช่น การผลิต colistin จากเชื้อ *B. polymyxa* ผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส โดยมีการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่การผลิต Colistin ลดลง (Kuratsu and Inuzuka, 1983) Deltamycin อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตคือ 20 องศาเซลเซียส (Okamura *et al.*,1977)

Phae และ Shoda (1991) ก็พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต Iturin จาก *B. subtilis* คือ 30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่สูงขึ้นถึง 40 องศาเซลเซียสจะเหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่า

9.2.3 ปริมาณออกซิเจน การผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำนั้นมีปริมาณต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศในอาหารเหลวที่ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะ (Tuffile and Pinto, 1970) ปริมาณอากาศที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น เช่น การผลิต Colistin จาก *B. polymyxa* ต้องการออกซิเจนมาก โดยพบว่าการกวนในอัตรา 600-700 รอบต่อนาที ทำให้ผลผลิตสูงขึ้น (Karatsu and Inuzuka, 1983) ในทำนองเดียวกัน ประไพศรี สมใจ (2538) ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* TISTR 1 พบว่าเมื่อให้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ 1.99×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อให้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง เป็น 3.61×10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการป้องกันราโดยสารชีวภาพจากจุลินทรีย์นี้ พบว่าน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพการป้องกันการเจริญของราทดสอบสูงกว่าอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NB22 เพื่อผลิต Iturin พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่ออัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 0.3 VVM แต่อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการผลิต iturin คือ 0.1 VVM (Phae and Shoda, 1991)

9.2.4 ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ความดัน oxidation-reduction potential เช่น การผลิต Bicyclomycin จาก *Streptococcus sappronensis* สามารถทนต่อสภาพรีดิวซ์ในการผลิตได้ โดยเพิ่มการกวนร่วมกับการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ไม่สร้าง aerial mycelium เพื่อป้องกันการสูญหายของพลาสมิดเมื่อเซลล์ถูกทำลายเนื่องจากการกวน (Miyoshi *et al.*, 1980) ส่วนสารกำจัดฟอง (antifoam) ที่ดีควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้ (สมใจ ศิริโชค, 2537) คือ

กระจายตัวได้ดีและทำลายฟองได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ความเข้มข้นต่ำ ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ มนุษย์และสัตว์ ไม่ทำให้เกิดปัญหาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ไม่มีผลต่อการส่งผ่านออกซิเจน ทนความร้อนที่ใช้ในการทำให้ปราศจากเชื้อได้และราคาถูก

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 บนเครื่องเขย่าและเลือกวัตถุดิบที่มีราคาถูกเป็นอาหาร ในการเลี้ยงเชื้อ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในถังหมัก
3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวที่ผลิตได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

- น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้
- กากน้ำตาล

2. จุลินทรีย์

Bacillus LN 007 ซึ่งแยกโดยอาจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง จังหวัดพัทลุง เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Nutrient Agar Slant (NA)

Pyricularia oryzae และ *Rhizoctonia solani* จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar Slant (PDA)

3. สารเคมี

- สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก
- สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับพีเอช
- สารกำจัดฟอง 2 ชนิด คือ Silicone และ Polypropylene glycol-2000

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก)

- Potato Dextrose Agar (PDA)
- Nutrient Broth (NB)
- Glucose-Asparagine Mineral Salts Medium (GAM)
- No. 3 Medium
- Mckeen
- Glucose-Meat Extract Peptone Medium (GMP)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช Model HM-7E ของบริษัท Tokyo TOA Electronic Co., Ltd.
2. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubator) ของบริษัท Lab-Line Instruments Co., Ltd.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น W 350 ของบริษัท Memmert GmbH Co.
4. เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer) ของบริษัท Lab-Line Instruments Co., Ltd.
5. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Model U-2000 พร้อมเครื่องพิมพ์ของบริษัท Hitachi จำกัด
6. เครื่องเหวี่ยง Type SCR 20 ของบริษัท Hitachi Koki Co., Ltd.
7. ถังหมักขนาด 3 ลิตร รุ่น MDL-4CR ของบริษัท B.E MARUBISHI Co., Ltd.

การวิเคราะห์

1. ค่าพีเอช

วัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

2. การเจริญของเชื้อ

วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ดัดแปลงจาก A.O.A.C, 1990)

ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ด้วยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในเดสิเคเตอร์) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น แล้วหมุนเหวี่ยงเหมือนเดิม 2 ครั้ง นำหลอดทดสอบที่มีแบคทีเรียไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 8-12 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดสิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก

4. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Dobois *et al.*, 1956)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 ในน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10-20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร สำหรับหลอดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพภาคผนวก ข)

5. วิธีทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อราของสารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Mckeen *et al.*, 1986)

5.1 การเตรียมสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

เมื่อครบกำหนดเวลาการเพาะเลี้ยง นำน้ำหมักไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และ *Rhizoctonia solani*

5.2 การเตรียมจานเพาะเชื้อรา

5.2.1 *Pyricularia oryzae*

เลี้ยงเชื้อในจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบๆ โคโลนี นำวุ้นที่เจาะได้ไปวางกลางจานอาหาร PDA จานใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (33 °C) 4 วัน จนได้โคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร

5.2.2 *Rhizoctonia solani*

เลี้ยงเชื้อในจานอาหาร PDA ใช้เชื้ออายุประมาณ 1 วัน ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.2.1

5.3 การทดสอบ

5.3.1 เตรียมอาหาร PDA double strength ผสมกับส่วนใสที่ได้จากข้อ 5.1 ในอัตราส่วน 1:1 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ จานควบคุมใส่น้ำกลั่นแทนส่วนใส

5.3.2 เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้วให้นำเชื้อราจากข้อ 5.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางลงตรงกลางจานอาหาร

5.3.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วสังเกตุการเจริญของเชื้อรา โดยเชื้อรา *P. oryzae* จะใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน ส่วนเชื้อรา *R. solani* ใช้เวลาประมาณ 2 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราจากสูตร (Gamliel และคณะ, 1989)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - \left[\frac{r^2 \times 100}{R^2} \right]$$

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ และทำการทดลอง 2 ครั้ง วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ IRRISTAT version 90-1 (1990)

วิธีการทดลอง

ก. การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก *Bacillus* โดยการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า

1. การคัดเลือกสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* 2 สายพันธุ์

ทำการเตรียมกล้าเชื้อ (seed inoculum) โดยเลี้ยง *Bacillus* sp. LN 007 และ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 บนอาหาร NA slant นาน 20-24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อ 2 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว 4 สูตร คือ Mckeen GAM

GMP และ No. 3 medium โดยเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0 6 12 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างละ 3 ฟลาสก์ นำแต่ละตัวอย่างทำการวัดความขุ่นของเซลล์ ที่ OD 660 นาโนเมตร วัดพีเอช และนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราได้มากที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อๆไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา

ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา และใช้สภาพการเลี้ยงตามข้อ 1 ทดลองครั้งละ 3 ฟลาสก์ ทำ 2 ซ้ำ โดยที่เมื่อครบเวลา ก็จะเก็บตัวอย่างไปวัดการเจริญเติบโต วัดพีเอช และทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เวลา 0 12 24 36 และ 48 ปัจจัยที่ศึกษามีดังนี้

2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

2.1.1 ผลของชนิด

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 1 โดยเปลี่ยนชนิดของน้ำตาลจากกลูโคสเป็น ซูโครส แลคโตส และ โมลาส (molasses) โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนชนิดละ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างควบคุมใช้อาหารเหลวตามสูตรอาหารที่คัดเลือกได้

2.1.2 ผลของปริมาณ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจากข้อ 2.1.1 โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 2.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์

2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

2.2.1 ผลของชนิด

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตามข้อ 2.1.2 และใช้แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ $(NH_4)_2HPO_4$ NH_4NO_3 และ Urea แทนแหล่งไนโตรเจนเดิม โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเตรียมตัวอย่างควบคุม

โดยใช้อาหารเหลวตามสูตรอาหารที่คัดเลือกได้

2.2.2 ผลของปริมาณ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมตามข้อ 2.2.1 โดยใช้ไนโตรเจนที่มีความเข้มข้น 0.2 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์

2.3 ผลของการเติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace elements)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราตามข้อ 2.2 แล้วเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace elements) ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

2.4 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราตามข้อ 2.3 แล้วปรับให้มีพีเอช 5 6 7 และ 8 ตามลำดับด้วย NaOH และ HCl

2.5 ผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราตามข้อ 2.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

2.6 ผลของการให้อากาศ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราและที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 2.5 นำไปเขย่าให้อากาศที่มีอัตราส่วนของอาหารต่อขนาดของฟลาสก์เป็น 50/250 100/250 และ 150/250

2.7 ผลของสารกำจัดฟอง (antifoams)

ผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 และใช้สารกำจัดฟอง (antifoams) 2 ชนิด คือ Silicone และ PG-2000 (polypropylene glycol-2000)

3. ศึกษาชนิดของ complex medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา

สารอาหารที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือ โมลาส และที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนคือ น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ โดยจะทำการทดลองดังนี้

3.1 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 2 แต่จะเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นโมลาส โดยให้มีความเข้มข้นของโมลาสเป็น 1.0 2.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมจากข้อ 2 แต่จะเปลี่ยนแหล่ง

ไนโตรเจนเป็นน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ที่มีความเข้มข้น 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข. การศึกษาการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก *Bacillus* โดยการเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ (ขนาด 3 ลิตร)

ในการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา จะทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยเลี้ยง *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลวที่เหมาะสม (ซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาบนเครื่องเขย่า) ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยจะเก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 12 24 36 และ 48 เพื่อนำไปวัดการเจริญของเซลล์ วัดพีเอช และทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ โดยทำการศึกษาดังนี้

1. ผลของการควบคุมพีเอชเริ่มต้น

เปรียบเทียบการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราเมื่อมีการควบคุมพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 2.6 และไม่ควบคุมพีเอชในถังหมัก โดยเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (VVM)

2. ผลของอัตราการกวน

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนที่ 200 300 และ 500 รอบต่อนาที โดยควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 VVM

3. ผลของอัตราการให้อากาศ

เลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการกวนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 แล้วทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการให้อากาศที่ 1 และ 2 VVM

4. ศึกษาจลนพลศาสตร์ในถังหมักของเชื้อ *Bacillus* 2 สายพันธุ์

เลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3 แล้วทำการ ศึกษาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ค. ความคงตัวของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้

นำตัวอย่างที่เก็บไว้ไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสไปศึกษาดังนี้

1. ความคงตัวของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

ศึกษาโดยแบ่งส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอดทดสอบ (16x150) หลอดละ 10 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 35 50 70 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 30 60 120 นาที 6 และ 12 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้

2. การแสดงฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ที่พีเอชต่างๆ

ศึกษาโดยแบ่งส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอดทดสอบ (16x150) หลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วปรับให้มีพีเอชเท่ากับ 1 3 5 7 9 11 และ 13 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ส่วนชุดควบคุมจะไม่มีสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราแล้วปรับพีเอชเช่นเดียวกัน

3. ความคงตัวของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ที่มีพีเอชต่างๆกัน

ศึกษาโดยแบ่งส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอดทดสอบ (16x150) หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 1 3 5 7 9 11 และ 13 ด้วย NaOH และ HCl เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับให้มีพีเอช 7 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้

4. การเก็บรักษาสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้

ศึกษาโดยแบ่งส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอดทดสอบ (16x150) หลอดละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 49 วัน นำมาทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ทุกๆ 7 วัน

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

ก. การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก *Bacillus* โดยการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า

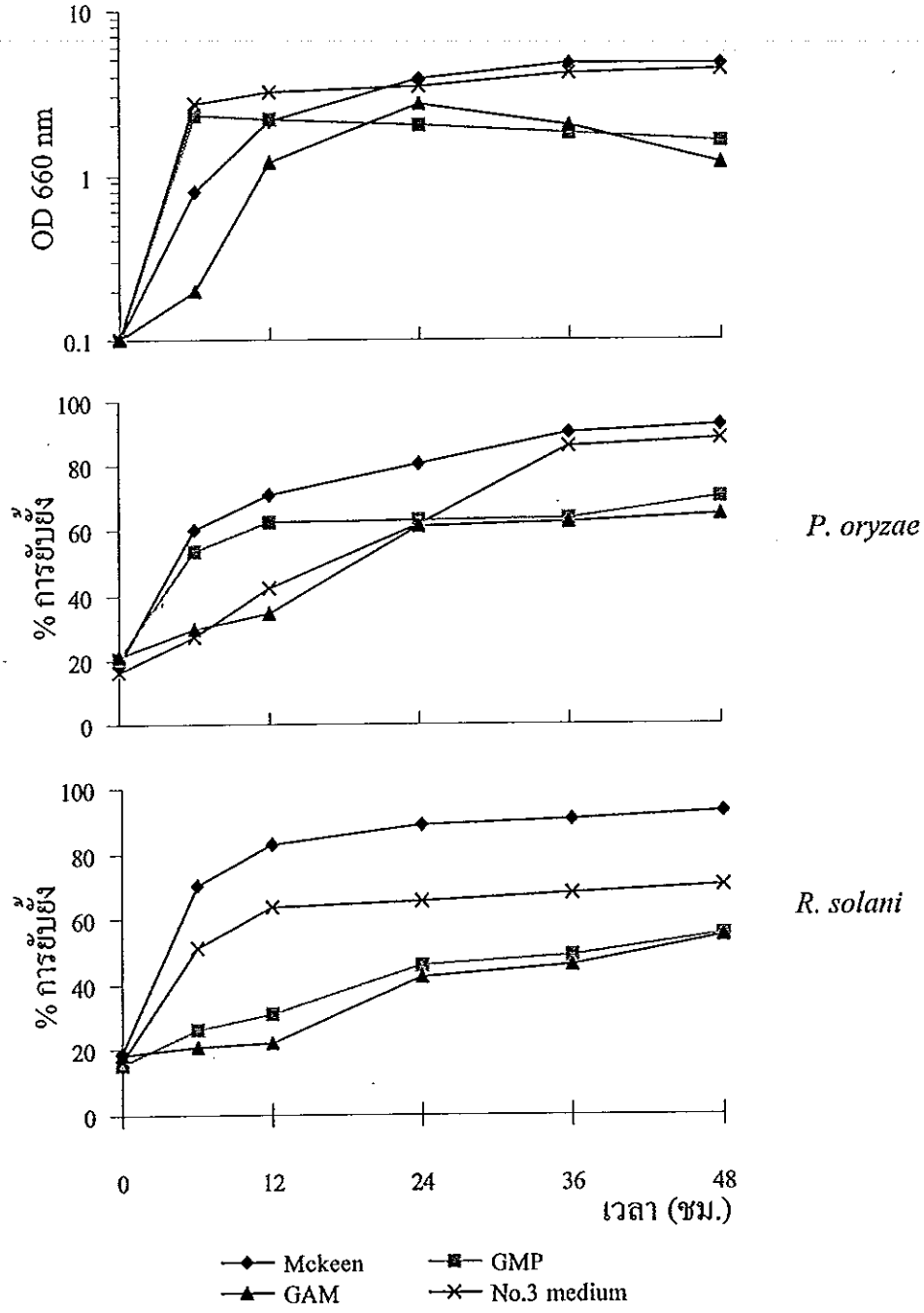
1. การคัดเลือกสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* 2 สายพันธุ์

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหารเหลว 4 สูตร ซึ่งประกอบด้วย GAM, No.3 medium, Mckeen และ GMP ส่วนประกอบของอาหารทั้ง 4 สูตรแสดงดังภาคผนวก ก วัดพีเอช วัดการเจริญของเชื้อโดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้ต่อเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้งในข้าว ตามลำดับผลแสดงดังภาพที่ 4 พบว่าค่าของพีเอชจะลดลงเล็กน้อย (ไม่แสดงผล) เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลวสูตร Mckeen ตามด้วยอาหารเหลวสูตร No. 3 medium, GMP และ GAM ตามลำดับ โดยเชื้อเริ่มเจริญได้ดีในช่วงชั่วโมงที่ 6-12 หลังจากนั้นการเจริญก็จะคงที่และค่อยๆ ลดลง ส่วนผลการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวนั้น พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหารเหลวสูตร Mckeen สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่นๆ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 92.5 และ 92.8 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48หลังจากนั้นการยับยั้งค่อนข้างคงที่หรือลดลงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหารเหลวสูตร Mckeen เป็นอาหารที่ช่วยส่งเสริมหรือชักนำให้ *B.subtilis* NSRS 89-24 มีการผลิตสารปฏิชีวนะมากที่สุด รองลงมาคือ No.3 medium, GMP และ GAM ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mckeen และคณะ (1986) ที่ผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก *B. subtilis* B-3 โดยมีผลยับยั้งเชื้อรา *Monilinia fructicola* (Wint.) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าในผลไม้ที่มีเมล็ดแข็ง (stone fruit) อาหารที่ใช้ในการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา คืออาหารสูตร Mckeen เช่นเดียวกัน จากรายงานของ Rytter และคณะ (1989) กล่าวว่าอาหารจะมีผลต่อกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยได้ผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *B. subtilis* ที่มีผลยับยั้งเชื้อรา *Puccinia pelargonii-zonalis* สาเหตุโรคราสนิมในถั่วและ

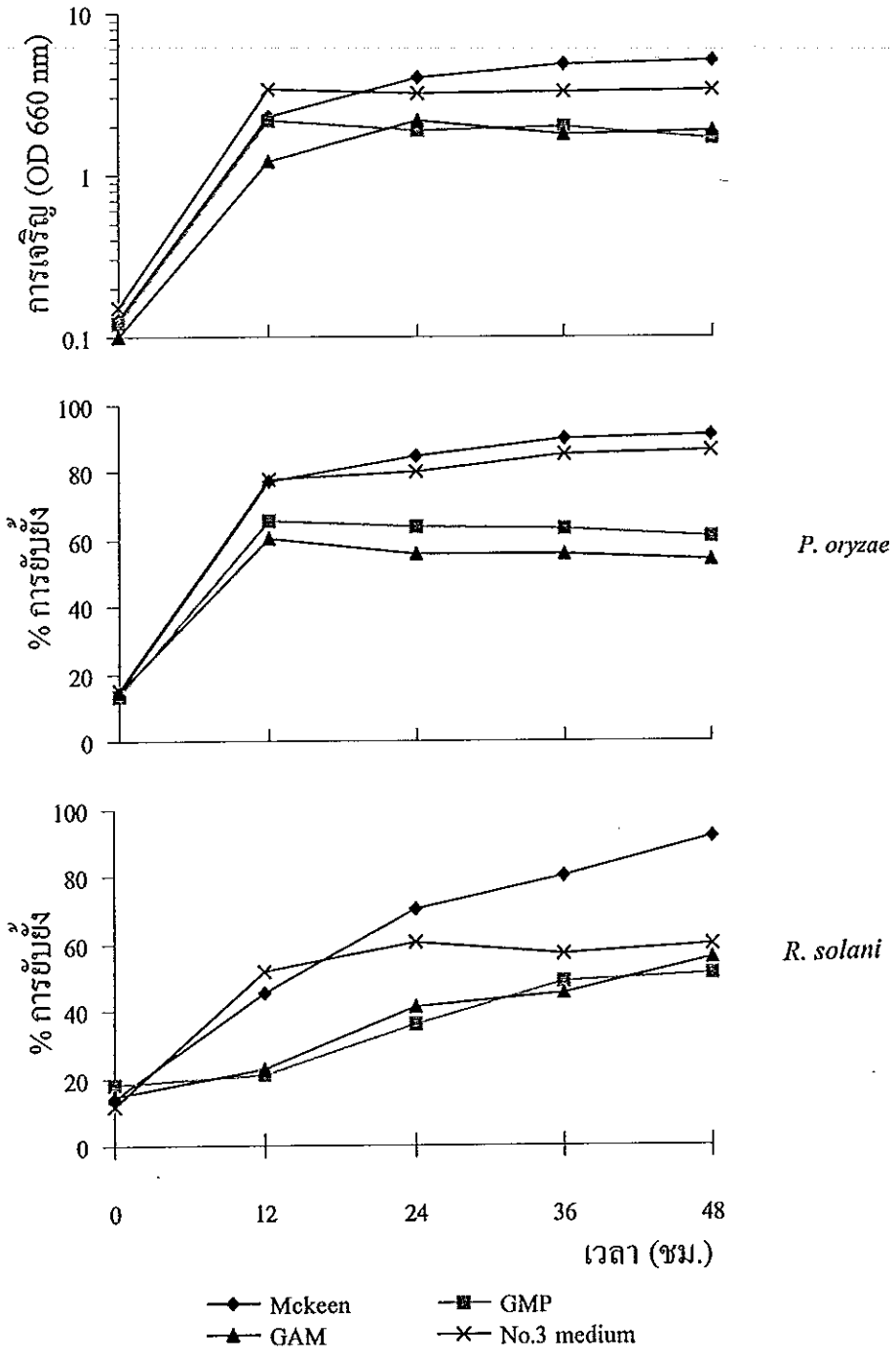
พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในอาหารเหลว Eugon ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Puccinia pelargonii-zonalis* จะมีมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth เช่นเดียวกับ Iwai และ Omura (1982) ที่กล่าวว่าการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวนั้นขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ สุชล แก้วพรหม (2539) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในอาหาร 3 สูตร คือ PDB, CDB และ NB พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เจริญและสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* ได้ดีในอาหารสูตร PDB รองลงมาคืออาหาร CDB และ NB ตามลำดับ ส่วน Ohno และคณะ (1995 a) ศึกษาการผลิต Surfactin โดย *B. subtilis* ในอาหารที่แตกต่างกัน พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิด semisynthetic จะผลิต Surfactin ได้มากที่สุด

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen เชื้อเจริญได้ดีที่สุด โดยเริ่มมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 6-12 หลังจากนั้นการเจริญมีแนวโน้มคงที่และค่อย ๆ ลดลง แต่การสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทั้ง 2 ชนิดนั้น เชื้อสร้างได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Brana และคณะ (1985) พบว่าการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดนั้นการผลิตจะเริ่มขึ้นหลังจากที่เชื้อเจริญได้สูงสุดแล้ว เช่นเดียวกับการทดลองของ Ohno และคณะ (1995 a) ที่ศึกษาการผลิต Surfactin จาก *B. subtilis* MI 113 โดยเลี้ยงแบบอาหารแข็ง ใช้ Okara (soybean curd residues) เป็นสับสเตรท พบว่าเชื้อมีการผลิต Surfactin ในช่วงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นช่วง late stationary phase โดยเชื้อเจริญได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ส่วนการผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* NB22 โดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทพบว่าเชื้อผลิต Iturin A ได้ดีในชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน (Ohno *et al.*, 1992), Pusey และคณะ (1988), Pusey (1989) ศึกษาการผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* B-3 โดยเลี้ยงในอาหาร nutrient-yeast-dextrose broth (NYDB) สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้นี้มีผลยับยั้งเชื้อรา *M. fructicola, Botrytis cinerea* และ *Glomerella cingulata* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าในแอบเปิลและโรคราสีเทาในองุ่น พบว่าเชื้อสร้างสารยับยั้งได้มากที่สุดในชั่วโมงที่ 60 แต่ในทางตรงกันข้าม Haavik (1973) ก็กล่าวว่าการที่มีการผลิตสารปฏิชีวนะพวกเปปไทด์ในช่วงหลังจากที่มีการเจริญแล้วนั้นไม่เป็นความจริงเสมอไป ถ้าอาหารนั้นมีสภาวะที่เหมาะสม เชื้อก็สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในช่วงที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วได้

สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารเหลวทั้ง 4 สูตรก็ให้ผลเช่นเดียว



ภาพที่ 4 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 5 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ของ *Bacillus* sp. LN 007

กับ *B. subtilis* NSRS 89-24 ผลแสดงดังภาพที่ 5 โดยพบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Mckeen สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 91.5 และ 92 ตามลำดับ ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen อยู่ที่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง และการทดลองต่อไปจะใช้อาหารเหลวสูตร Mckeen เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวบนเครื่องเขย่า

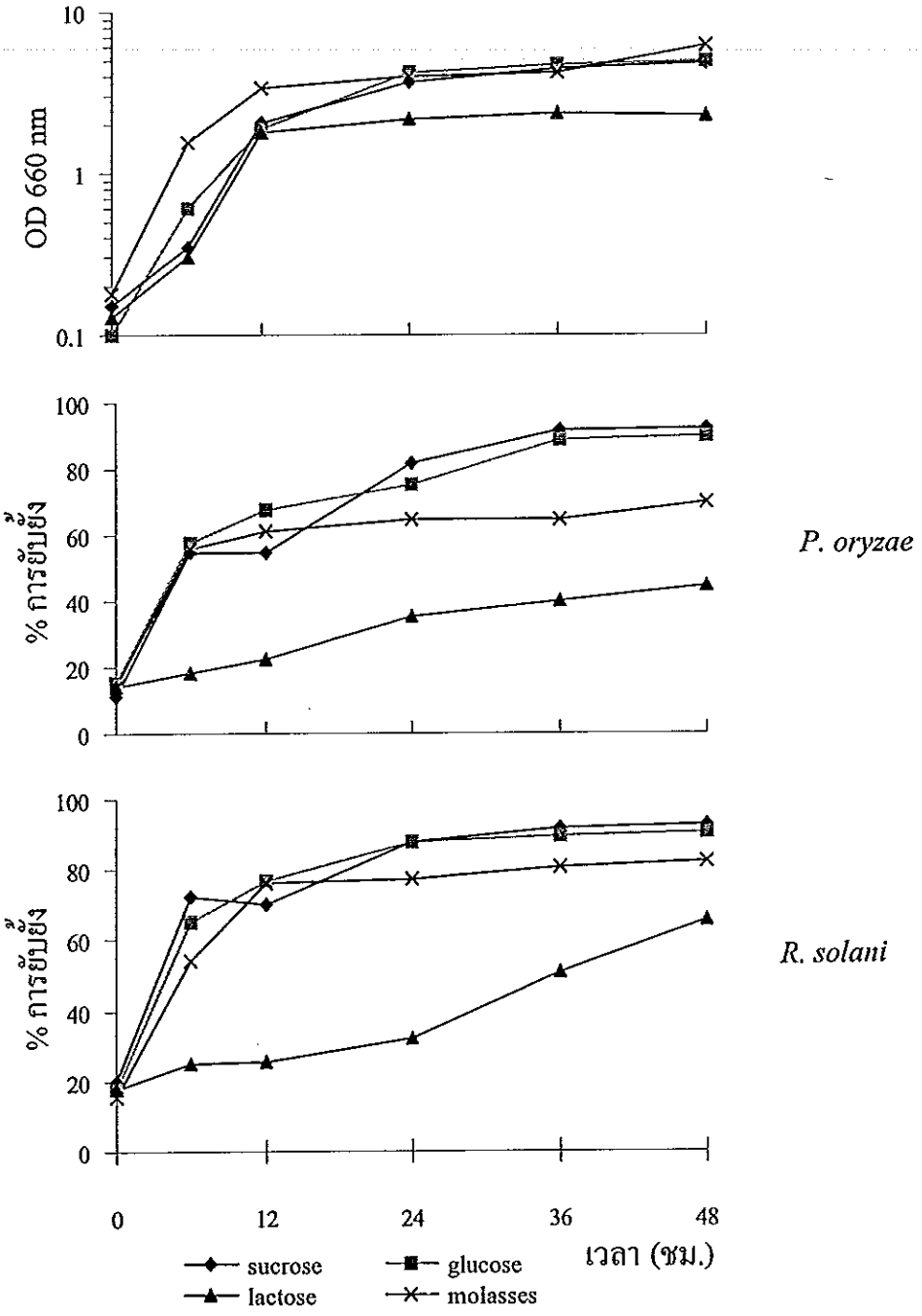
จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรต่างๆพบว่าอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 คือ อาหารเหลวสูตร Mckeen จึงศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

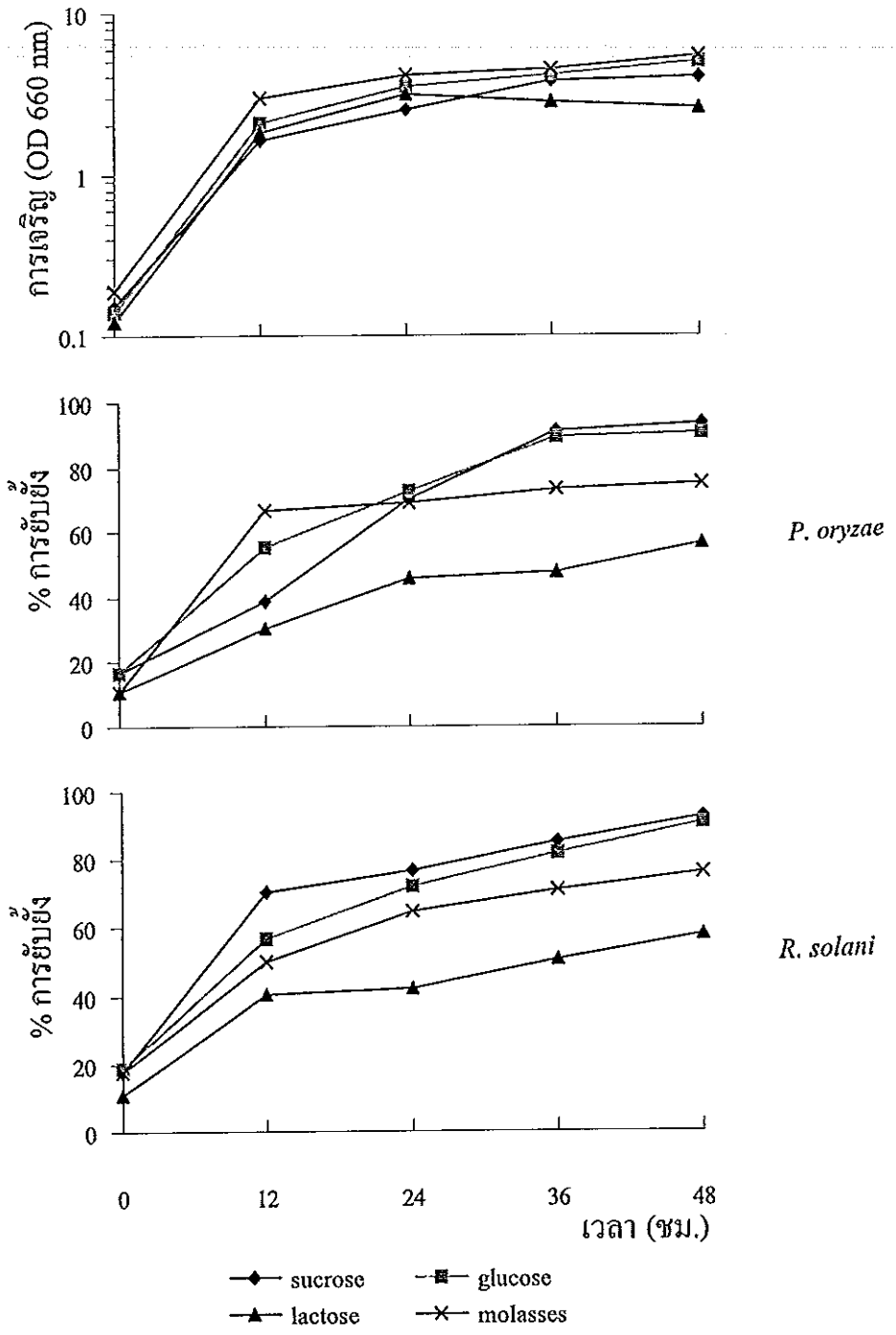
ในการศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen ที่เปลี่ยนแปลงชนิดของน้ำตาลจากกลูโคสเป็นซูโครส แลคโตส และโมลาส ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 6) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 7) จะเจริญได้ดีในอาหารสูตร McKeen ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซูโครส และโมลาส และเจริญในแลคโตสได้ต่ำสุด ส่วนพีเอชก็มีการลดลงเล็กน้อย (ไม่แสดงผล)

สารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เมื่อเจริญในอาหารสูตร Mckeen ที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุด และให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 5,6,7 และ 8) เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น โดยสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 อายุ 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 92.6 และ 93 ตามลำดับ และจาก *Bacillus* sp. LN 007 ก็สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 93.2 และ 92.4 ตามลำดับ

สมใจ เอี่ยมพรรัตน์ (2531) พบว่าในการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* KUBA 8601.2 และ *Bacillus* 8612 นั้นสามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด หรือซูโครส



ภาพที่ 6 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

เป็นแหล่งคาร์บอนได้

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วจึงทำการศึกษาถึงปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดย *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 8) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 9) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 5.0 เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและสามารถผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้สูงกว่าซูโครสร้อยละ 2.0, 1.0 และ 0.5 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 9,10,11 และ 12) โดยสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ร้อยละ 95.4 และ 96.5 ตามลำดับ ส่วนสารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 97.3 และ 96.1 ตามลำดับ

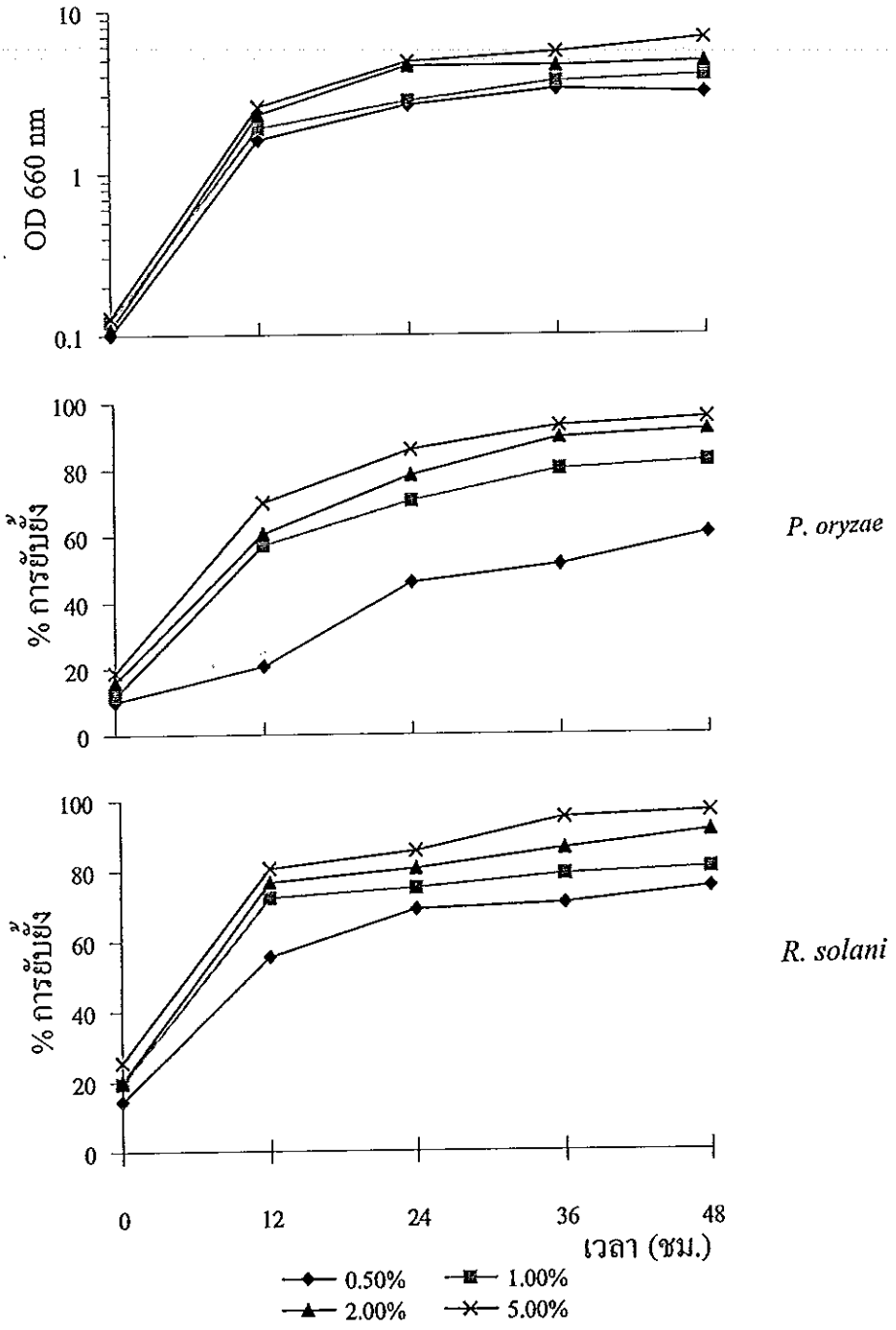
จากการทดลองสรุปว่า ในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen นั้นจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5.0 เพราะว่าสารที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ดีที่สุด ซึ่งจะเห็นว่าระดับความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้นั้นค่อนข้างสูง

2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

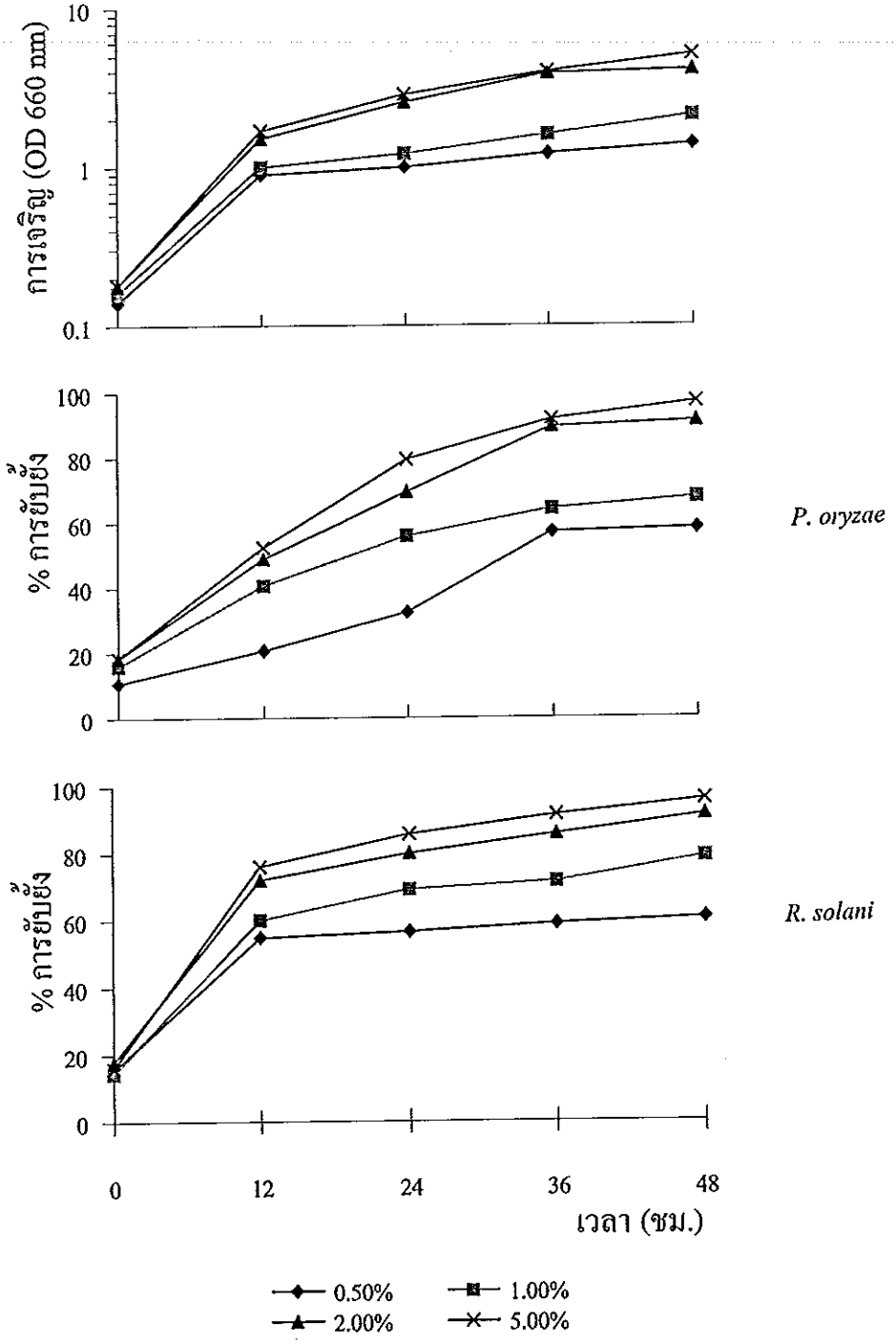
การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ผลแสดงดังภาพที่ 10 และ 11 ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและสามารถสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีกว่าการใช้ glutamic acid, urea, $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$)(ตารางภาคผนวกที่ 13,14,15 และ 16) โดยสารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 94 และ 96 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. LN 007 ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 93.4 และ 92.0 ตามลำดับ

ดังนั้นจึงเลือกใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

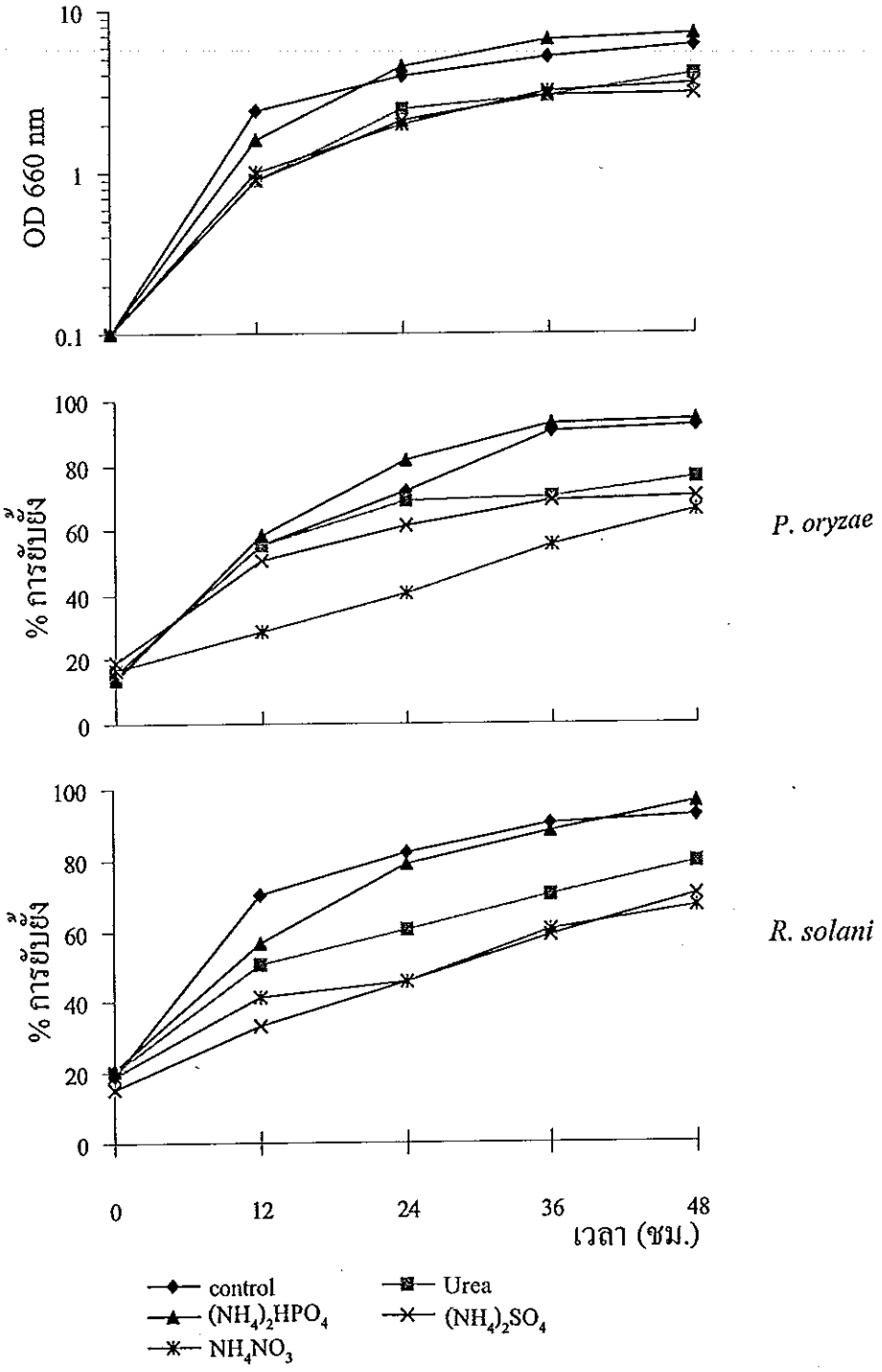
Sandrin และคณะ (1990) รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบนั้น ไนโตรเจนต้องอยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้ง่ายในกระบวนการเมตาโบลิซึม การ



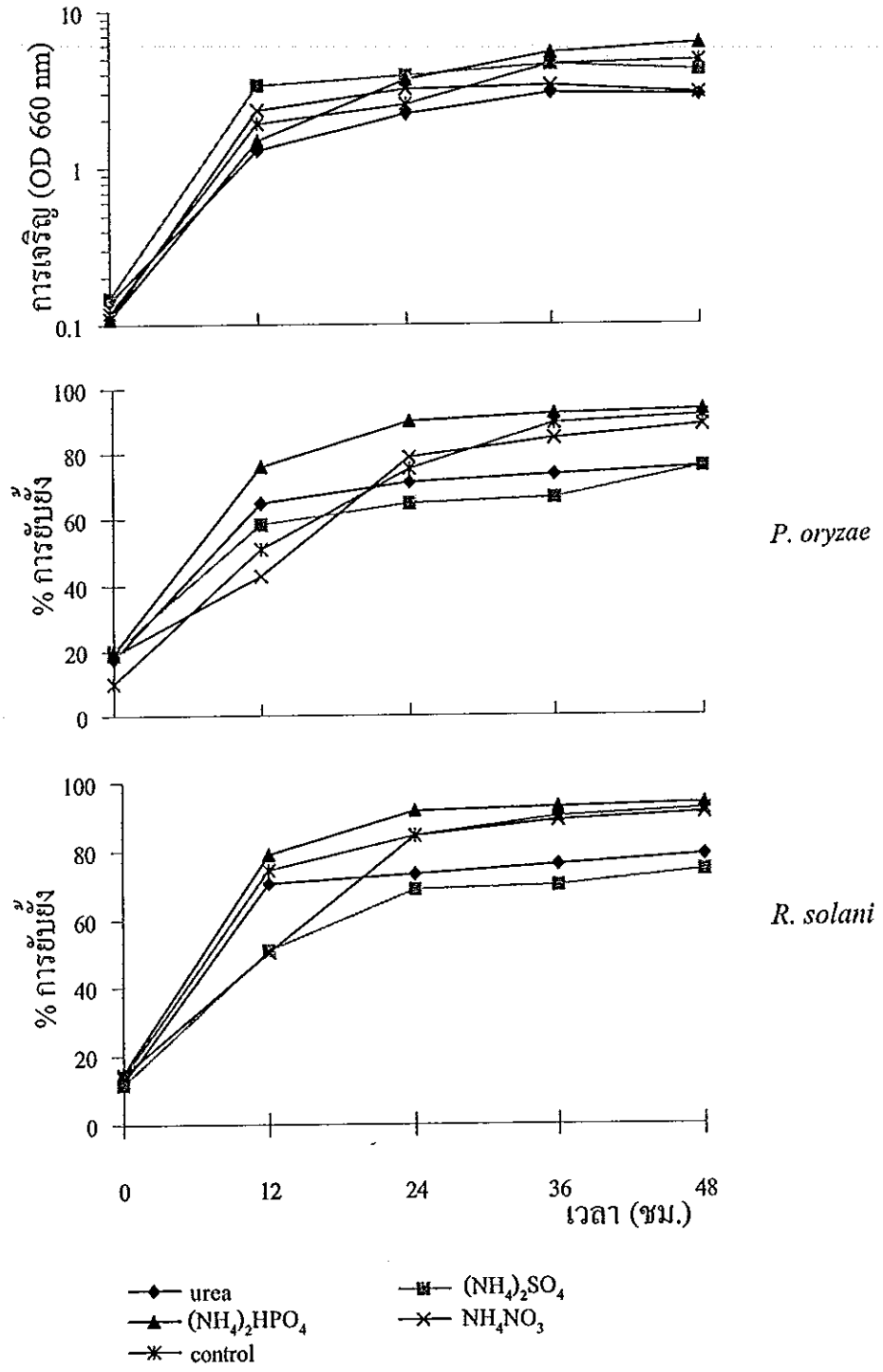
ภาพที่ 8 ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 9 ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 10 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

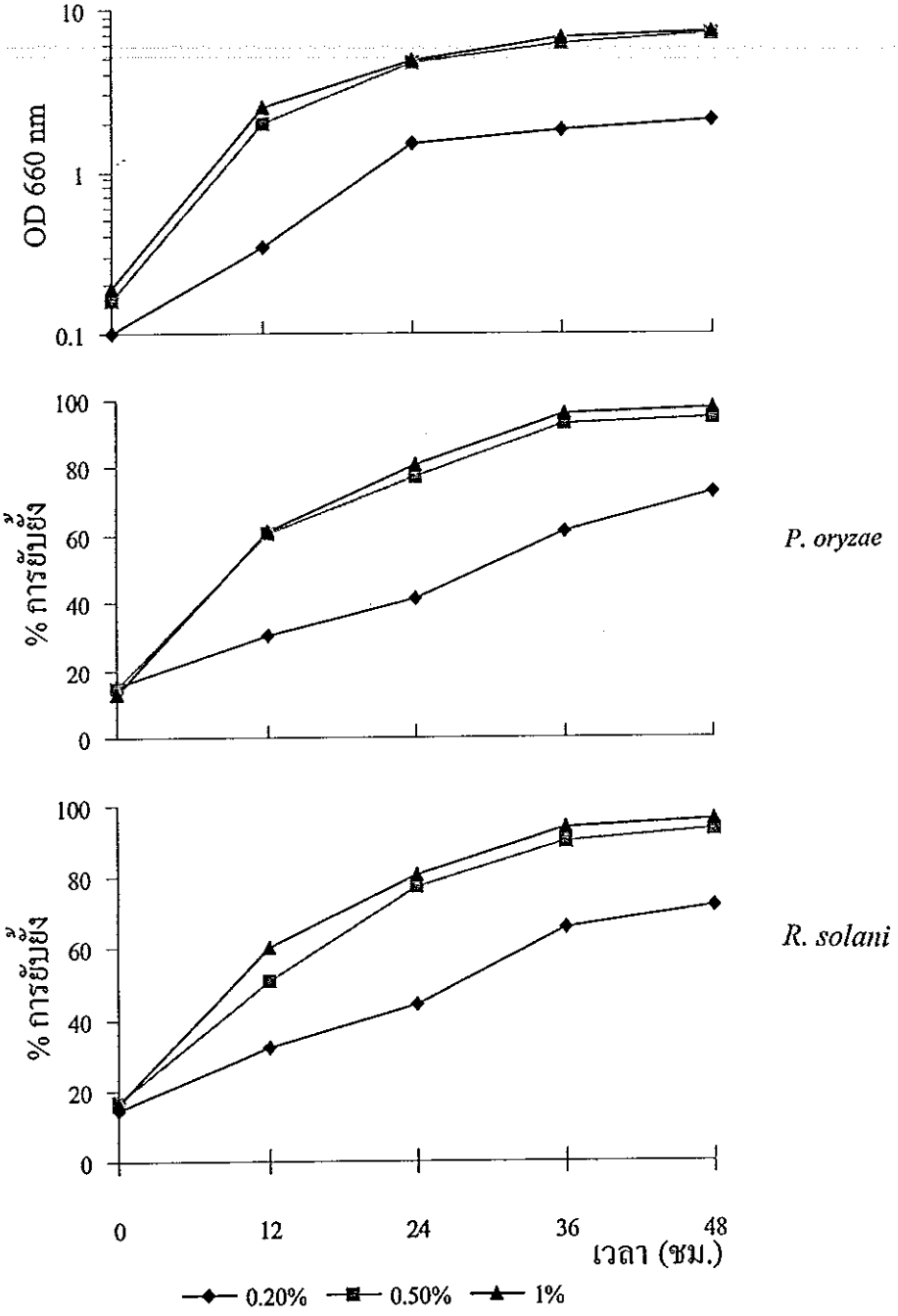
ทดลองนี้ พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารปฏิชีวนะได้มากในอาหารเหลวสูตร Mckeen ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น $(NH_4)_2HPO_4$ แต่จากการทดลองของ Sumino และคณะ (1993) ผลิต purine nucleoside จาก *B. subtilis* AB-471 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตก็คือ $(NH_4)SO_4$ และ urea ส่วน Aharonowitz และ Demain (1979) พบว่าเมื่อใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน หรือร่วมกับ asparagine จะมีผลไปลดการสร้างสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *B. subtilis*

นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนจะมีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวแล้วปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมก็มีความสำคัญเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบถึงปริมาณของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 12) และจาก *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 13) จากผลดังกล่าว พบว่า $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ให้การเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ได้ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 0.2 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 17,18,19 และ 20) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 97.6 และ 95.9 ตามลำดับ ส่วนสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุดร้อย 96.1 และ 97.1 ตามลำดับ ดังนั้นจึงใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับร้อยละ 1.0 ในการทดลองขั้นต่อไป

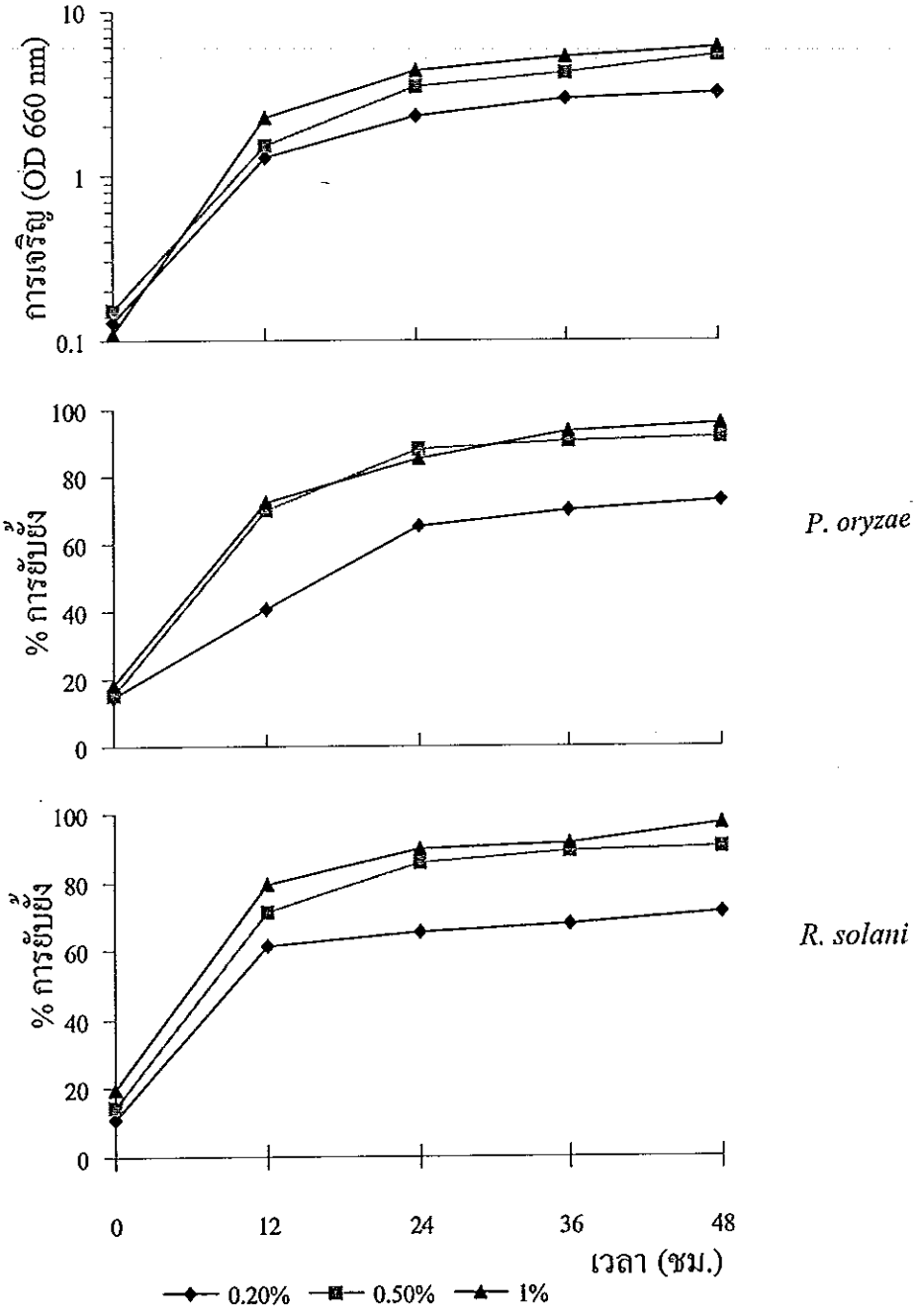
Rytter และคณะ (1989) กล่าวว่าอาหารจะมีผลต่อกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น Pusey และ Wilson (1984) พบว่า Yeast extract ที่ผสมกับอาหาร NB จะเป็นการส่งเสริมให้ *B. subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร NB อย่างเดียว และจะไม่ค่อยพบการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ส่วน Ferreira และคณะ (1991) ได้ผสม Yeast extract ลงในอาหาร CDB เพื่อที่จะช่วยให้เชื้อมีการผลิตสารได้ดีขึ้น ดังนั้นธาตุอาหารไนโตรเจนจึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะ

2.3 ผลของการเติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace elements)

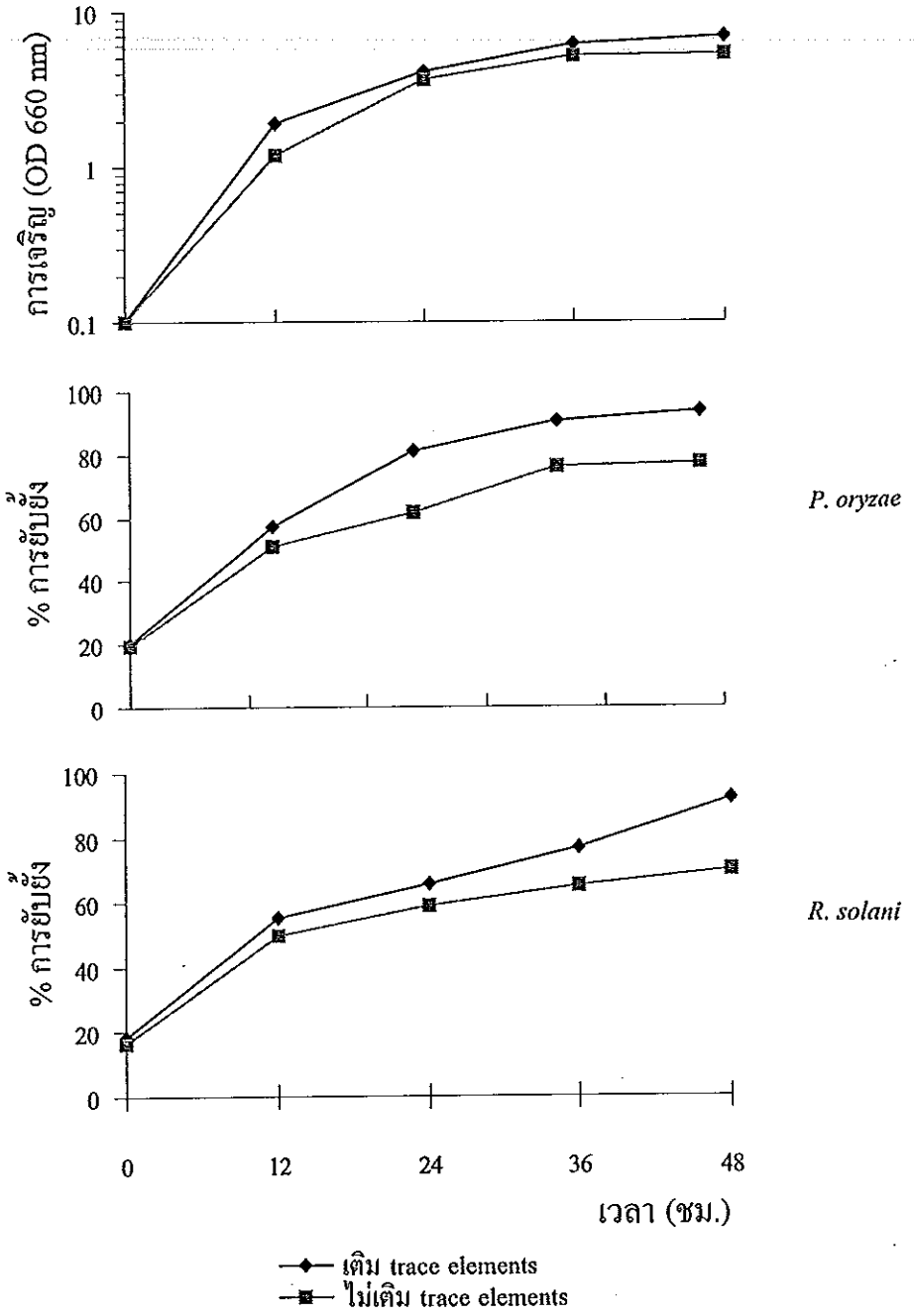
การเปรียบเทียบผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย ในอาหารสูตร Mckeen ซึ่งประกอบด้วย $MnSO_4.4H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$ และ $FeSO_4.7H_2O$ กับอาหารสูตร Mckeen ที่



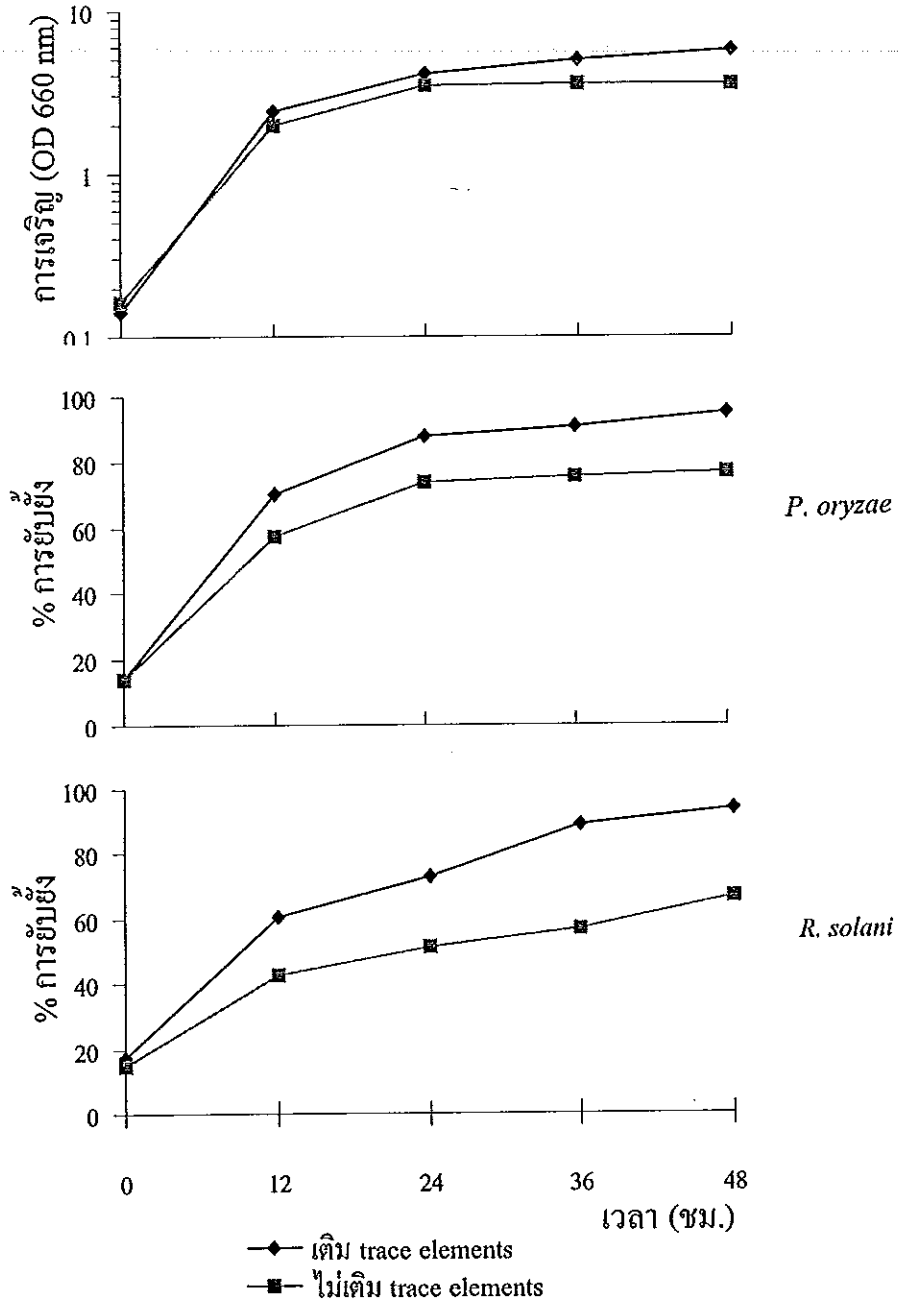
ภาพที่ 12 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 13 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 14 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 15 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

ไม่เติมโลหะเหล่านี้ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 14) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 15) พบว่าการเลี้ยงเชื้อในในอาหารสูตร Mckeen ที่ประกอบด้วยโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เจริญและสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร Mckeen ที่ไม่มีโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยเป็นองค์ประกอบ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 21,22,23 และ 24)

ในอาหารสูตร Mckeen ที่ประกอบด้วยโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เจริญได้ดีและสร้างสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดโดย *B.subtilis* NSRS 89-2 สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 93.5 และ 92.3 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 95.1 และ 94.0 ตามลำดับ สำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร Mckeen ที่ไม่มีโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยเป็นองค์ประกอบนั้น พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 77.1 และ 70.1 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. LN 007 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุดร้อยละ 77.0 และ 66.9 ตามลำดับเช่นกัน

สายสนม เอนกผลิน (2535) ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีท โดยเลี้ยงในอาหาร GMP broth พบว่า $MgSO_4.7H_2O$ ซึ่งเป็นโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยสีท ในทำนองเดียวกัน Bernheimer และ Avigad (1970) ศึกษาการผลิต Subtilysin ซึ่งเป็นสารพวก Surfactin จาก *B. subtilis* พบว่า Mg^{2+} ซึ่งเป็นโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย จะมีผลไปเพิ่มอัตราการออกฤทธิ์ของ Subtilysin และมีรายงานของ Brana และคณะ (1985) กล่าวไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส และโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย จะมีผลอย่างมากต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

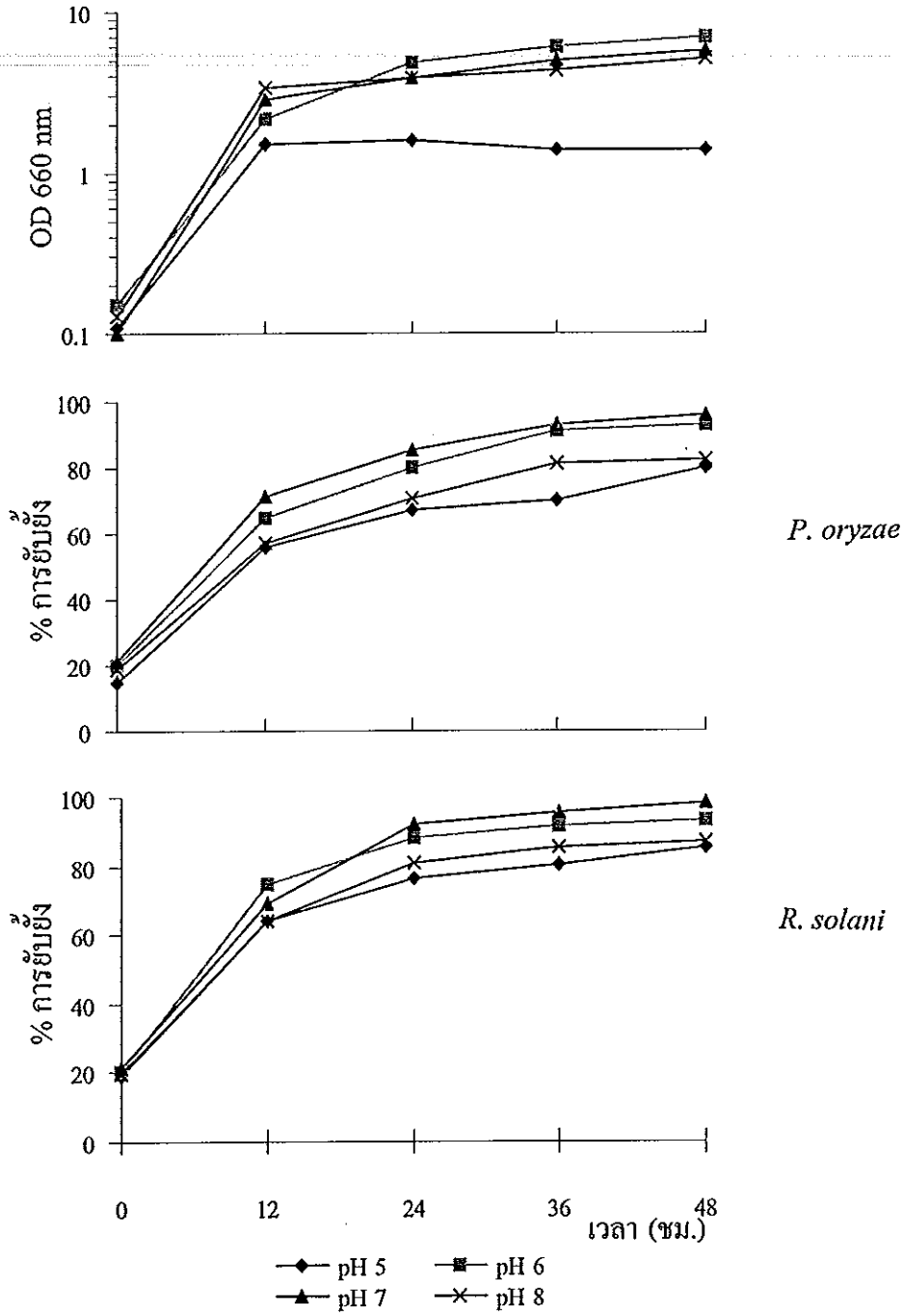
สุชาดา ดูชัยสิทธิ์ (2535) เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* B31 ในอาหารเหลวที่ขาดแร่ธาตุ $MgSO_4.7H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, K_2SO_4 และ NaCl ผลปรากฏว่าถ้าขาดเกลือซัลเฟตของแมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และโปแตสเซียม มีผลให้ไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะหรือผลิตได้ในปริมาณที่น้อย หรือทำให้ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

เปลี่ยนแปลงไปโดยทำให้มีการผลิตสารปฏิชีวนะได้น้อยกว่าชุดควบคุมที่มีแร่ธาตุต่างๆ ครบถ้วนและเมื่อเติมแร่ธาตุบางชนิดเช่น $MnSO_4.4H_2O$, $CaCl_2$ และ KCl โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.001 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการผลิต Bacitracin แล้วทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* B31 ผลปรากฏว่า *B. subtilis* B31 ยังคงมีการผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การเพิ่ม $CaCl_2$ มีผลทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะดีขึ้น และยังช่วยในการรักษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเหลว โดยปกติการรักษาการเปลี่ยนแปลงจะใช้ $CaCO_3$ ในการรักษาค่าพีเอชของการผลิตสารปฏิชีวนะ แต่เนื่องจาก $CaCO_3$ เป็นสารที่ไม่ละลายและทำให้อาหารขุ่น ส่วนการใช้แคลเซียมในรูป $CaCl_2$ จะละลายน้ำได้ดีกว่า

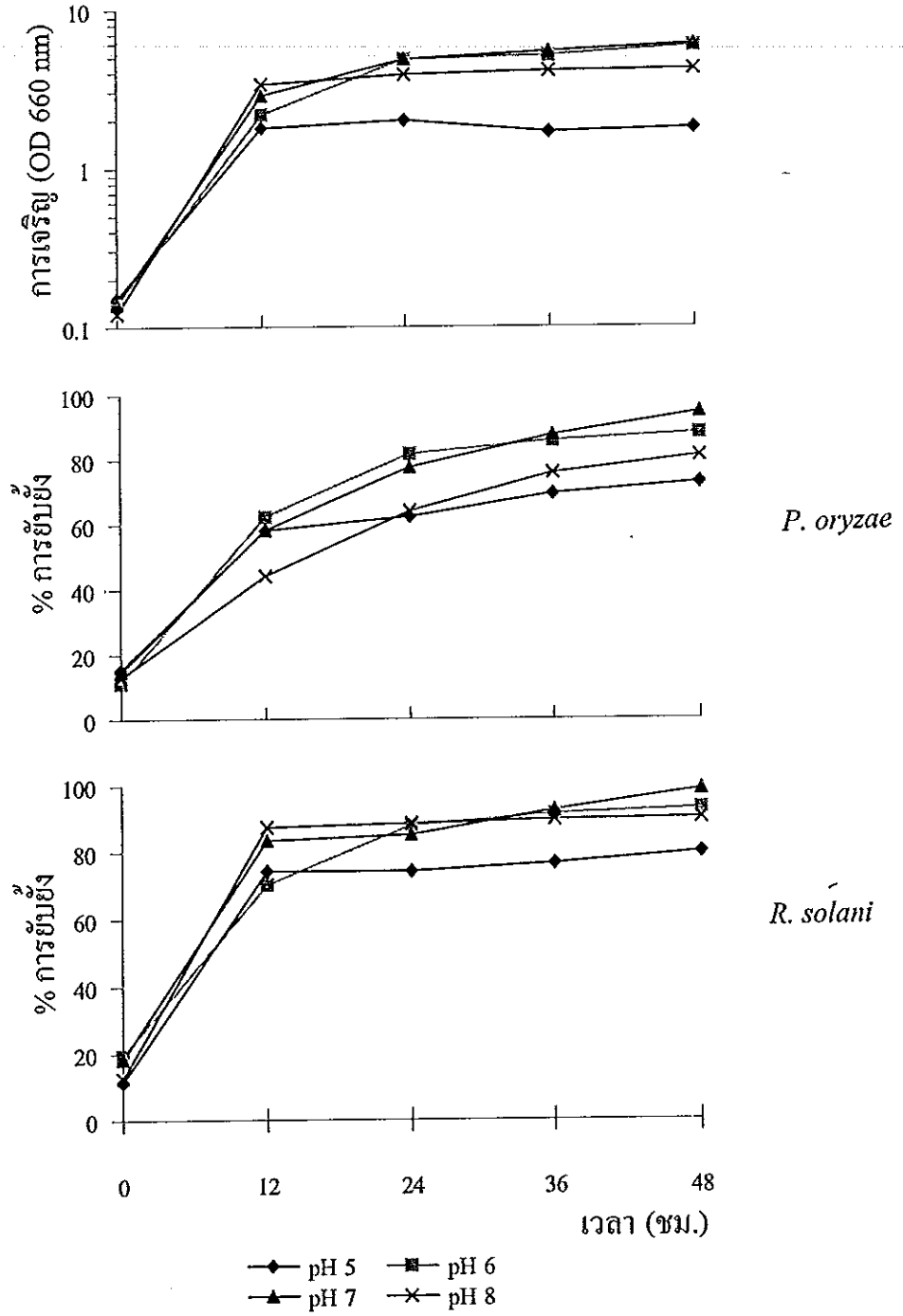
สมใจ ศิริโชค (2537) กล่าวว่าโดยทั่วไปมักจะพบโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยเจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด และฟาร์มามีเดีย (ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองได้จากเอมบริโอของเมล็ดฝ้ายที่บดละเอียด) ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ที่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารโดยตรง แร่ธาตุต่างๆที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ตามปกตินิยมใช้ในรูปสารอนินทรีย์

2.4 ผลของพีเอชเริ่มต้น

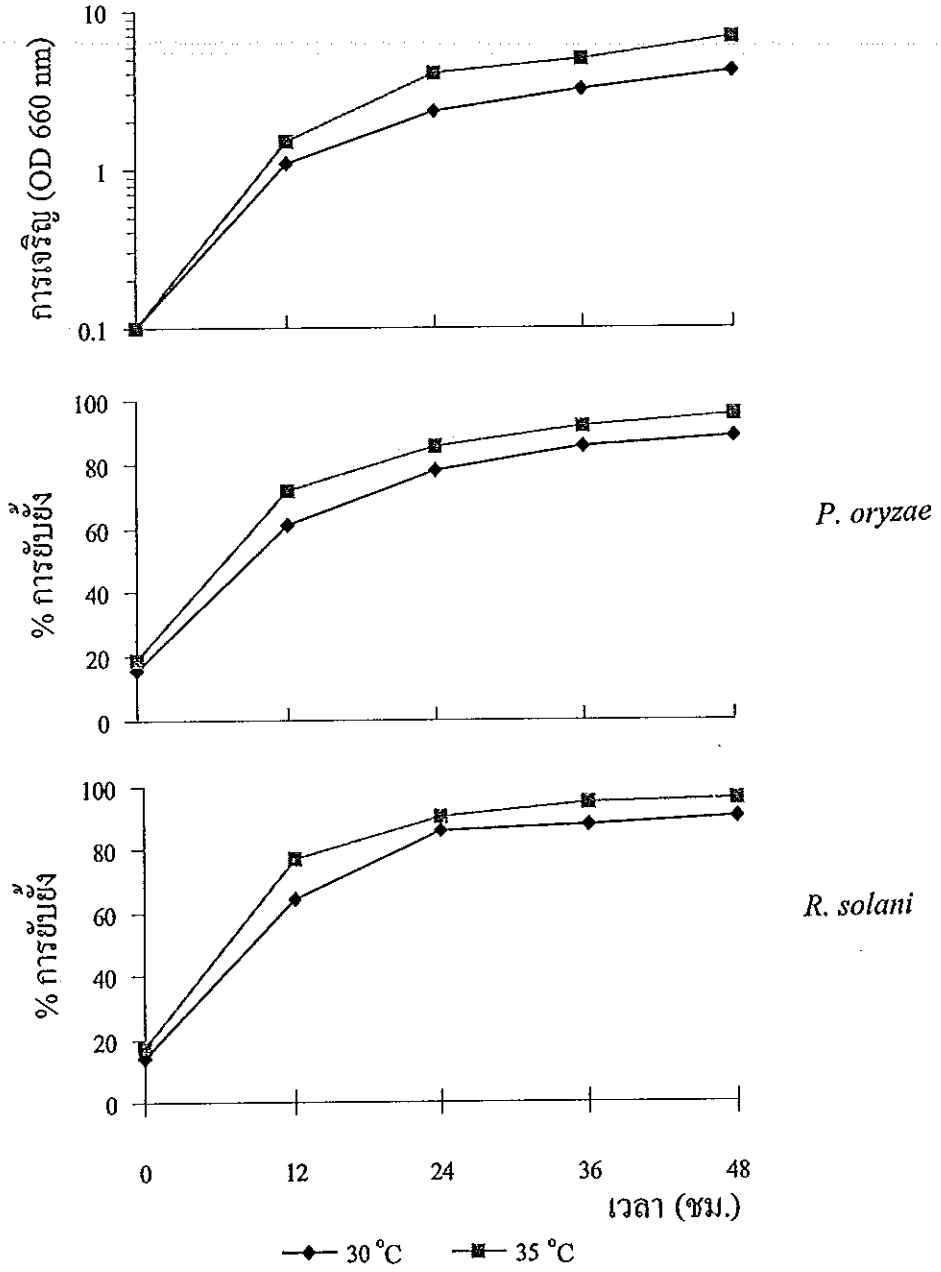
นอกจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนสำคัญต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำกาศึกษาถึงพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีพีเอชต่างๆกัน ซึ่งผลที่ได้ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 16) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 17) เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Mckeen ที่มีพีเอชเริ่มต้นในช่วง 6.0-7.0 แต่ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชอื่น โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 25,26,27 และ 28) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดย *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 95.6 และ 98.5 ตามลำดับ และ *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 95.0 และ 98.7 ตามลำดับ เช่นเดียว



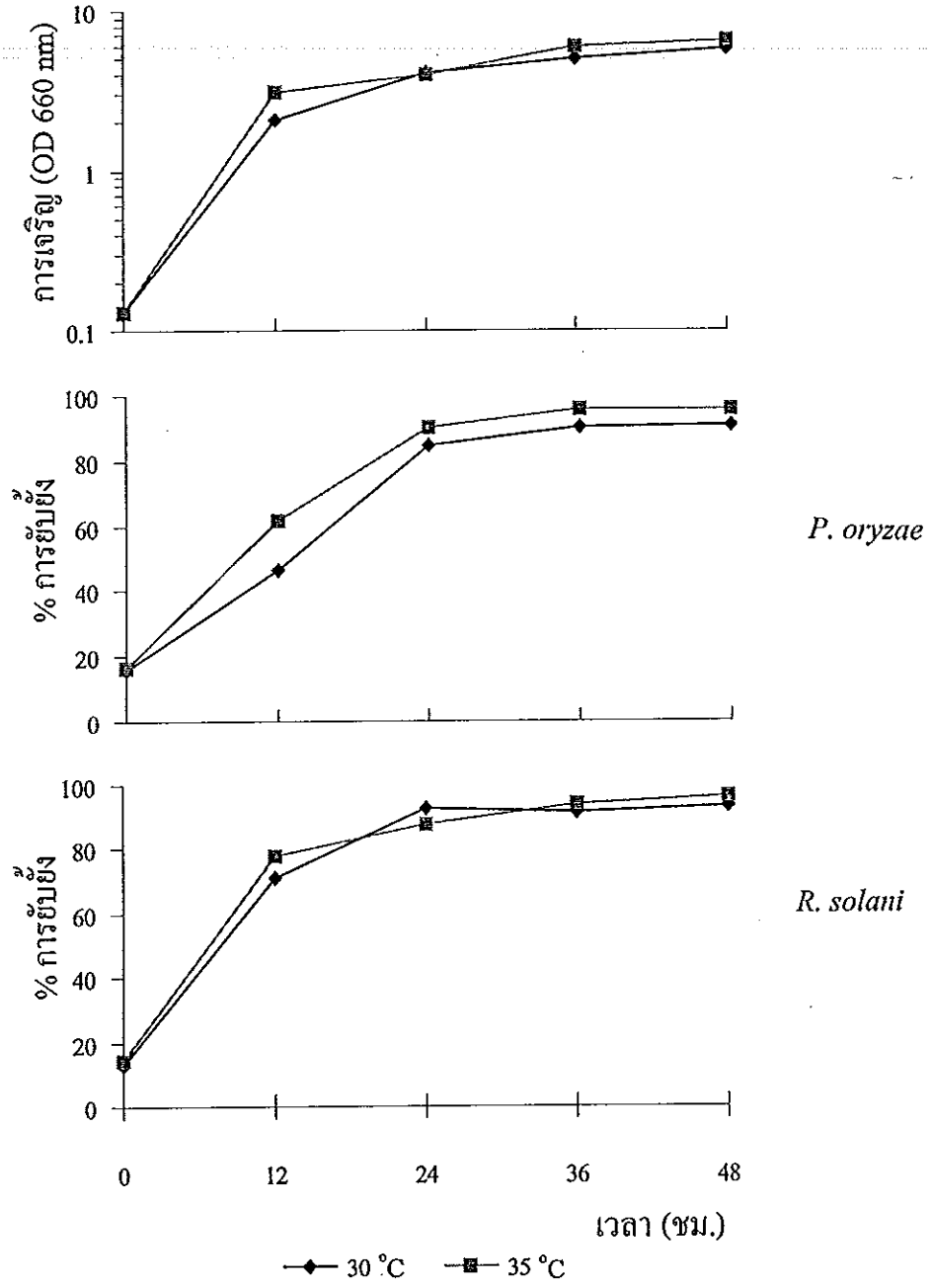
ภาพที่ 16 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 17 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

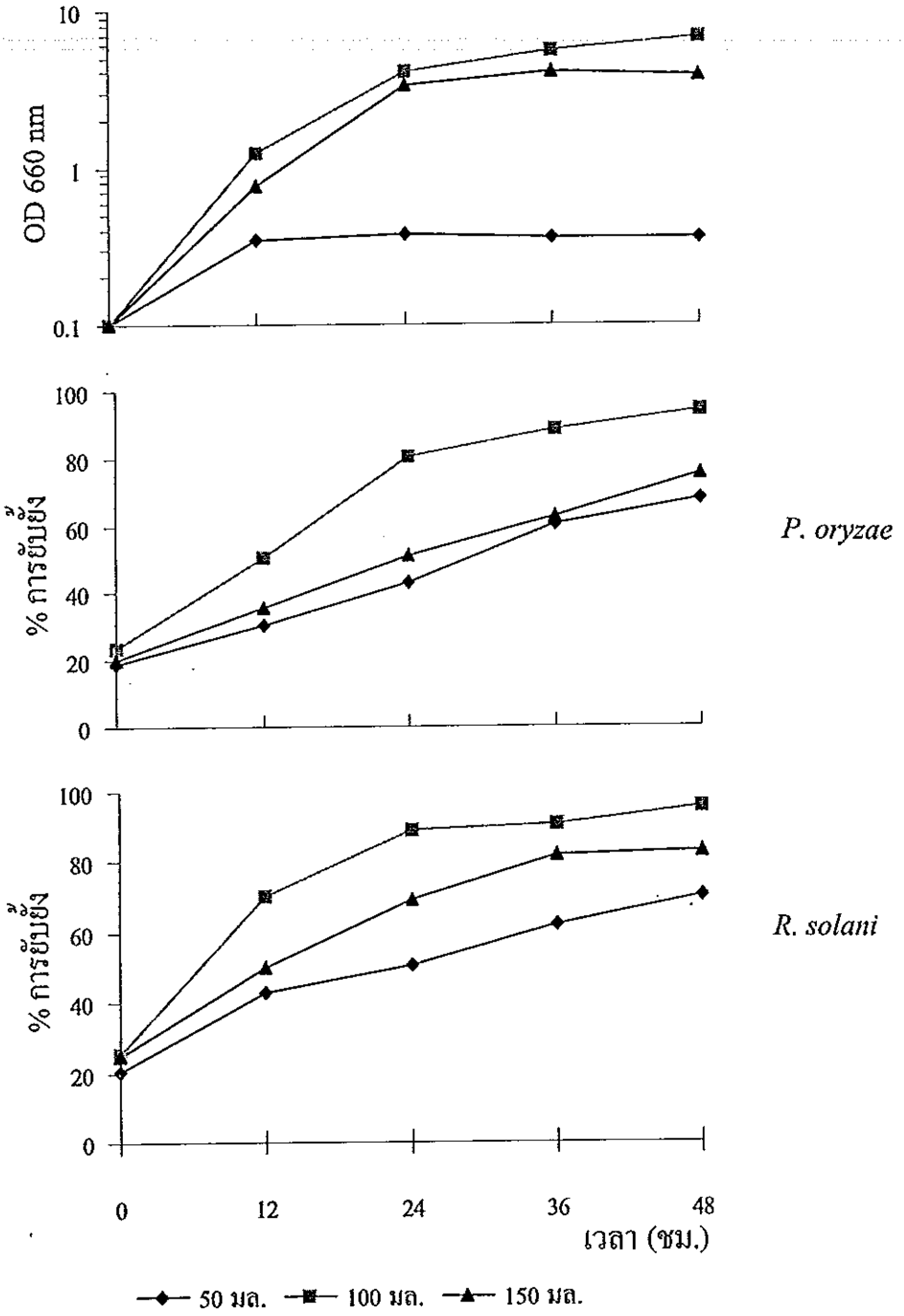
กับการศึกษาของ Leifert และคณะ (1995) ที่ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* CL27 และ *B. pumilus* CL45 เพื่อต่อต้านเชื้อ *Botrytis cinerea* พบว่าการผลิตสารปฏิชีวนะจะขึ้นอยู่กับสับสเตรทที่ใช้ส่วนการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะก็จะขึ้นอยู่กับพีเอชและความเข้มข้นของสารอาหาร มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวว่าพีเอชจะมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ (Sumino *et al.*,1993; Bernheimer and Avigad, 1970; Sen and Swaminathan, 1997; Haavik, 1974 a,b)

2.5 ผลของอุณหภูมิ

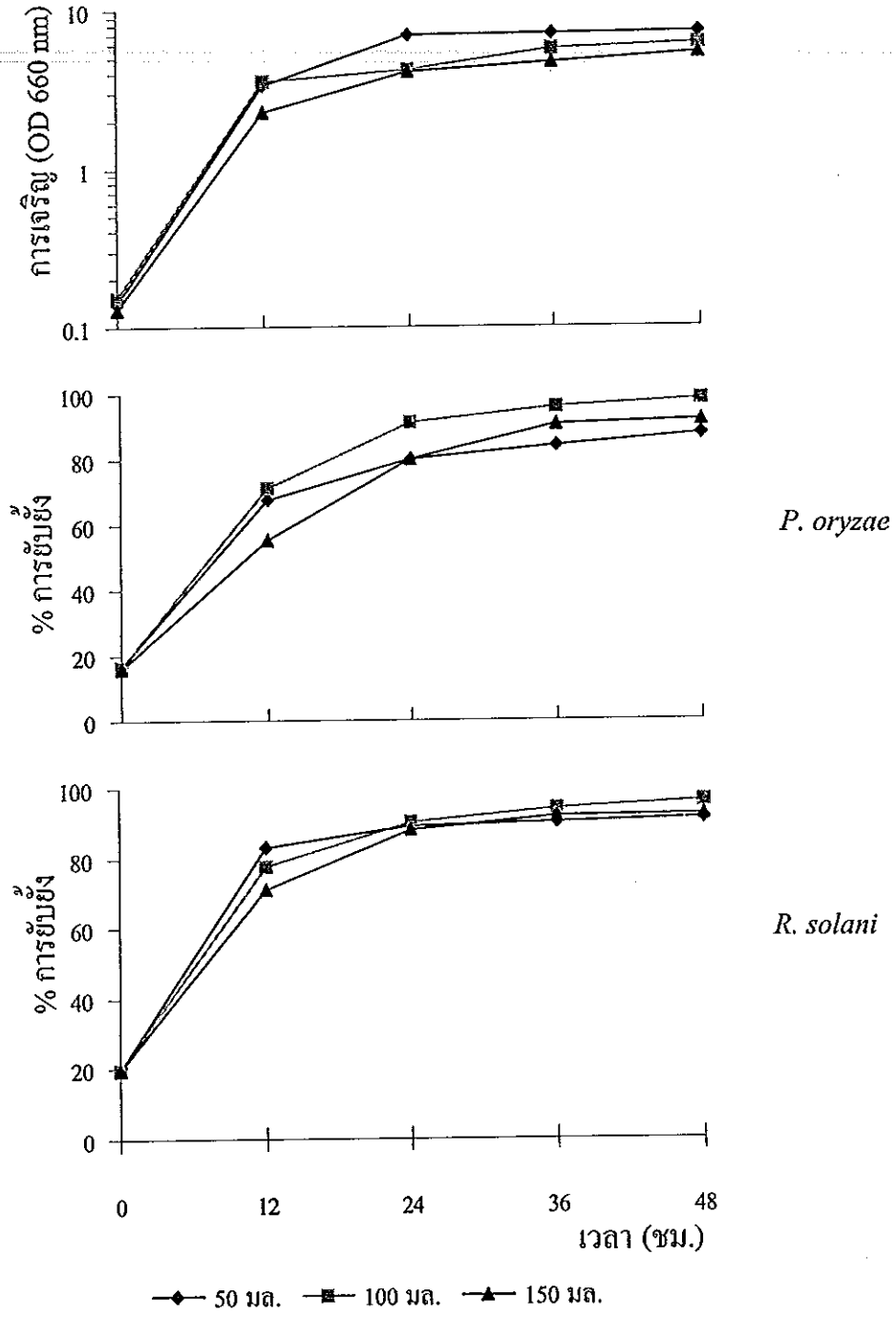
ผลของอุณหภูมิต่อการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 18) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 19) เพื่อผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 29,30,31 และ 32) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 95.6 และ 96.3 ตามลำดับ และ *Bacillus* sp. LN 007 ยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 95.0 และ 96.5 ตามลำดับ Ohno และคณะ (1995 b) พบว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อการผลิตสาร Iturin A และ Surfactin จากเชื้อ *B. subtilis* RB 14 โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต Iturin A เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต Surfactin คือ 37 องศาเซลเซียส Makkar และ Cameotro (1997) ศึกษาการผลิตสาร biosurfactants จากเชื้อ *B. subtilis* MTCC 2423 และ MTCC 1427 โดยใช้โมลาสเป็นสับสเตรทของเชื้อ พบว่าเชื้อเจริญและผลิตสารได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

2.6 ผลของการให้อากาศ

ผลจากการศึกษาถึงการให้อากาศในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 20) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 21) เพื่อผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยการเปลี่ยนปริมาตรของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ แต่ไม่เปลี่ยนขนาดของฟลาสก์ และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ 50 100 และ 150 มิลลิลิตร ต่อฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าปริมาตรของอาหารที่แตกต่างกันในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว กล่าวคือเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ เจริญและสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในฟลาสก์ขนาด 250



ภาพที่ 20 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

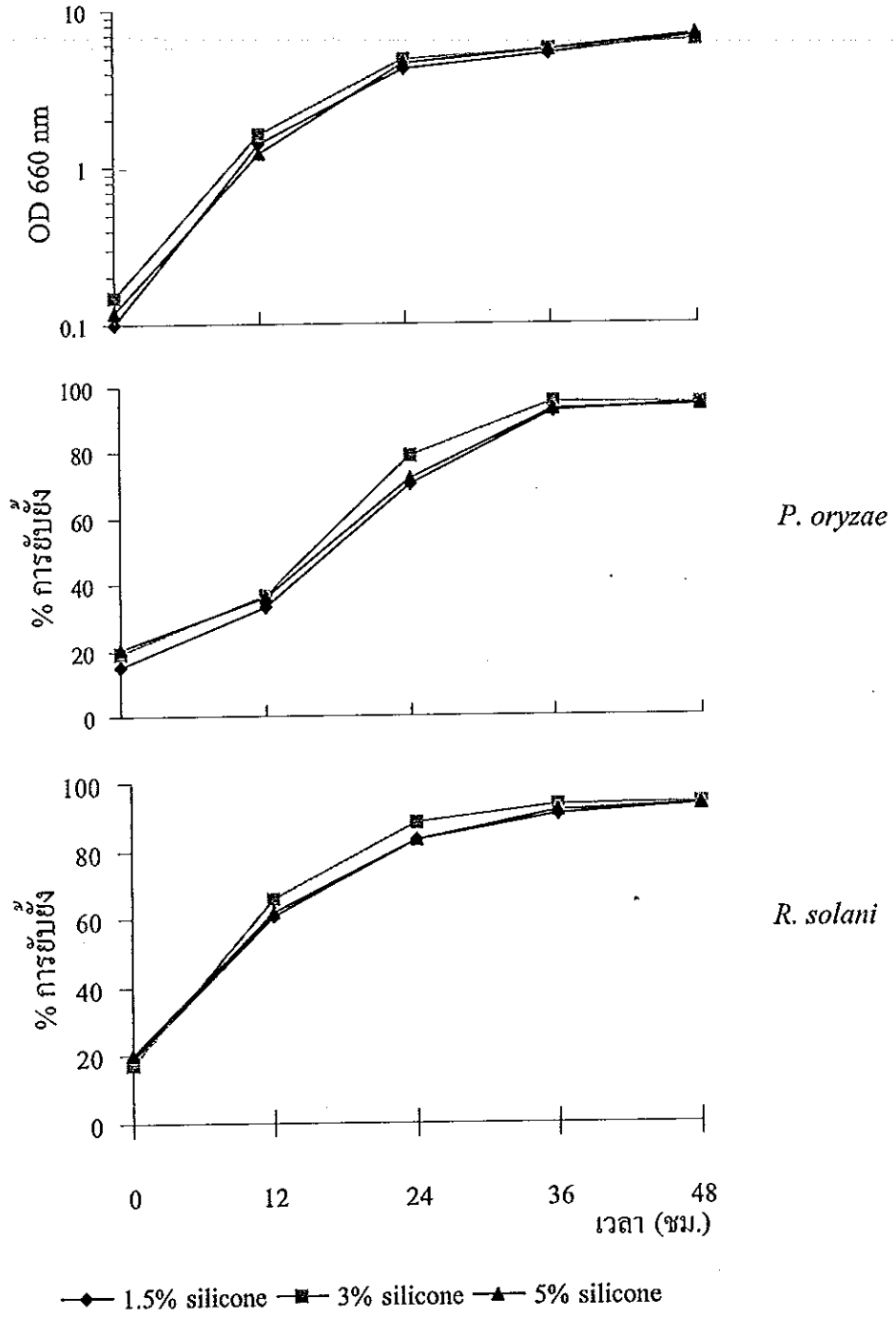


ภาพที่ 21 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

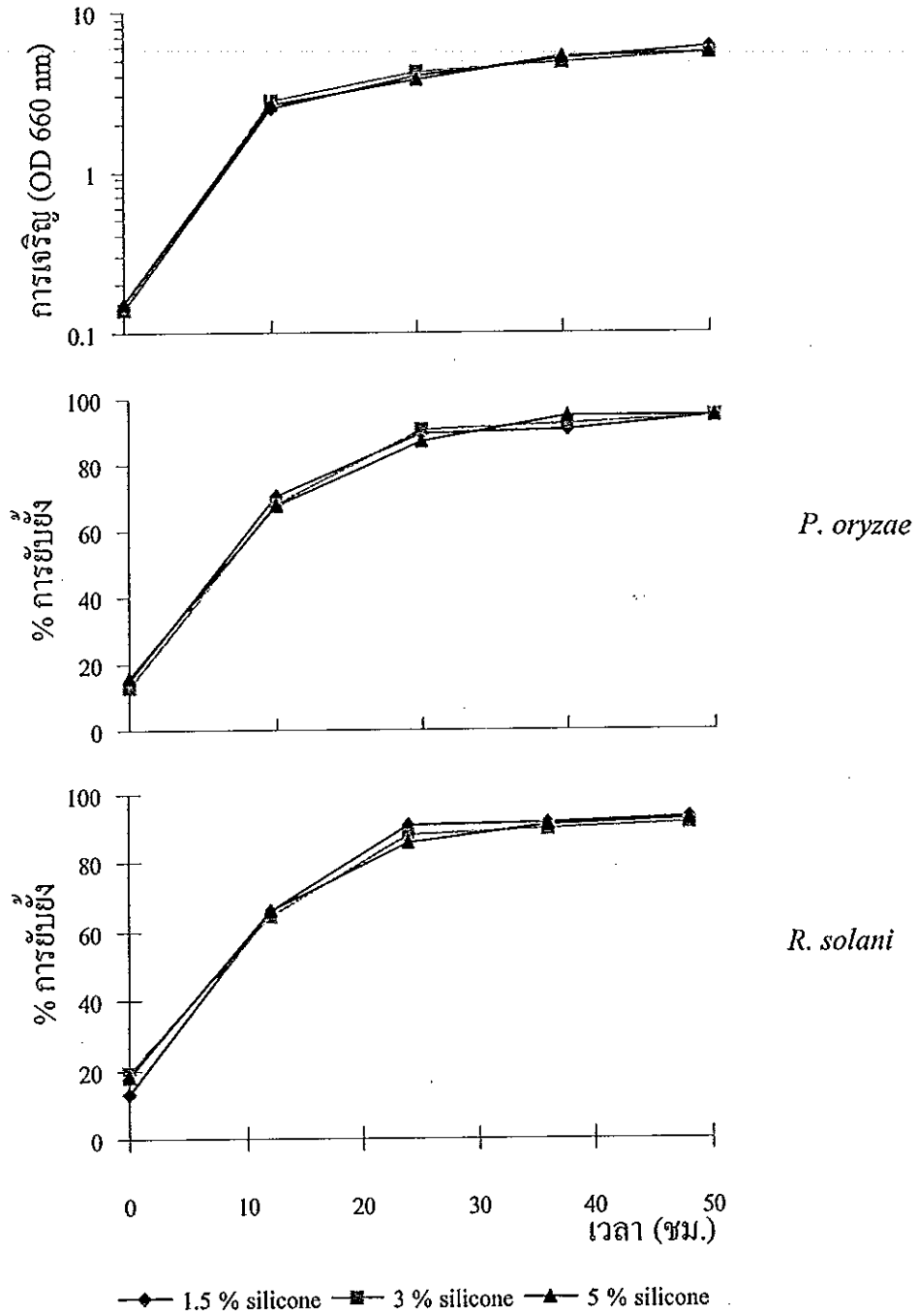
มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ดีกว่าอาหารที่มีปริมาตร 50 และ 150 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ P<0.05) (ตารางภาคผนวกที่ 33,34,35 และ 36) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 94.1 และ 96.1 ตามลำดับ ส่วนสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 สามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 98.5 และ 96.2 ตามลำดับ ส่วนพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก Sumino และ คณะ (1993) ศึกษาการผลิต purine nucleoside จาก *B. subtilis* AB-471 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก็คือ เลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 200 มล. ซึ่งมีอาหารปริมาตร 40 มล.ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

2.7 สารกำจัดฟอง (antifoams)

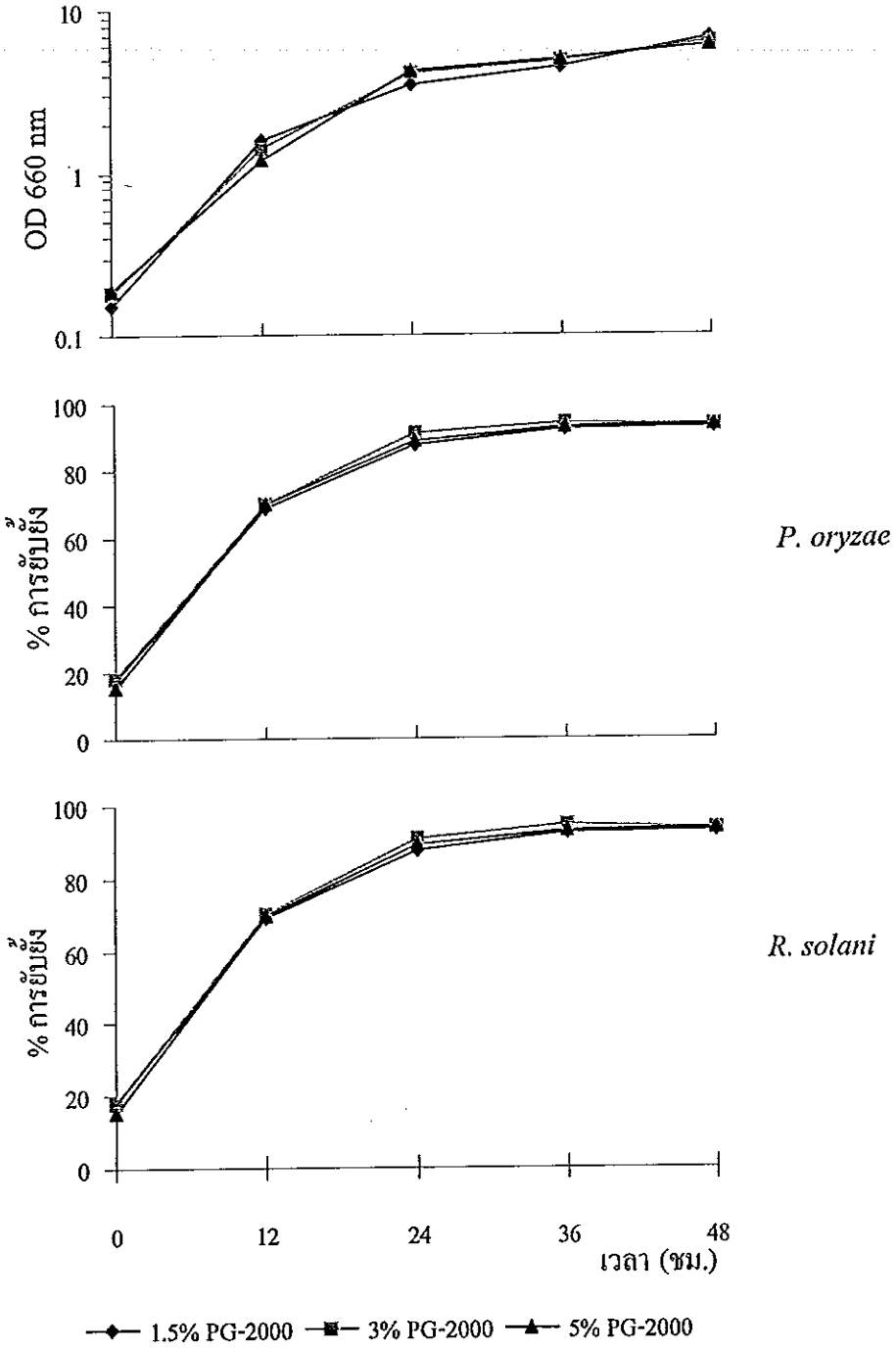
การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวจาก *B. subtilis* NSRS89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen ที่เหมาะสมจากข้อ 2.6 โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ศึกษาถึงชนิดและปริมาณของสารกำจัดฟอง 2 ชนิด คือ silocone ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (ภาพที่ 22 และ 23) และ polypropylene glycol (PG-2000) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (ภาพที่ 24 และ 25) ต่อการเจริญและออกฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ โดยเติมสารกำจัดฟองลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 1.5 3.0 และ 5.0 พบว่าสารกำจัดฟองทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลยับยั้งการเจริญและการออกฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ P <0.05) (ตารางภาคผนวกที่ 37,38,39,40,41,42,43 และ 44) แสดงว่าสารกำจัดฟองทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ หรือไม่ไปรบกวนการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว แต่จากการศึกษาผลของสารกำจัดฟอง 3 ชนิด คือ silicone antispumin และ PG-2000 ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* B31 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ของ สุชาดา คูชัยสิทธิ์ (2535) พบว่า สารกำจัดฟองทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการกำจัดฟองแตกต่างกัน โดยที่แต่ละชนิดมีความสามารถในการกำจัดฟองได้ดีตามลำดับ คือ silicone > antispumin > PG-2000 และการใช้ silicone เชื้อจะยังคงผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี ส่วนการใช้ antispumin จะทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะลดต่ำลง ในขณะที่การใช้ PG-2000 จะทำให้เชื้อไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะ



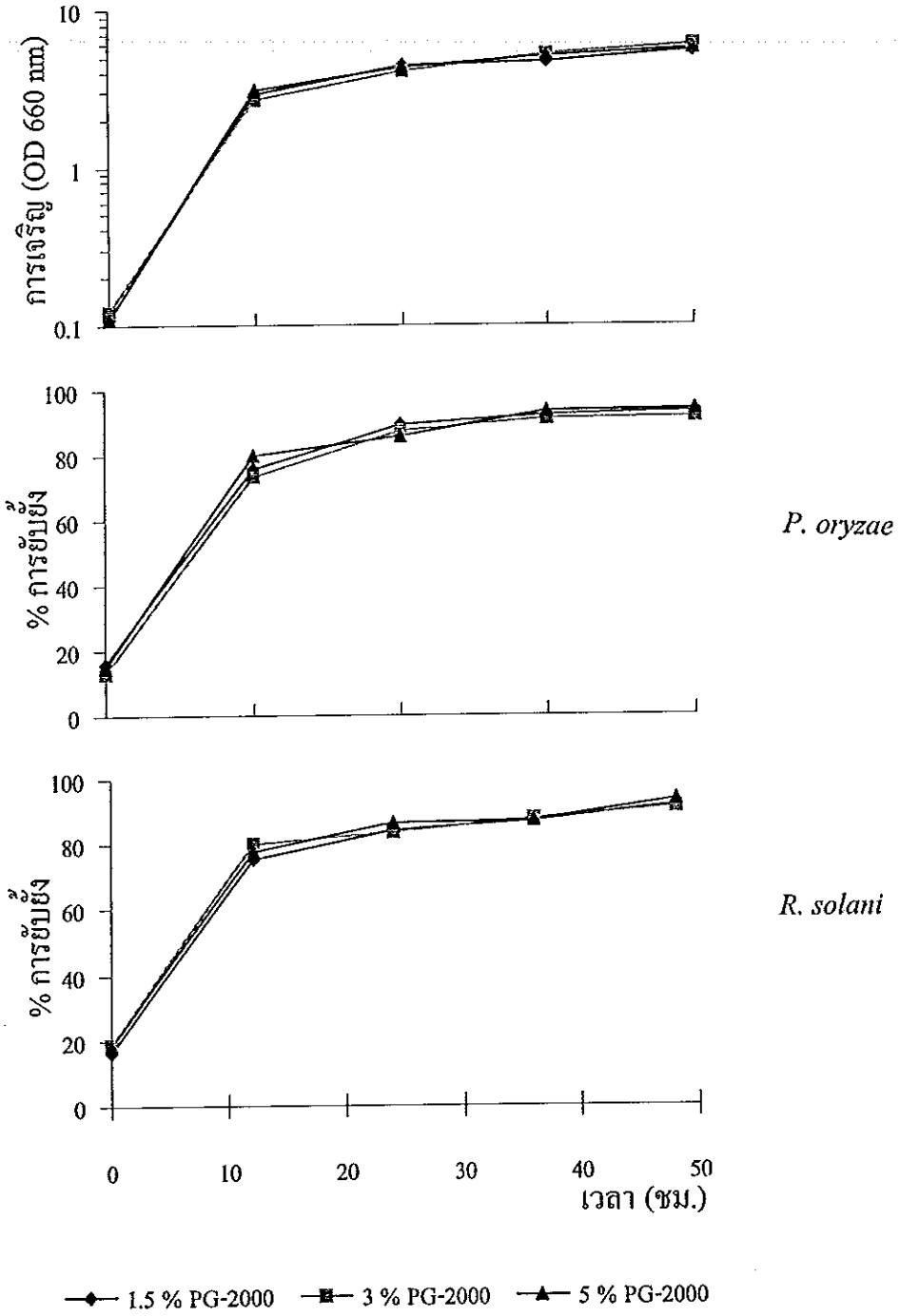
ภาพที่ 22 ผลของ silicone ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



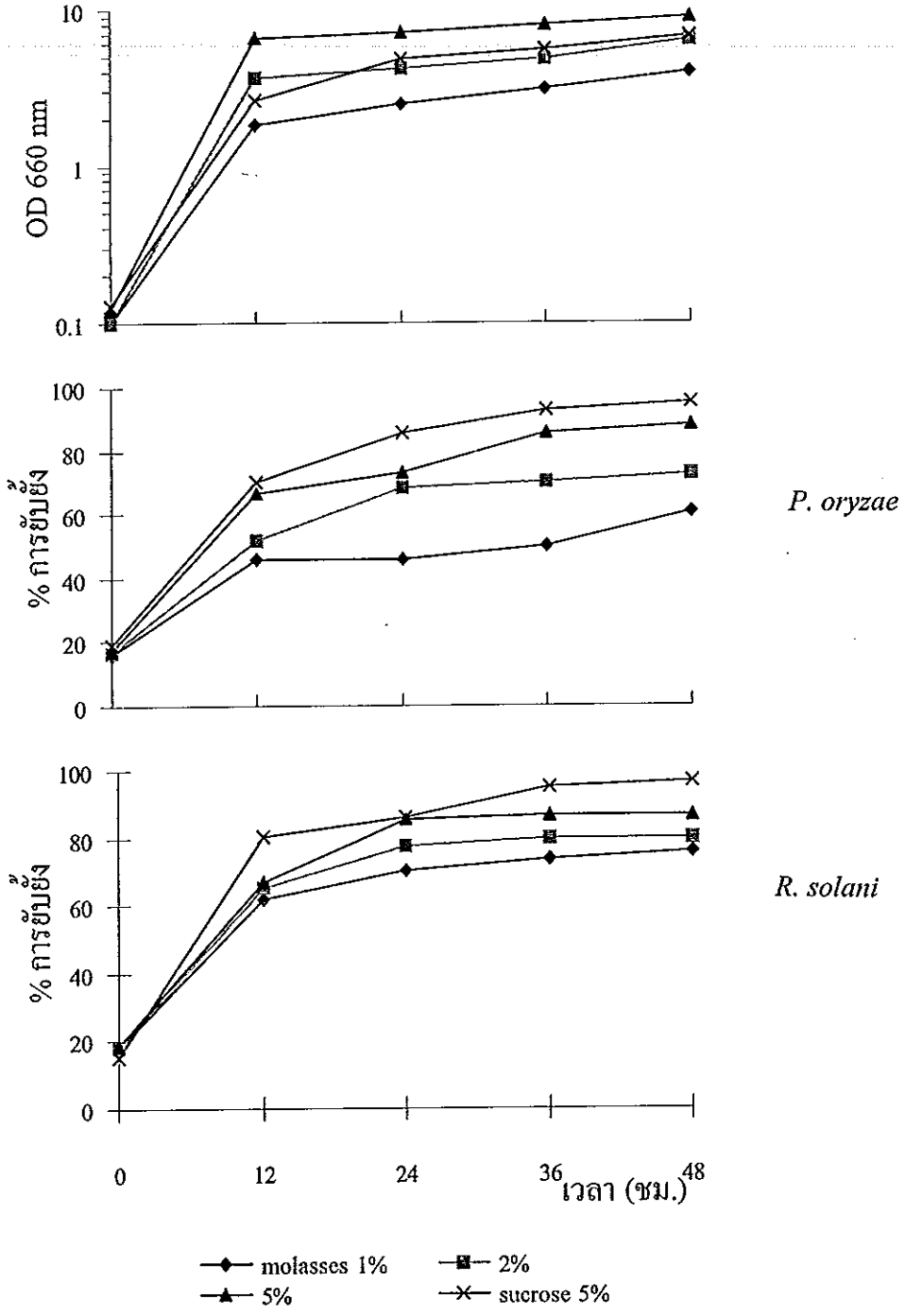
ภาพที่ 23 ผลของ silicone ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



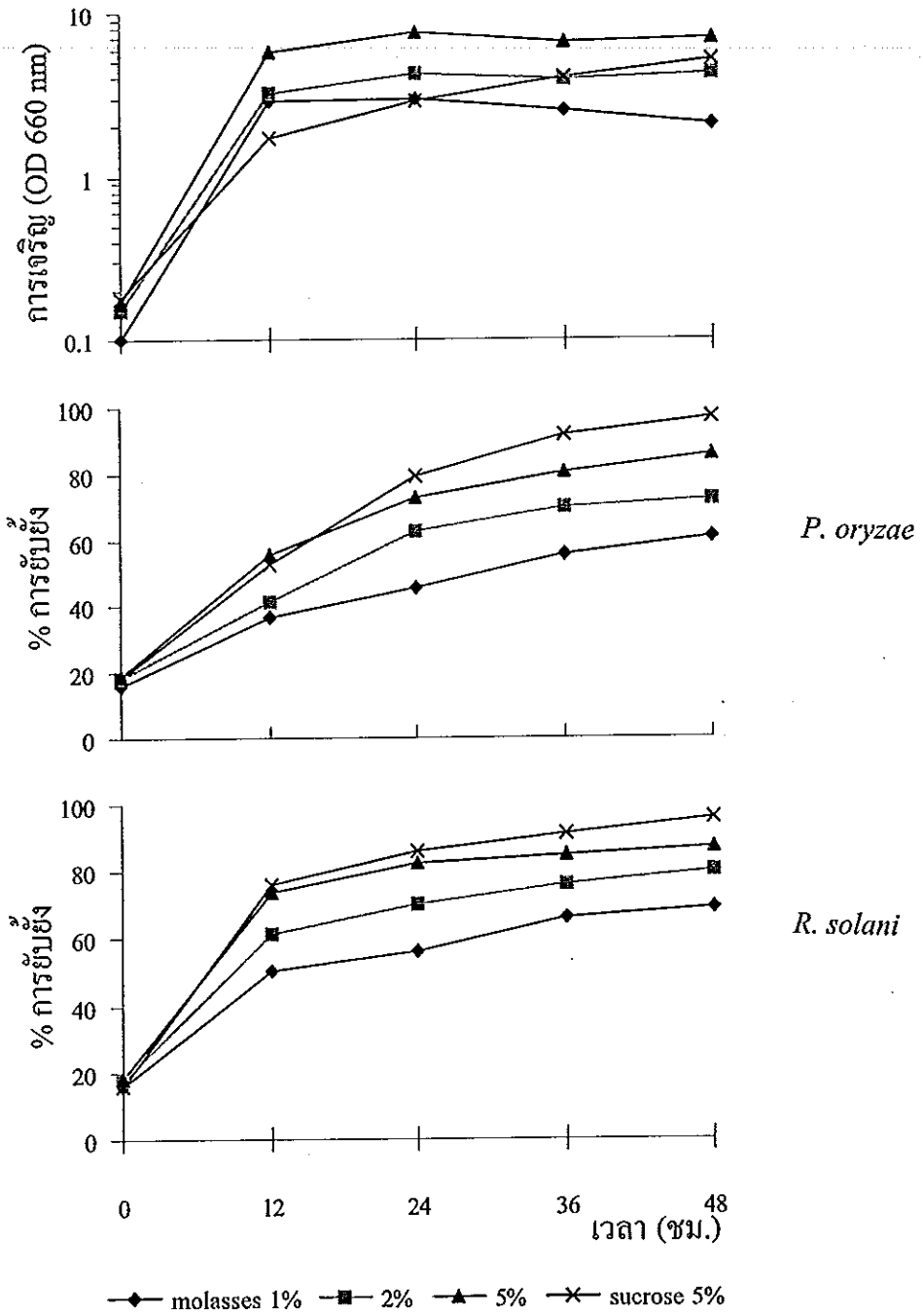
ภาพที่ 24 ผลของ PG-2000 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 25 ผลของ PG-2000 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 26 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 27 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* sp. LN 007

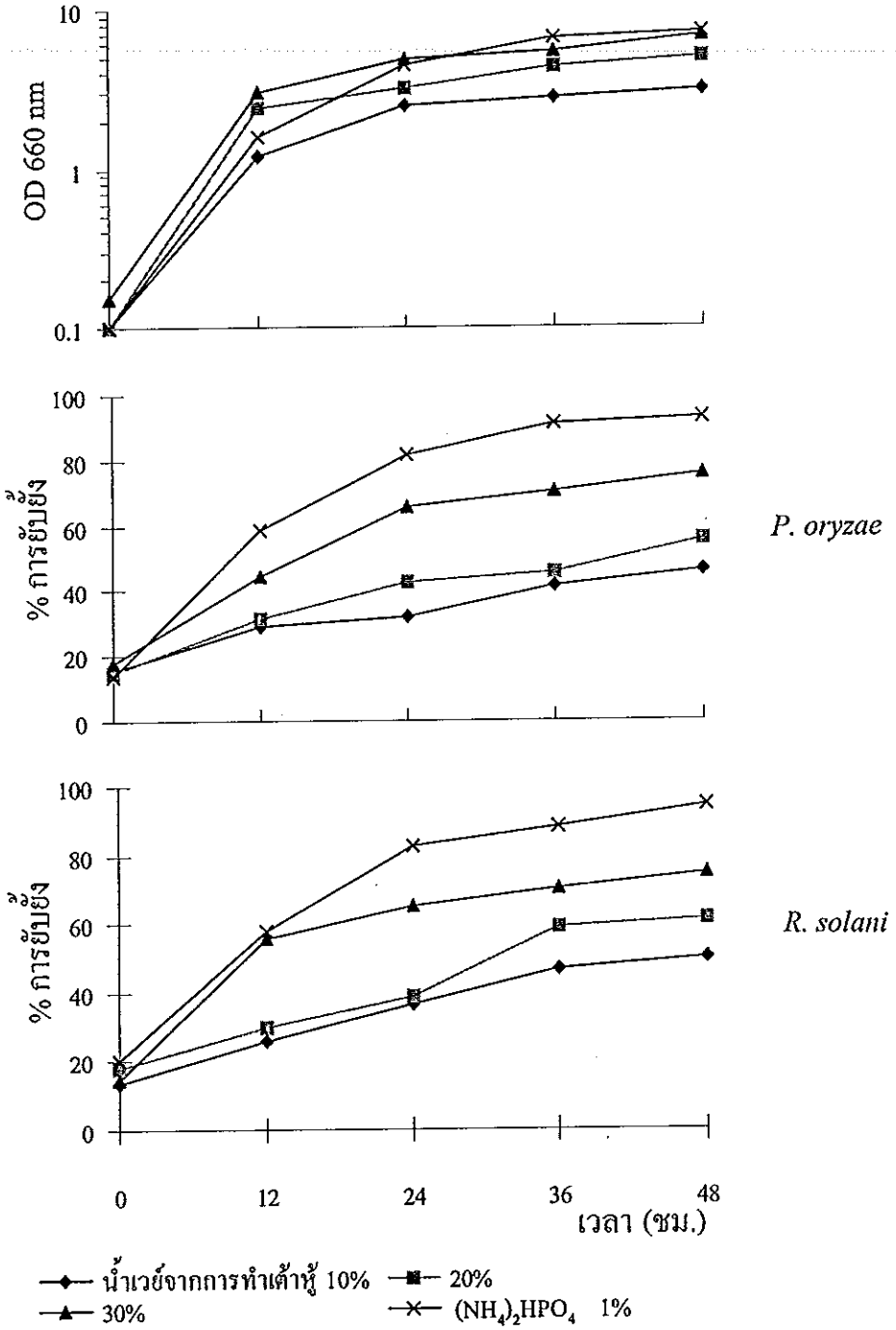
3. ชนิดของ complex medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา

3.1 การใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน

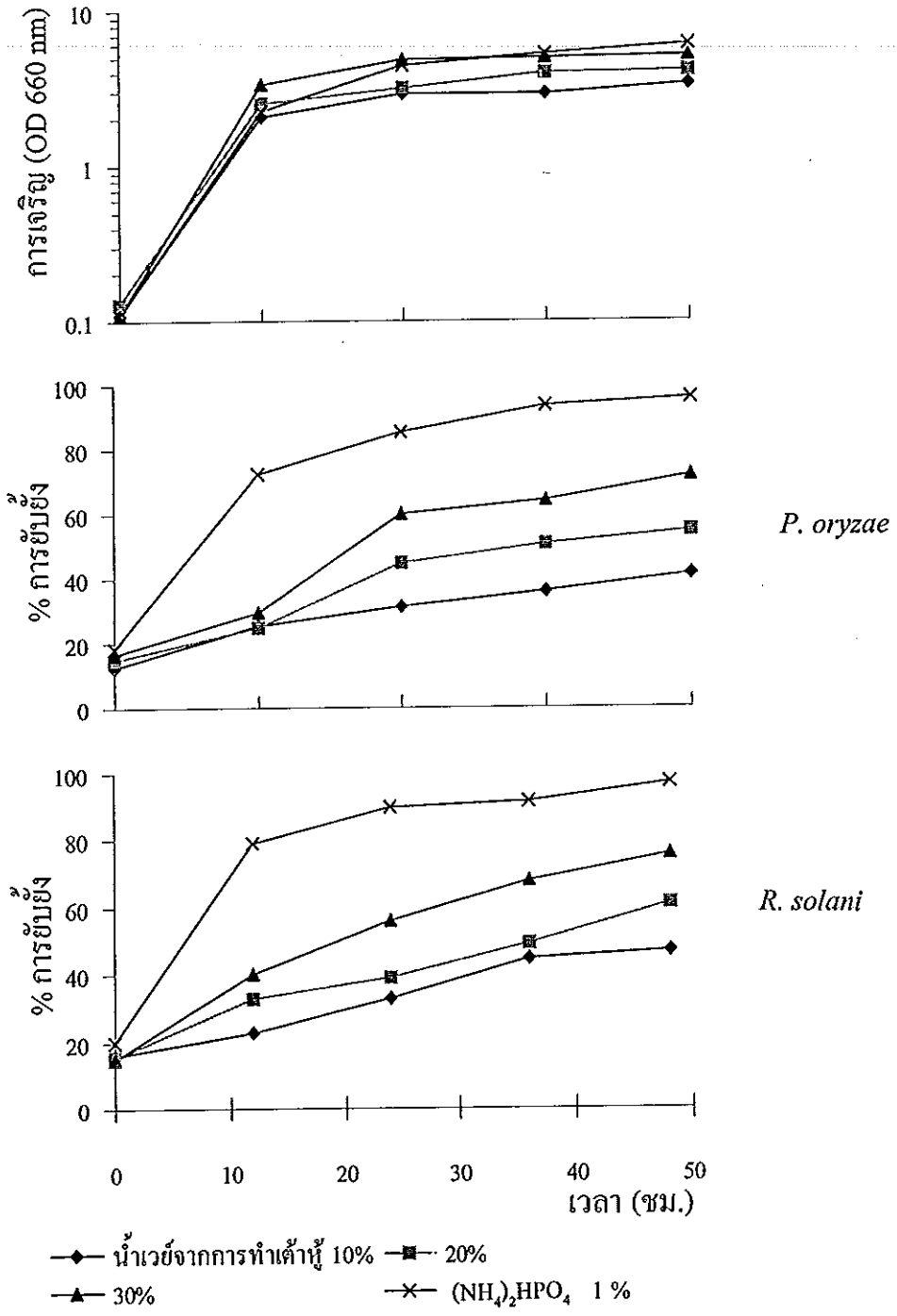
โมลาสเป็นวัสดุเศษเหลือของอุตสาหกรรมน้ำตาล เหตุผลสำคัญในการใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนก็คือราคาต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุ สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และวิตามิน องค์ประกอบทางเคมีของโมลาสที่วิเคราะห์ได้แสดงดังตารางที่ 3 โดยโมลาสมีน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 58 เมื่อใช้โมลาสนี้ร้อยละ 1 2 และ 5 แทนซูโครสร้อยละ 5 ในอาหารสูตร Mckeen ที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 (ภาพที่ 26) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 27) เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีที่สุดเมื่อใช้โมลาสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนซูโครส โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 45, 46, 47 และ 48) และสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 87.9 และ 86.5 ตามลำดับ ส่วนสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 ยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 85.9 และ 87.0 ตามลำดับ สำหรับพีเอชนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ถึงแม้ว่าในการใช้โมลาสร้อยละ 5 แทนซูโครสร้อยละ 5 นั้นประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวจะน้อยกว่าการใช้ซูโครสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนก็ตาม แต่ก็สามารถใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนได้ เพราะว่าโมลาสเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกกว่าซูโครส

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของโมลาส

น้ำตาลทั้งหมด	58 %
สารที่ละลายได้ทั้งหมด	83 %
แมกนีเซียม	300.916 (มก./ล)
แมงกานีส	4.581 (มก./ล)
เหล็ก	29.494 (มก./ล)



ภาพที่ 28 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ $(NH_4)_2HPO_4$ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



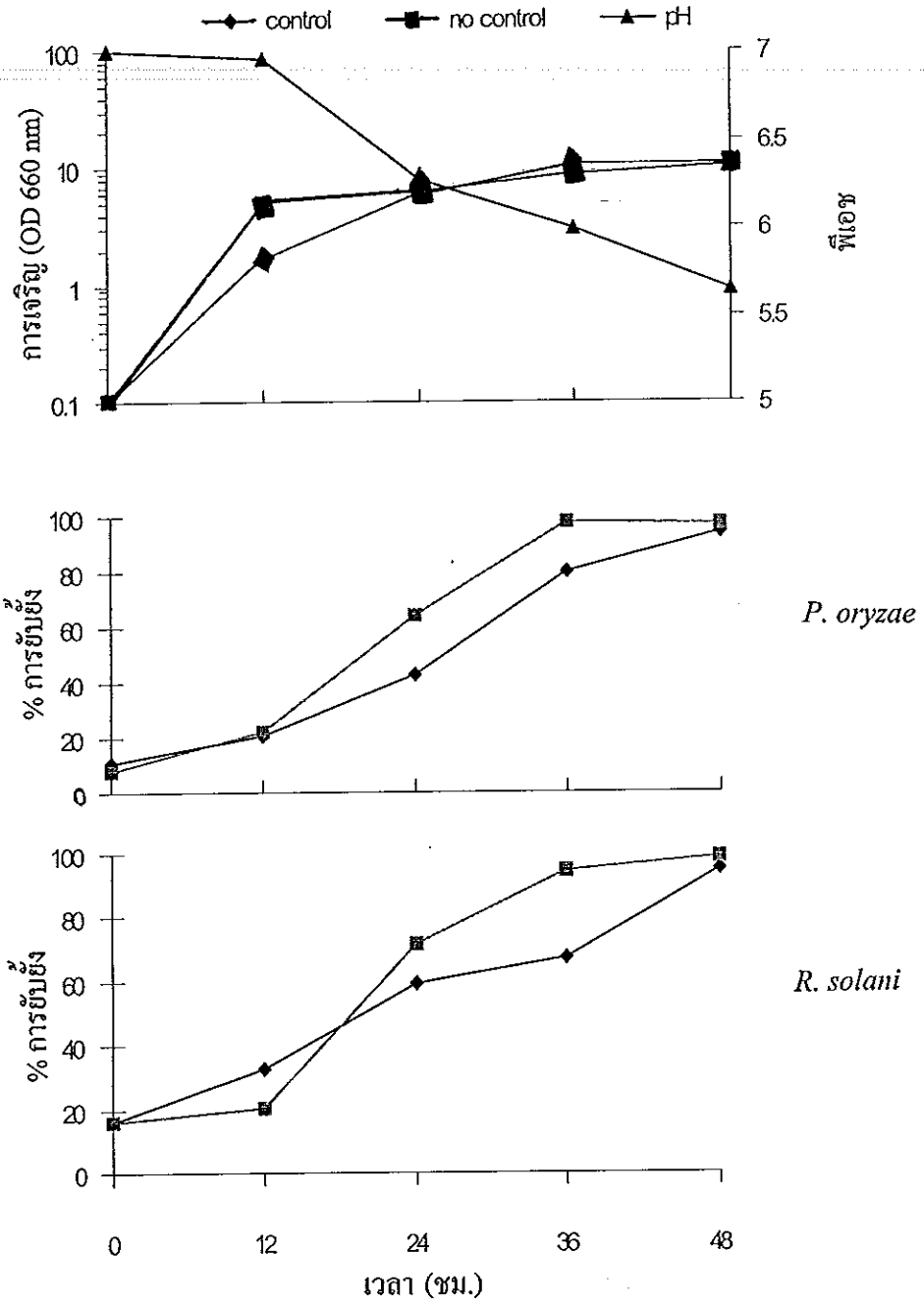
ภาพที่ 29 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ $(NH_4)_2HPO_4$ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

3.2 การใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้เป็นแหล่งไนโตรเจน

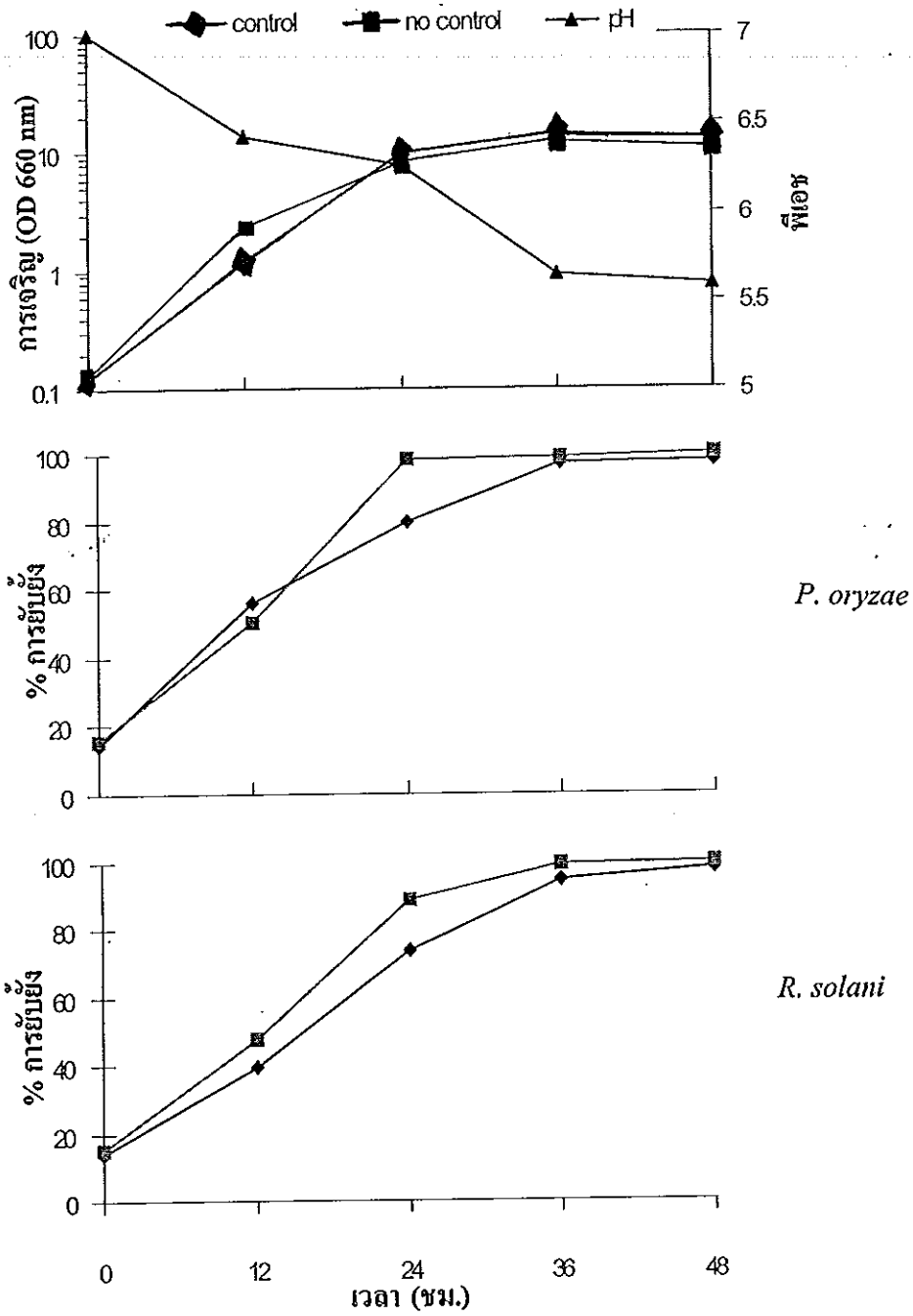
การทดลองใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้แทน $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 1.0 ในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุงที่มีซูโครสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ (ไนโตรเจน 0.074 % และ โปรตีน 0.42%) ร้อยละ 10 20 และ 30 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 28) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 29) เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีเมื่อใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 49,50,51 และ 52) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 75.6 และ 74.9 ตามลำดับ ส่วนสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 สามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 72 และ 75.6 ตามลำดับ พีเอชก็มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก จะเห็นว่าเมื่อใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30 แทน $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 1 การเจริญของเชื้อจะไม่แตกต่างกัน แต่ประสิทธิภาพของสารที่ผลิตได้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวจะแตกต่างกัน พบว่าการใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ30 ประสิทธิภาพของสารที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้น้อยกว่าการใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 1 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 49,50,51 และ 52)

จากการศึกษาของ สมใจ เอี่ยมพรรัตน์ (2531) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* KUBA 8612 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะนั้นจะขาดกลูโคสและ L-asparagine ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนไม่ได้แต่สามารถใช้กากถั่วเขียวเป็นแหล่งไนโตรเจนแทน L-asparagine

จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ได้นี้จะเห็นว่า *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้โมลาส และน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ในการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว แม้ว่าสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จะมีฤทธิ์น้อยกว่าการใช้ซูโครสและ $(NH_4)_2HPO_4$ แต่หากมีการศึกษาโดยละเอียดก็จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราได้ในระดับอุตสาหกรรม



ภาพที่ 30 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 31 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

ข. การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก *Bacillus* โดยการเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชเริ่มต้น และความสัมพันธุ์ของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ รวมทั้งจลนพลศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* สองสายพันธุ์ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเหลว (ซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาบนเครื่องเขย่า) ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง ประกอบด้วย sucrose 50.0 ก/ล, $(NH_4)_2HPO_4$ 10.0 ก/ล, $MgSO_4.7H_2O$ 1.02 ก/ล, K_2HPO_4 1.0 ก/ล, KCl 0.5 ก/ล, และ trace elements 1.0 มล/ล ($MnSO_4.4H_2O$ 0.5 กรัม, $CuSO_4.5H_2O$ 0.16 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

1. ผลของการควบคุมพีเอชเริ่มต้น

เปรียบเทียบผลการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 30) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 31) เมื่อมีการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชเริ่มต้น โดยใช้อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีและให้อากาศ 1.0 VVM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อไม่มีการควบคุมพีเอช เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีรวมทั้งสามารถผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราได้ดีกว่าเมื่อควบคุมพีเอชและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 53,54,55 และ 56) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 97.0 และ 99.0 ตามลำดับ ส่วนสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 สามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 99.6 และ 100.0 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนพีเอชจะลดลงเล็กน้อย ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในถังหมักจึงไม่มีการควบคุมพีเอช ซึ่งตรงกันข้ามกับการทดลองของ Suphantharika และคณะ (1994) ที่ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะพวก Difficidin และอนุพันธุ์คือ Oxydifficidin จากเชื้อ *B. subtilis* ATCC 39374 ในถังหมัก พบว่า Difficidin และอนุพันธุ์คือ Oxydifficidin เป็นสารที่ไม่มีความคงตัวในสภาวะเป็นด่างที่พีเอช 6.8 มีอัตราการสูญเสียร้อยละ 10 ภายในเวลา 8-10 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการควบคุมพีเอช และ Dissolved Oxygen Tension (DOT) ในถังหมักพีเอชจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 6.8 ถึง 8.8 ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้คงที่ที่ 6.8 ในการเลี้ยงเชื้อจะใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.33 VVM

2. ผลของอัตราการกวน

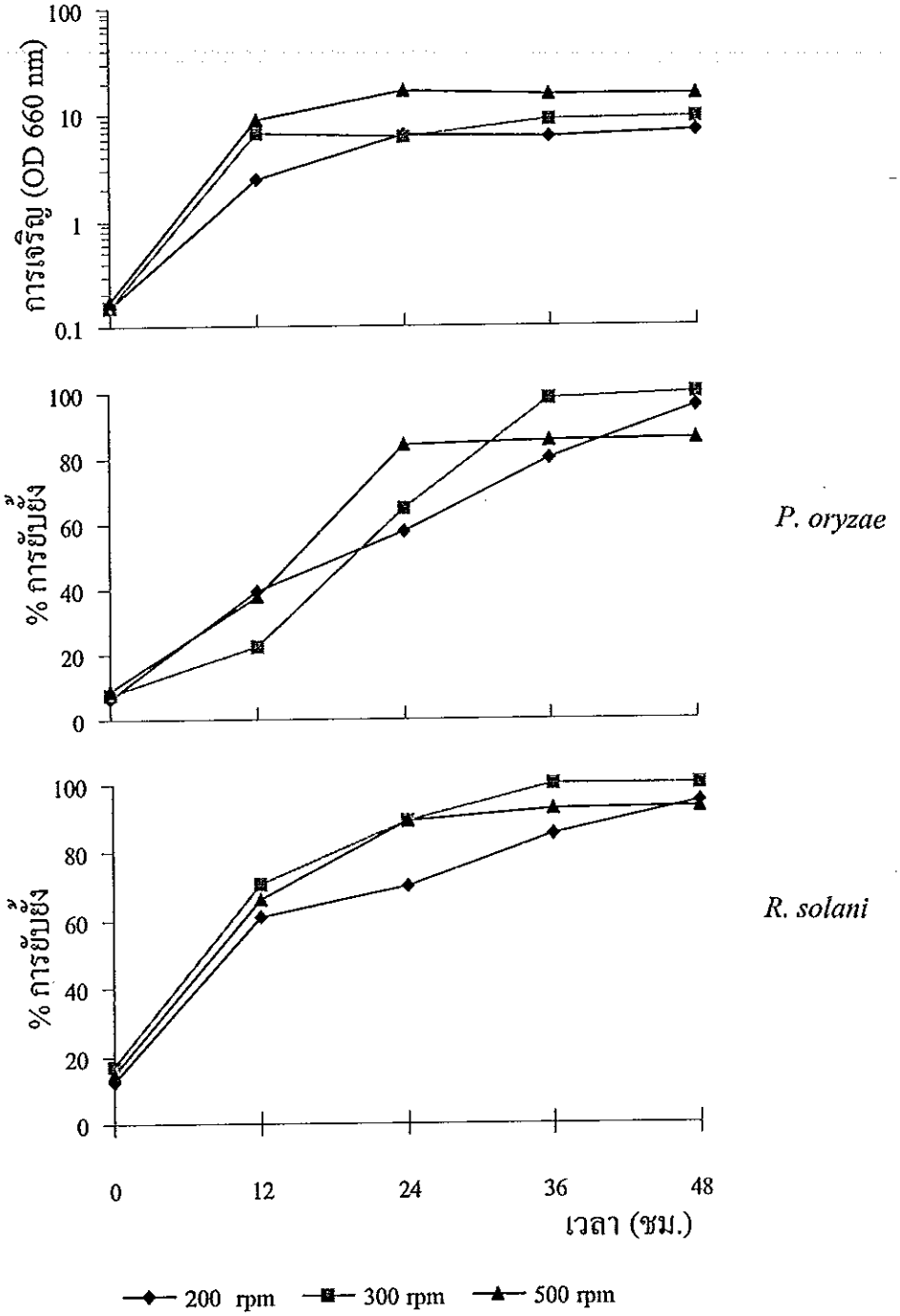
การเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนที่ 200 300 และ 500 รอบต่อนาที โดยควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 VVM และไม่มีการควบคุมพีเอชเริ่มต้น พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดี และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 57,58,59 และ 60) โดยสารที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 (ภาพที่ 32) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 99.8 และ 100.0 ตามลำดับ และสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 33) สามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 100.0 และ 98.8 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนพีเอชลดลงเล็กน้อย จะเห็นว่าการใช้อัตราการกวนที่มากหรือน้อยเกินไปจะมีผลให้การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราลดต่ำลงได้

3. ผลของอัตราการให้อากาศ

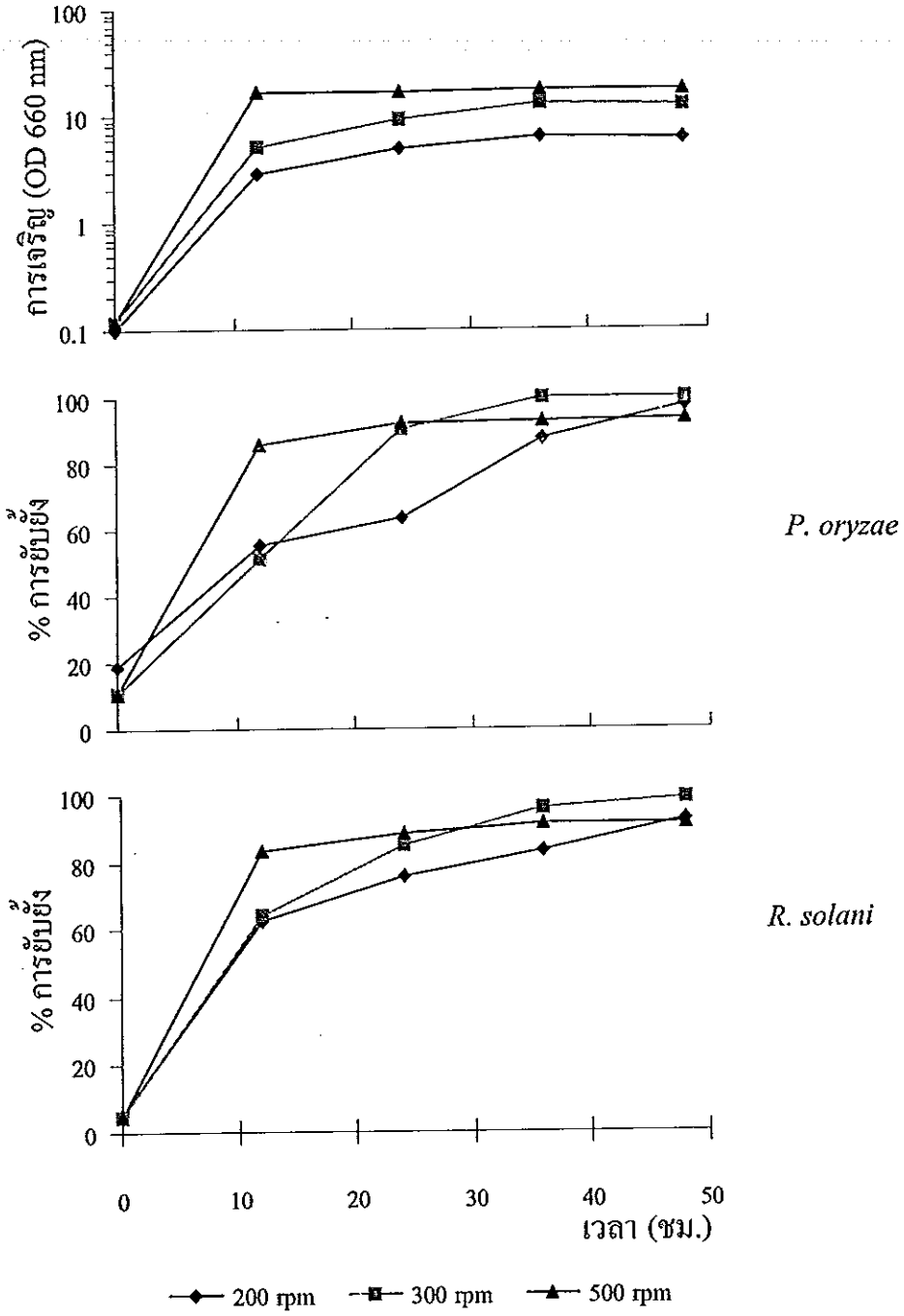
การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในถังหมักที่มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอช เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบอัตราการให้อากาศระหว่าง 1 และ 2 VVM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการให้อากาศ 2 VVM เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราได้ดี และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 61,62,63 และ 64) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 34) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 100 และ 100 ตามลำดับ และสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 35) สามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 100 และ 98.8 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนพีเอชก็ลดลงเล็กน้อย

ดังนั้นการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 VVM โดยไม่มีการควบคุมพีเอช เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

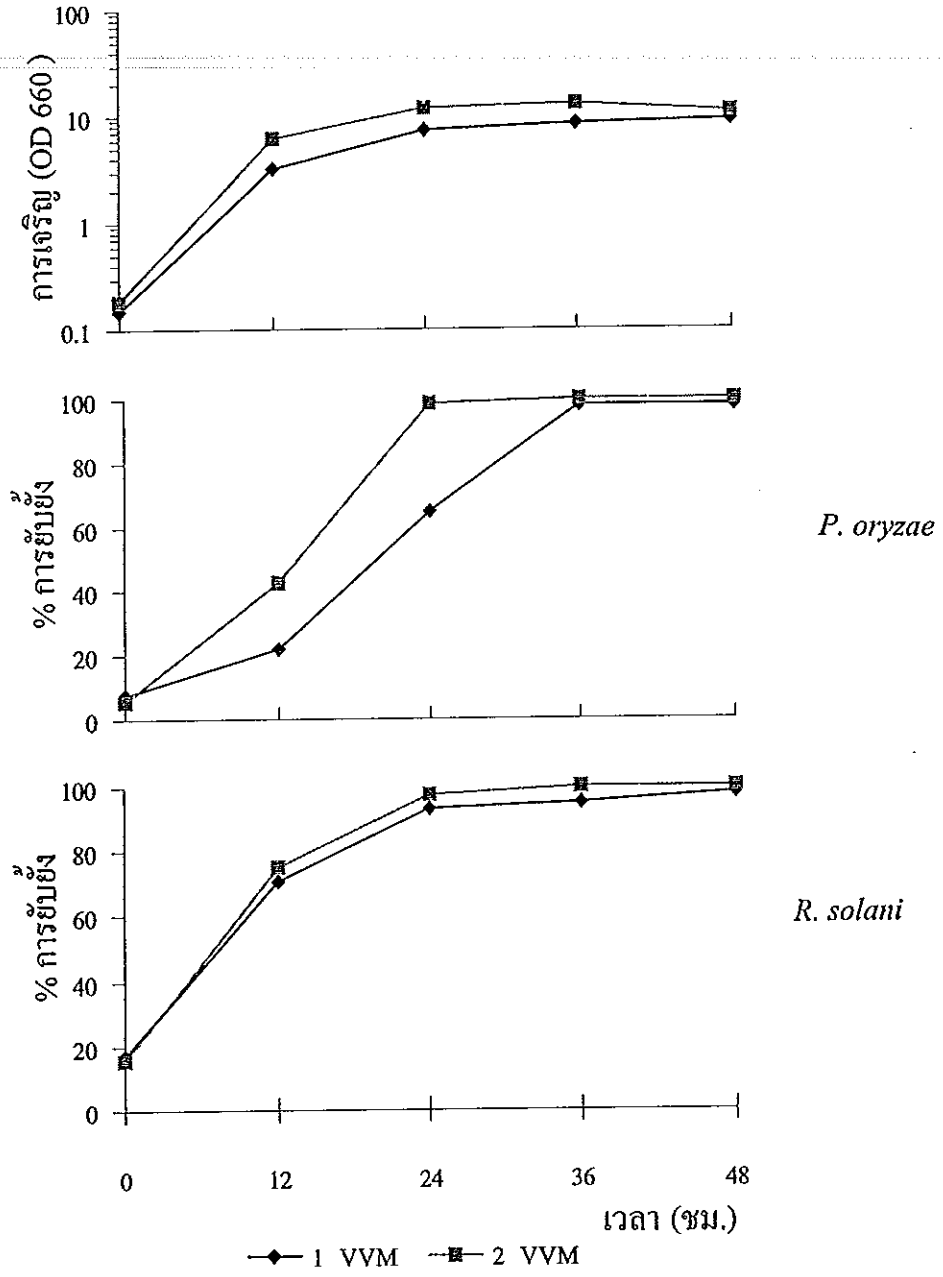
สุชาดา ดูชัยสิทธิ์ (2535) ผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* B31 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ คือบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0-1.25 VVM และอัตราการกวน 100-150 รอบต่อนาที ส่วน Sen และ Swaminathan (1997) ผลิต Surfactin จาก *B. subtilis* DSM



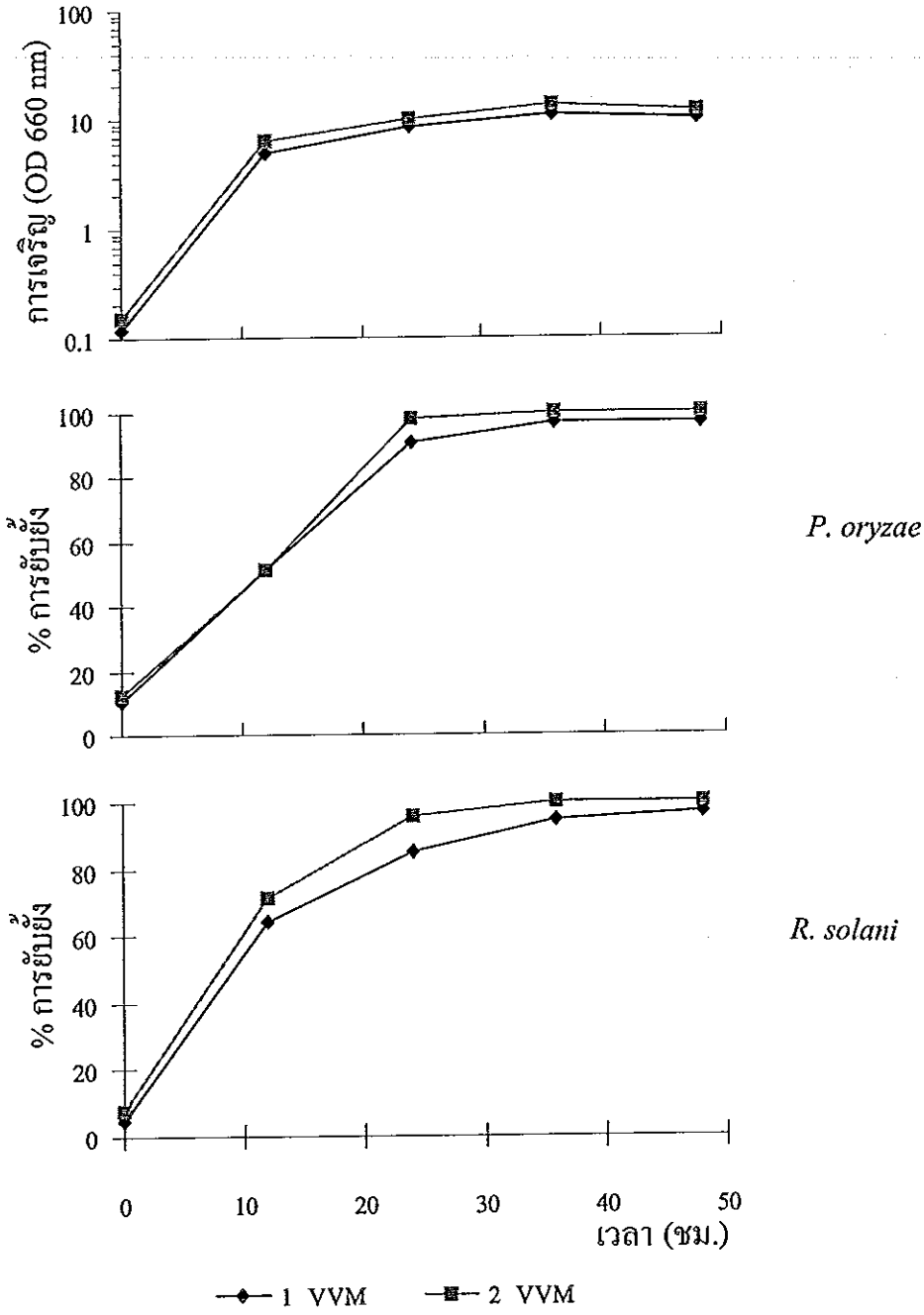
ภาพที่ 32 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 33 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 34 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

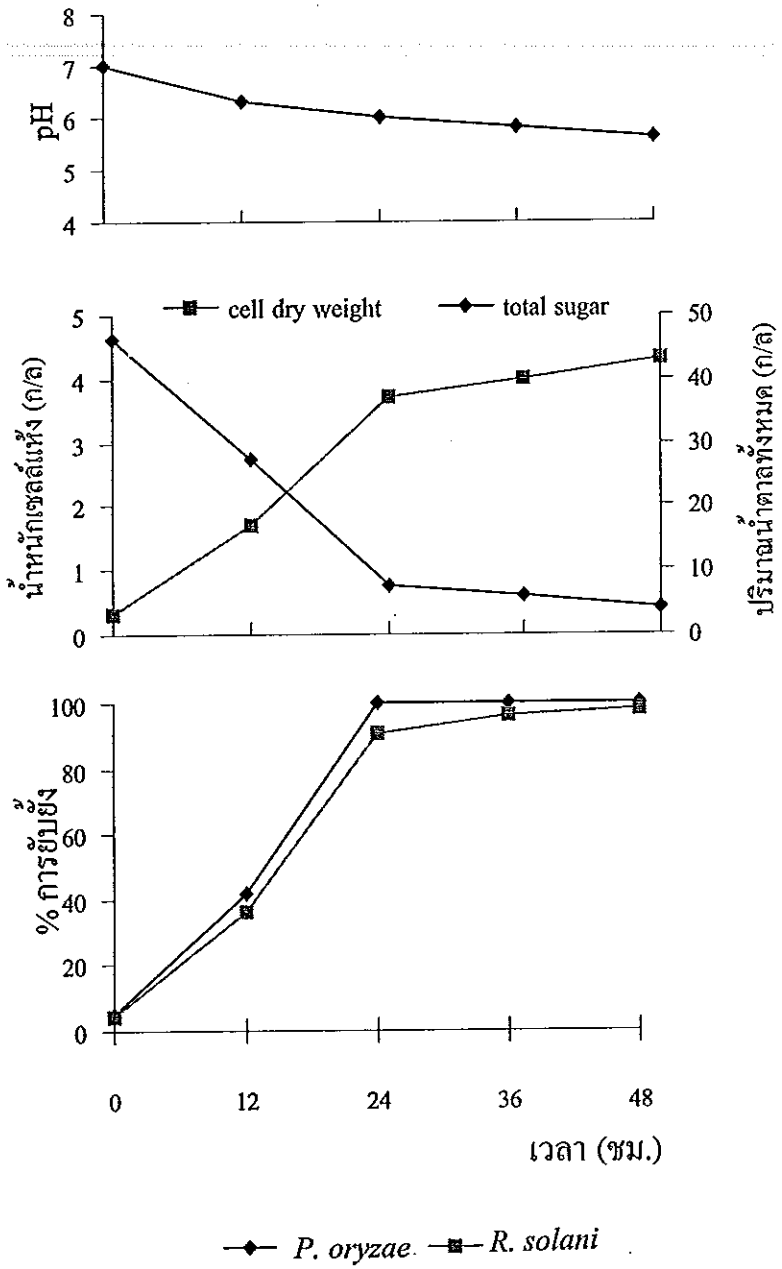


ภาพที่ 35 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* sp. LN 007

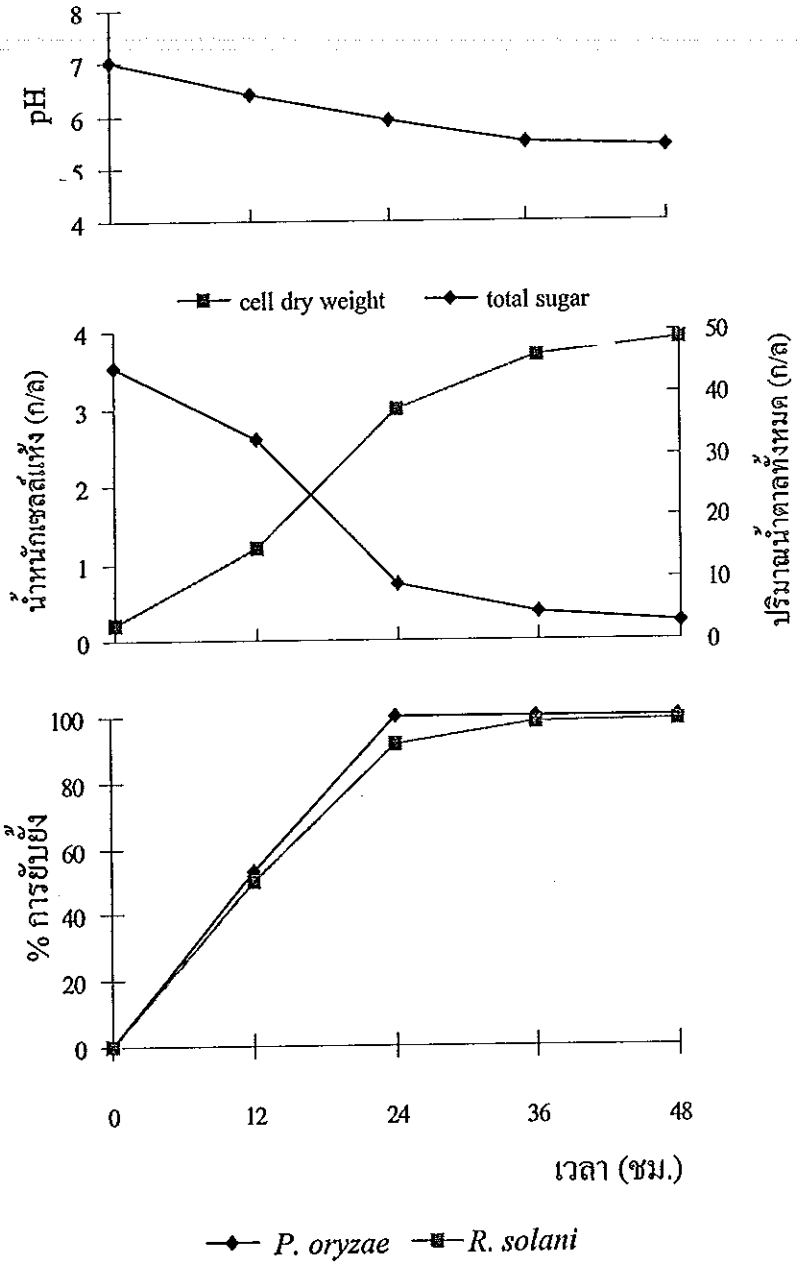
3256 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่ม Surfactin คืออุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการกวน 140 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.75 VVM

4. จลนพลศาสตร์ของการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ของ *Bacillus* สองสายพันธุ์

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ระบบการหมักแบบกะซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยการเลี้ยงเชื้อในระบบปิด ซึ่งมีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัด โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร Mckeen ที่ปรับปรุงแล้วปริมาตร 1.5 ลิตร ประกอบด้วย ซูโครส 50.0 ก/ล, $(NH_4)_2HPO_4$ 10.0 ก/ล, $MgSO_4.7H_2O$ 1.02 ก/ล, K_2HPO_4 1.0 ก/ล, KCl 0.5 ก/ล, และ trace elements 1.0 มล/ล ($MnSO_4.4H_2O$ 0.5 กรัม, $CuSO_4.5H_2O$ 0.16 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล) และมีสภาวะที่เหมาะสมจากการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า (อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, เลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง, พีเอชอาหารเริ่มต้น 7.0) และการเลี้ยงเชื้อในถังหมักจะไม่มีการควบคุมพีเอชของอาหาร ใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2 VVM พบว่าสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 36) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 100.0 และ 97.9 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งจะเห็นว่าสารที่ผลิตได้นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีมาก สำหรับพีเอชจะลดลงเป็น 5.6 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.4 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลจะลดลงมากหลังจากชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์นำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะ เหลือน้ำตาล 4.2 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าการผลิตสารปฏิชีวนะจะเกิดขึ้นในช่วงที่เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว จนถึงช่วงที่มีการเจริญคงที่ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวบนเครื่องเขย่า สำหรับสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 37) ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันคือ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 100 และ 98.5 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 พีเอชจะลดลงเป็น 5.4 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.0 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.096 ต่อชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลจะลดลงมากหลังชั่วโมงที่ 12 เช่นกัน โดยเหลือน้ำตาล 3.0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 36 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง พีเอช และการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง



ภาพที่ 37 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง พีเอช และการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007 ระหว่างการเจริญในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง

จากการทดลองนี้จะเห็นว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงของพีเอชปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวคล้ายๆกัน

ค. คุณสมบัติบางประการของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

ภายหลังจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวแล้วจึงทำการผลิตและเตรียมสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ดังต่อไปนี้

1. ความคงตัวของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

ศึกษาถึงความคงตัวของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้โดยนำส่วนใสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ไปทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 35-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และผ่านการเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว พบว่า สารที่ผลิตได้นี้ยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว (ไม่แสดงผล) ได้ดีเหมือนเดิม แสดงว่าสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความคงตัวสูง สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง ๆ ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุชล แก้วพรหม (2539) ที่พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *Rhynchosporium oryzae* สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้มีคุณสมบัติละลายน้ำ มีลักษณะสีน้ำตาล และเสถียรทนต่อความร้อนได้สูง โดยสามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปผสมกับอาหารสำหรับทดสอบ และยังคงแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mckeen และคณะ (1986) ที่ผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* B3 เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Monilinia fructicola* พบว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ยังคงออกฤทธิ์ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผลิตได้มาผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที Baker และคณะ (1983) ศึกษาสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *B. subtilis* APPL-1 ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของโรคราสนิมในถั่ว พบว่าสารที่ผลิตได้นี้ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แต่ Bernheimer และ Avigad (1970) ได้ผลิต Subtilysin จาก *B. subtilis* พบว่าสารที่

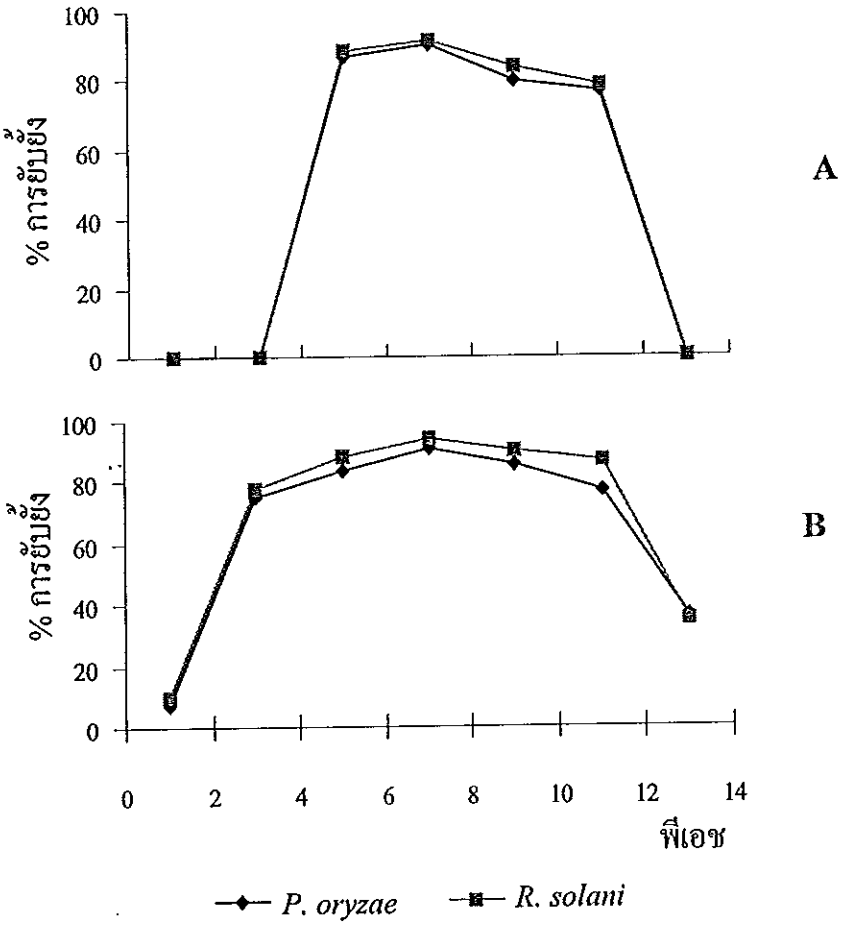
ผลิตได้ยังคงออกฤทธิ์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และมีพีเอช 8.2 หรือ 9.6 แต่ถ้าพีเอช 3 การออกฤทธิ์จะหายไปประมาณ 2 ใน 3 ส่วน สมใจ เอี่ยมพรรัตน์ (2531) พบว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Bacillus* KUBA 8601.2 และ *Bacillus* 8612 ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ สามารถทนต่ออุณหภูมิได้แค่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

2. การแสดงฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ที่พีเอชต่างๆ

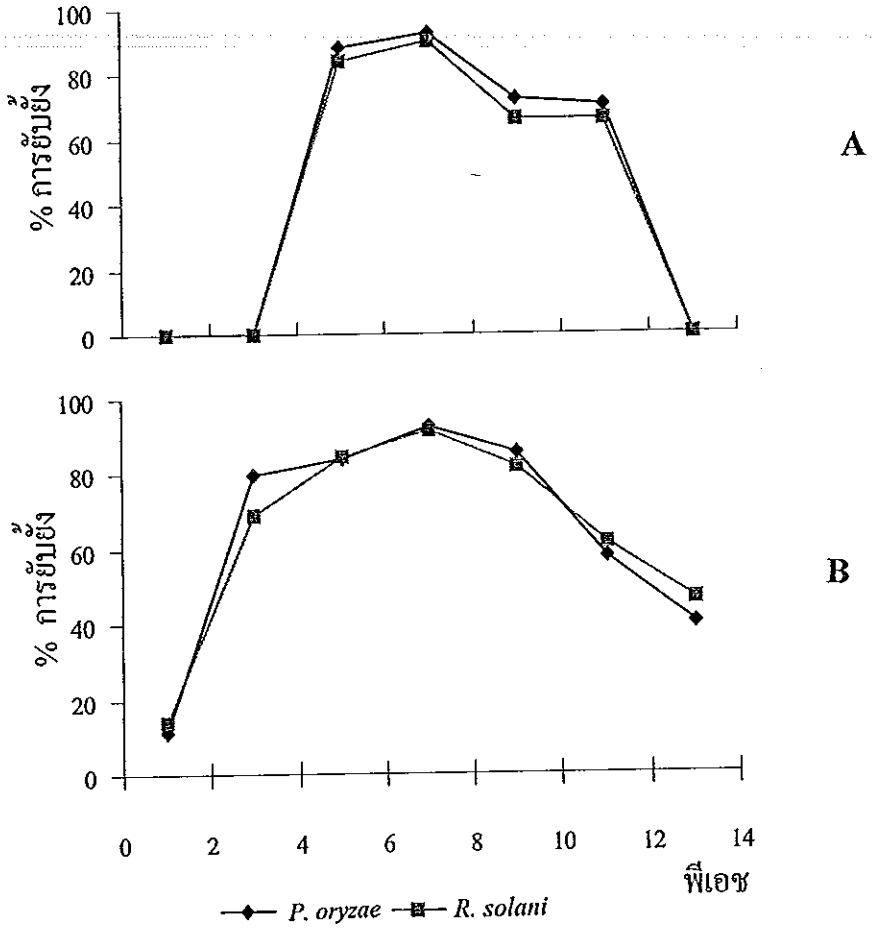
จากการทดลองเป็นการศึกษาถึงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อการออกฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 โดยปรับส่วนใสที่ผลิตได้ให้มีพีเอชต่างๆกันคือ 1 3 5 7 9 11 และ 13 แล้วทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว ผลการทดลองพบว่าสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 5-11 และมีแนวโน้มการทำงานได้ดีในช่วงพีเอชตั้งแต่ 5-7 โดยสารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 38 A) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ในช่วงร้อยละ 90.0-76.5 และ 91.2-78.2 ตามลำดับ และที่พีเอช 7 ยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 90.0 และ 91.2 ตามลำดับและ ส่วนสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 39 A) สามารถยับยั้งได้ในช่วงร้อยละ 92.8-70.2 และ 90.1-65.8 ตามลำดับ และที่พีเอช 7 ยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 92.8 และ 90.1 ตามลำดับ

3. ความคงตัวของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ที่มีพีเอชต่างๆกัน

สำหรับความคงทนของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ที่พีเอชต่างๆ กัน โดยการนำสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้มาปรับให้มีพีเอชเท่ากับ 1 3 5 7 9 11 และ 13 เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปรับให้มีพีเอช 7 แล้วทดสอบฤทธิ์ของสารที่ผลิตได้ ผลการทดลองพบว่าสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ทนต่อพีเอชในช่วง 3-11 โดยมีความคงตัวของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 ซึ่งสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 38 B) ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 90.6 และ 93.9 ตามลำดับ และสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 39 B) สามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 92.4 และ 91.5 ตามลำดับ จะเห็นว่าสารที่ผลิตได้นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค



ภาพที่ 38 ผลของพีเอชต่อการแสดงฤทธิ์ (A) และความคงตัว (B) ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

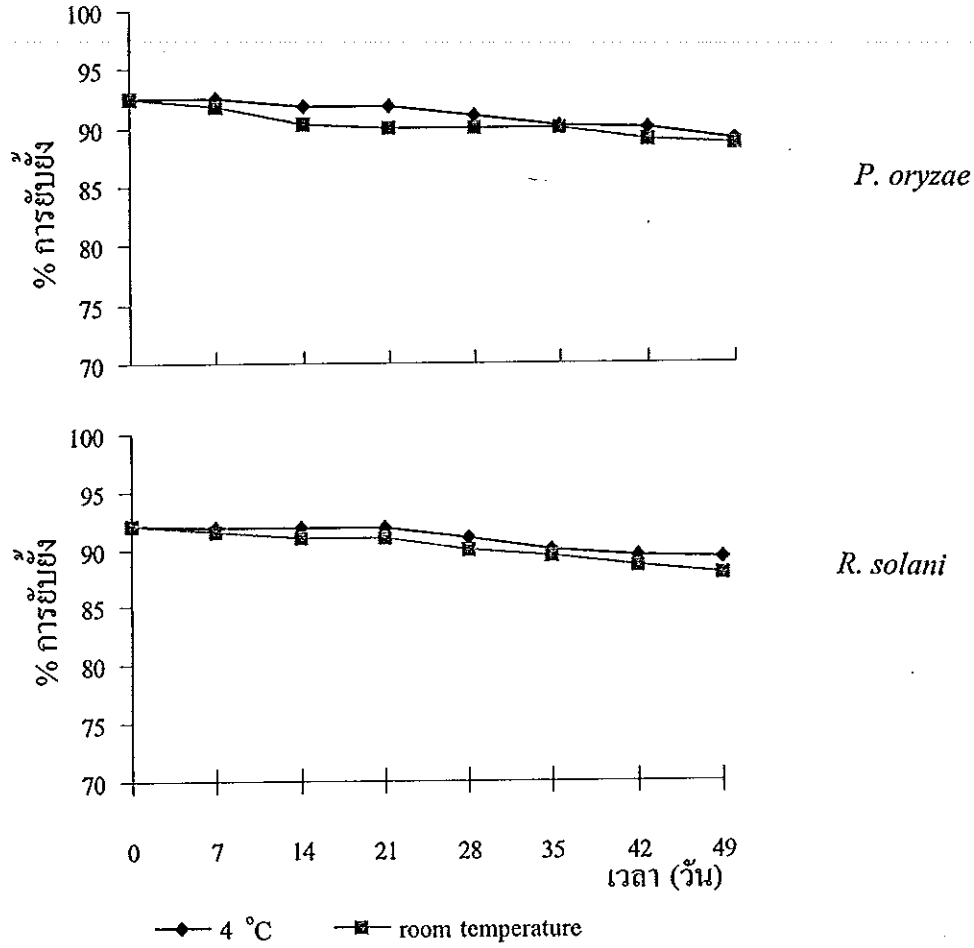


ภาพที่ 39 ผลของพีเอชต่อการแสดงฤทธิ์ (A) และความคงตัว (B) ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. LN 007

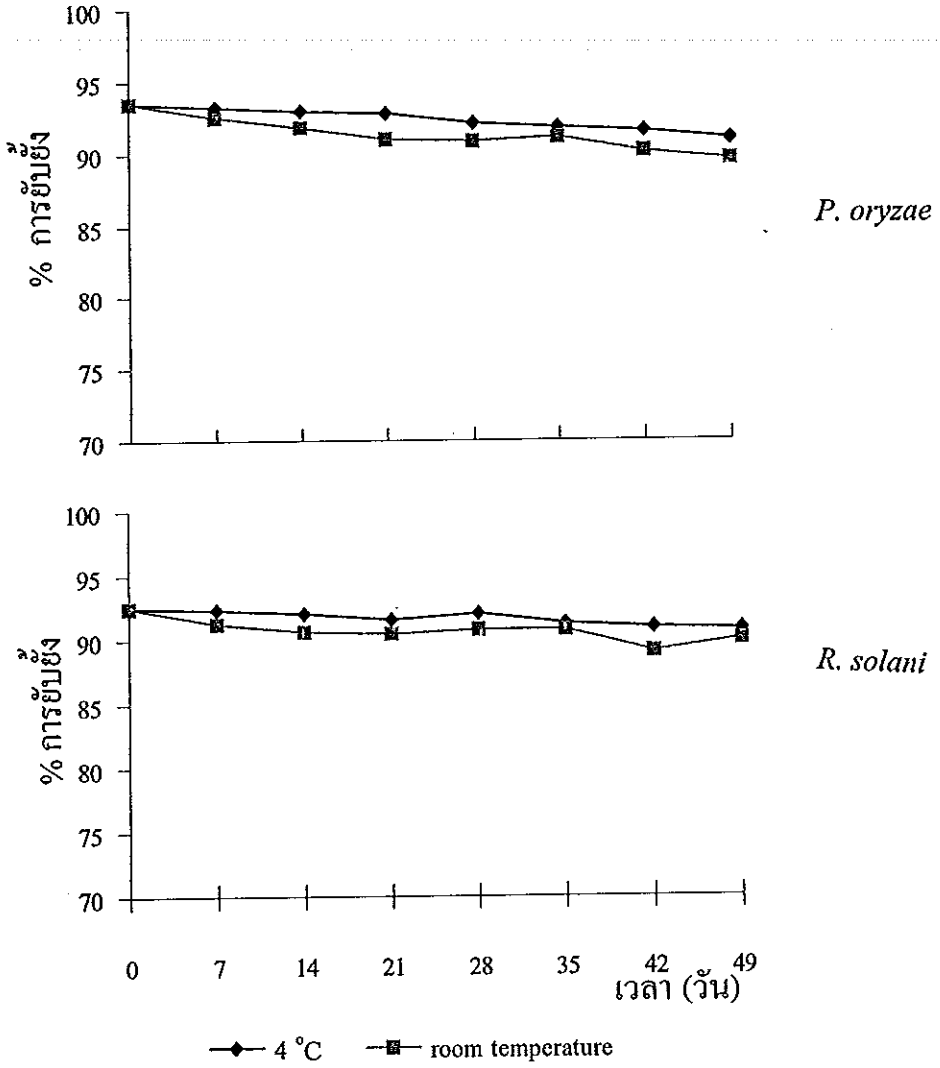
ข้าวได้ไม่ดีในสภาพที่มีความเป็นกรด-ด่าง สูงๆ ทั้งนี้เนื่องจากที่สภาพความเป็นกรด-ด่างสูง ๆ สันนิษฐานอาจมีการเปลี่ยนแปลงหมู่ของสารเคมีบางหมู่บนโครงสร้างโมเลกุลของสารเช่นเดียวกับที่ระดับความเป็นกรดด่างเกิน 11 มีการเปลี่ยนแปลงของ OH group ทำให้โครงสร้างของโมเลกุลของสารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งอาจเป็นส่วนของสารที่แสดงถึงความมีประสิทธิภาพ จึงทำให้คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทั้งสองชนิดลดลง

4. การเก็บรักษาสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้

ศึกษาความคงตัวของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ โดยนำสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 49 วัน ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทุกๆ 7 วัน ผลแสดงดังภาพที่ 40 และ 41 พบว่าสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวที่ผลิตได้สามารถเก็บรักษาไว้ได้ทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีแต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง อาจเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอกได้ง่ายและมีการเจริญของ *Bacillus* ซึ่งตกค้างอยู่เนื่องจากการแยกเซลล์ออกไม่หมดทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวที่ผลิตได้ และยังเป็นอุปสรรคต่อการนำมาใช้ ดังนั้นการเก็บรักษาสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ เพื่อให้สารยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีเป็นเวลานาน ควรทำการเก็บรักษาสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือเพื่อความสะดวกในการเก็บรักษามากยิ่งขึ้น ก่อนการเก็บรักษาควรนำสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในทำนองเดียวกัน Mckeen และคณะ (1986) ก็ได้ศึกษาถึงการเก็บรักษาสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* B3 พบว่าเมื่อเก็บสารปฏิชีวนะไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน การแสดงฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ก็ยังคงเหมือนเดิมและสารก็ยังคงมีความคงตัวทั้งในสภาวะที่เป็นกรดกลาง และด่างพร้อมทั้งสารปฏิชีวนะที่ได้นี้ก็มีความสามารถในการละลายได้เหมือนกับ Iturin A เช่นเดียวกับ Nandi และ Sen (1953) กล่าวว่าสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตจาก *B. subtilis* สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้มากกว่า 3 เดือน โดยสารที่ผลิตได้ยังคงมีประสิทธิภาพดีเหมือนเดิม



ภาพที่ 40 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 41 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. LN 007

บทที่ 4

สรุป

1. เมื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ทั้งหมด 4 สูตร คือ Glucose Asparagine Mineral Salts Medium (GAM), No.3 medium, Mckeen และ Glucose Meat Extract Peptone Medium (GMP) พบว่าอาหารสูตร Mckeen เป็นสูตรที่ทำให้เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้งในข้าว ตามลำดับ ได้ดีที่สุด

2. ผลการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของอาหารเหลวสูตร Mckeen ต่อการเจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 บนเครื่องเขย่า พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วยซูโครส 50.0 กรัมต่อลิตร, $(NH_4)_2HPO_4$ 10.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 1.02 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 1.0 กรัมต่อลิตร, KCl 0.5 กรัมต่อลิตร, โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร (ประกอบด้วย $MnSO_4.4H_2O$ 0.5 กรัม, $CuSO_4.5H_2O$ 0.16 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) พีเอชเริ่มต้นคือ 7.0 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงดังนี้ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่สภาวะนี้เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดี โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสารกำจัดฟอง 2 ชนิดที่ศึกษาคือ silicone ร้อยละ 1.0 และ Polypropylene glycol (PG-2000) ร้อยละ 1.0 พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

3. พบว่าในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เพื่อผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวนั้นสามารถใช้โมลาสร้อยละ 5.0 และน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30.0 แทนซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$ ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ แต่การใช้โมลาสร้อยละ 5.0 และน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30.0 นั้น พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวน้อยกว่าการใช้ซูโครสร้อยละ 5.0 และ $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 1.0 โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสารปฏิปักษ์

ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ร้อยละ 87.9 และ 86.5 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 85.9 และ 87.0 ตามลำดับ สำหรับการใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30.0 แทน $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 1.0 ในอาหารเหลวสูตร Mckeen พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวลดลงเช่นกัน กล่าวคือ เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ร้อยละ 75.6 และ 74.9 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 72.0 และ 75.6 ตามลำดับ

4. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 3 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตร คือ อัตราการให้อากาศ 2.0 VVM และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และหลังชั่วโมงที่ 12 ปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงอย่างรวดเร็ว เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตร สำหรับ *Bacillus* sp. LN 007 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.096 ต่อชั่วโมง และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 100.0 และ 97.9 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. LN 007 ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุดร้อยละ 100 และ 98.5 ตามลำดับ

5. การศึกษาคุณสมบัติของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 พบว่าสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้ในช่วงพีเอช 3-11 โดยมีความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการแสดงฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา คือพีเอช 7.0 และมีความคงตัวสำหรับการเก็บรักษาได้ทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 49 วัน โดยพบว่าเมื่อเก็บสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 49 วัน ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* อยู่ในช่วง 92.5-88.5 และ 92.0-87.8 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. LN 007 มีประสิทธิภาพ

ในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* อยู่ในช่วง 93.5-89.5 และ 92.5-90.0 ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ในช่วง 92.5-89.0 และ 92.0-89.3 ตามลำดับส่วน *Bacillus* sp. LN 007 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* อยู่ในช่วง 93.5-91.0 และ 92.5-90.8 ตามลำดับ

ดังนั้นในการเก็บรักษาสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 49 วันได้โดยที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวของเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ ยังคงมีมากกว่าร้อยละ 80

เอกสารอ้างอิง

กรมเศรษฐกิจการพานิชย์. 2540. สถิติการค้าและเครื่องชี้ภาวะเศรษฐกิจของไทยปี 2539. กระทรวงพานิชย์. กรุงเทพมหานคร.

เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้รา *Chaetomium cupreum* ในการใช้ควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. ว. โรคพืช. 9 (1) : 28-33.

จิรเดช แจ่มสว่าง. 2534. การควบคุมโรคต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์ โดยวิธีคลุกเมล็ดมวลชีวภาพ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29 รายงานผลการวิจัยสาขาพืช ระหว่างวันที่ 4-7 กุมภาพันธ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 257-268.

จิราพร เพชรรัตน์. 2534. การควบคุมแมลงศัตรูพืชและวัชพืชโดยชีววิธี. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร.

ธวัชชัย สิชฌวัฒน์. 2541. อนาคตสารเคมีเกษตรในประเทศไทย. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติ. ว. เคหการเกษตร. 22 (1) : 31-32.

ธีรโชติ มณีโชติ. 2537. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของหัวเชื้อ *Bacillus subtilis.* ปัญหาพิเศษ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, บุญมี วารินสอาด, พิรุณ จันทนกุล และมนูญ เอนกชัย. 2534. การป้องกันการกำจัดโรคข้าวโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis.* ว. วิจัยข้าว. 1 : 42-53.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, บุญมีวารินสอาด และมนูญ เอนกชัย. 2535. การควบคุมโรคข้าวโดยวิธีคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis*. ว. วิชาการเกษตร กษ. 10 : 85-89.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, โสพนา วรฉัตรวิทยา, อุทิศ ดวงสุวรรณ และมนูญ เอนกชัย. 2537. การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวในสภาพไร่โดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ 89-26. ว. วิชาการเกษตร. 12 (2) : 111-115.

บุญชัย แซ่ด่าง. 2535. อิทธิพลของปุ๋ยไนโตรเจน และระยะการปักดำต่อผลผลิตของข้าว (*Oryza sativa*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประไพศรี สมใจ. 2538. การผลิตสารชีวภาพมีฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคพืชจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร.

เปรมปรีย์ ณ. สงขลา. 2537. " การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช." ว. เคหการเกษตร. 18 (12) : 175-183.

พรรณี บุญงามอนงค์. 2540. แนวโน้มตลาดการส่งออกข้าวในอนาคต. ว. เศรษฐกิจการพานิชย์. 28 (265) : 37-47.

มณจันทร์ เมฆธน. 2536. ศักยภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* AP 01 ในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุของโรคพืช. ว. วิทยาศาสตร์ ม.ก. 11 (1) : 9-20.

มานะ กาญจนมณีเสถียร, สุภาพ จันทรัตน์ และสุภาณี ยงค์. 2539. การยับยั้งการงอกของ sclerotium ของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการศึกษาเบื้องต้น โดยใช้วิธีราดดินในการนำส่งเชื้อ *Bacillus subtilis*. ว. สงขลานครินทร์. 18 (2) : 136-144.

สมคิด ดิสถาพร.2532. ชาวนา ปราป โรคข้าว. กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร.

สมคิด ดิสถาพร.2536. โรคไหม้คอรวงข้าวระบาดที่ภาคเหนือ. กสิกร. 66 (2) : 165.167.

สมใจ เอี่ยมพรรัตน์. 2531. ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่แยกได้และผลของสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของบักเตรีที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพมหานคร.

สายสนม เอนกผลิน. 2535. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุชล แก้วพรหม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุชาดา คูชัยสิทธิ์. 2535. การผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Bacillus subtilis*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรัตน์. 2532 ก. การผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในอาหารสัตว์และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นโรคในสัตว์เศรษฐกิจ : การควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยสารอาหารคาร์บอน. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 22 (1) : 1-18.

อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรัตน์. 2532 ข. การผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในอาหารสัตว์และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นโรคในสัตว์เศรษฐกิจ : การควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยสารอาหารไนโตรเจน. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 22 (1) : 66-79.

Aharonowitz, Y. and Demain, A.L. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of Cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 25 : 61-67.

Aharonowitz, Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic synthesis. Ann. Rev. Microbiol. 34 : 209-233.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15th ed. The Association of Official Analytical Chemists. Inc. Verginia. 648 pp.

Asaka, O., Ano, T. and Shoda, M. 1995. Persistance of *Bacillus subtilis* RB 14 and its derivative strains in soil with respect to the *lpa-14* gene. J. Ferment. Bioeng. 81 : 1-6.

Baker, C.J., Stavely, J.R., Thomas, C.A., Sasser, M. and Macfall, J.S. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromnyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. Phytopathol. 73 : 1148-1152.

Baker, C.J., Stavely, J.R. and Mock, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Dis. 69 : 770-772.

Bernheimer, A.W. and Avigad, L.S. 1970. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 61 : 361-369.

Besson, F., Chevanet, C. and Michel, G. 1987. Influence of culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 133 : 767-772.

Besson, F. and Michel, G. 1992. Biosynthesis of iturin and sufactin by *Bacillus subtilis* : evidence for amino acid activating enzymes. 14 : 1013-1018.

Bland, J.M. 1996. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. J. Org. Chem. 61 : 5663-5664.

Boer, A.S. and Diderichsen, B. 1991. On the safty of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* : a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 1-4.

Brana, A.F., Wolfe, S. and Demain, A.L. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 31 : 736-743.

Broadbent, P., Baker, K.F and Waterworth, Y. 1971. Bacteria and actinomyces antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Aust. J. Soil. Sci. 24 : 925-944.

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, K.G.E., Niven, C.F., Rovin, A.W. and Stanier, R.Y. 1974. Bergey's manual of determination bacteriology. 8th ed. Baltimors : Williams and Wilkins.

Byrne, K.M. and Greenstein, M. 1986. Nitrogen repression of gilvocarcin V production in *Streptomyces arenae* 2064. J. Antibiot. 39 : 594-599.

Charigkapakorn, N., Noonim, P., Aneckchai, M. and Warin Sahd, B. 1991. Biological control of bacterial leaf blight and some fungal pathogens of rice in Thailand by

Bacillus subtilis . Thailand J. Agric Sci. 24 : 283-299.

Chevanet, C., Besson, F. and Michel, G. 1986. Effect of various growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis.* Can. J. Microbiol. 32 : 254-258.

Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B. and Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* by continuous remove and metal cation additions. Appl. Environ. Microbiol. 42 : 408-412.

Dobois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28 : 350-356.

Ferreira, J.H.S. Matthee, F.N. and Thomas, A.C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis.* Phytopathol. 81 : 283-287.

Fiddaman, P.J. and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis.* J. Appl. Bacteriol. 74 : 119-126.

Gamliel, A., Kantan, J. and Cohon, E. 1989. Toxicity of choronnitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. Phytoparasitica. 17 : 101-106.

Haavik, H.I. and Thomassen, S. 1973. A bacitracin- negative mutant of *Bacillus licheniformis* which is able to sporulate. J. Gen. Mocrobiol. 76 : 451-454.

Haavik, H.I. 1974a. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : effect of glucose. J. Gen. Microbiol. 81 : 383-390.

Haavik, H.I. 1974b. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : role of catabolite repression and organic acid. J. Gen. Microbiol. 84 : 321-326.

Hanlon, G.W., Hodges, N. A. and Russell, A.D. 1982. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis.* J. Gen. Microbiol. 128 : 845-851.

Harwood, C.R. 1989. Introduction to the Biotechnology of *Bacillus. In* Biotechnology Handbooks. 2nd ed. pp. 1-4, United Kingdom : Newcastle upon tyne press.

Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1980. Suppression of *Pythium utimum*-Induced damping-off of cotton seddings by *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic, pyoluteorin. Phytopathol. 70 : 712-715.

Hu, W.S. and Demain, A.L. 1979. Regulation of antibiotic biosynthesis by utilizable carbon sources. Process Biochem. 14 : 2-6.

Iwai, Y. and Omura, S. 1982. Culture condition for screening of new antibiotics. J. Antibiot. 35 : 123-141.

Kajamura, Y,. Sugiyama, M. and Kaneba, M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* Fr-2. J. Antibiot. 48 : 1095-1103.

Katz, E. and Demain, A.L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus* : chemistry, biogenesis and possible functions. Bacteriol. Rev. 41 : 449-474.

Kleinkauf, H. and Dohren, H.V. 1985. Peptide Antibiotic. *In* Comprehensive Biotechnology in the Principle, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. 3th ed. pp. 95-135, London : Pergamon press.

Kuratsu, Y. and Inuzuka, K. 1983. Control of broth viscosity in colistin fermentation by *Bacillus polymyxa*. J. ferment. Technol. 61 : 581-586.

Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Workman, S., Sigee, D., Epton, H.A.S. and Harbour, A. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. J. Appl. Bacteriol. 78 : 97-108.

Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. 1997. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* stains at thermophilic conditions. JAOCS. 74 : 887-889.

Martin, J.F. and Demain, A.L. 1980. Control of antibiotic synthesis. Microbiol. Rev. 44 : 230-251.

Matsuura, K. 1986. Scanning electron microscopy of the infection process of *Rhizoctonia solani* in leaf sheaths of rice plants. Phytopathol. 76 : 811-814.

Mckeen, C.D., Reilly, C.C. and Pusey, P.L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathol. 76 : 136-139.

Miyoshi, T., Iseki, M., Konomi, T. and Imanaba, H. 1980. Biosynthesis of biocyclomycin. 1. Appearance of aerial mycelia negative strains (am). J. Antibiot. 33 : 480-487.

Nakano, M.M., Mohammed, A.M. and Zuber, P. 1988. Indentification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 170 : 5662-5668.

Nandi, P. and Sen, G.P. 1953. An antifungul substances from a strain of *Bacillus subtilis*. Nature. 172 : 871-872.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1992a. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. Biotechnol. Lett. 14 : 817-822.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1992b. Production of lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Lett. 14 : 1165-1168.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1995a. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. Biotechnol. Bioeng. 47 : 209-214.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1995b. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB 14, in solid-state fermentament. J. Ferment. Bioeng. 80 : 517-519.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1996. Use of soybean curd residue, Okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, Iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. Process Biochem. 8 : 801-806.

Okamura, K., Kaki, A., Mutoh, Y., Snimauchi, Y. and Ishikura, T. 1977. Fermentative production of deltamycin and deacyltamycin. J. Ferment. Technol. 55: 347-355.

Ou, S.H. 1973. A hand book of rice disease in the tropics. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.

Oyama, M. and Kubota, K. 1993. Induction of antibiotic production by protease in *Bacillus brevis* (ATCC 8185). J. Biochem. 113 : 637-641.

Phae, C.G. and Shoda, M. and Kubota, H. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and it's production on phytophathogenic microorganism. J. Ferment. Bioeng. 69 : 1-7.

Phae, C.G. and Shoda, M. 1991. Investigation of optimal condition for foam separation of iturin and antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. J. Ferment. Bioeng. 71 : 118-121.

Podile, A.R., Prasad, G.S.and Dube, H.C. 1987. Partial characterization of antagonistic principle of *Bacillus subtilis* AF 1. J. Biological control. 1 : 60-65.

Pusey, P.L. and Wilson, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 68 : 753-756.

Pusey, P.L., Hotchkiss, M.W., Dulmage, H.T., Baumgardner, R.A., Zehr, E.I., Reilly, C.C. and Wilson C.L. 1988. Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. Plant Dis. 72 : 622-626.

Pusey, P.L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. Pestic. Sci. 27 : 133-140.

Rytter, J.L., Lukezic, F.L., Craig, R. and Moorman, G.W. 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. Phytopathol. 79 : 367-370.

Sandrin, C., Peypoux, F. and Michel, G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Appl. Biochem. 12 : 370-375.

Sen, R. and Swaminathan, T. 1997. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47 : 358-363.

Sumino, Y., Sonoi, K. and Doi, M. 1993. Scale-up of purine nucleoside fermentation from a shaking flask to a stirred-tank fermentor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 : 581-585.

Suphantharika, M., Ison, A.P., Lilly, M.D. and Buckland, B.C. 1994. The influence of dissolved oxygen tension on the synthesis of the antibiotic difficidin by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Bioeng. 44 : 1007-1012.

Tuffile, C.M. and Pinto, F. 1970. Determination of oxygen transfer coefficients in viscous streptomycetes fermentation. Biotechnol. Bioen. 12 : 849-871.

Weinberg, E.D. 1973. Secondary metabolism : Control by temperature and inorganic phosphate. Dev. Ind. Microbiol. 15 : 70-81.

ภาคผนวก ก

1. Potato Dextrose Agar (PDA) ประกอบด้วย

potato	200.0	กรัม
dextrose	20.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
pH	7.0	

วิธีการ

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรสและผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16x150 มม. หลอดละ 5 มม. ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งตัวให้นำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวพอดี)

2. Nutrient agar (NA) ประกอบด้วย

peptone	5.0	กรัม
beef extract	3.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
distilled water	1000	มล.
pH	7.0	

ละลายส่วนประกอบข้างต้น (ยกเว้น agar) ในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วย 0.1 N NaOH และ 0.1 N HCl จึงใส่วุ้นลงไป หลอมให้ละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient broth (NB) ประกอบด้วย

peptone	5.0	กรัม
beef extract	3.0	กรัม
distilled water	1000	มล.
pH	7.0	

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วย 0.1 N NaOH และ 0.1 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Glucose Asparagine Mineral Salts Medium (GAM) ประกอบด้วย

glucose	25.0	กรัม
L-asparagine	3.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
K_2SO_4	6.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
distilled water	1000	มล.
pH	7.0	

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด (ยกเว้น glucose) ในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วย 0.1 N NaOH และ 0.1 N HCl แล้วใส่อาหารเหลวนี้ 90 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เตรียมสารละลาย glucose 25 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. หรือ 37.5 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติม 10 มล.ลงในฟลาสก์อาหารเหลวที่เตรียมไว้ จะได้อาหารเหลว Glucose-Asparagine mineral salts Medium ที่มีส่วนผสมตามต้องการ

5. No.3 Medium ประกอบด้วย

glucose	10	กรัม
polypeptone	10	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
distilled water	1000	มล.
pH	7.0	

6. Mckeen ประกอบด้วย

glucose	20.0	กรัม
DL-glutamic acid	5.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.02	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
distilled water	1000	มล.
trace elements	1.0	มล/ล ซึ่งประกอบด้วย
$MnSO_4.4H_2O$	0.5	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.16	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.015	กรัม
distilled water	100	มล.

ปรับพีเอช ให้ได้ 6.0-6.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Glucose Meat Extract Peptone Medium (GMP) ประกอบด้วย

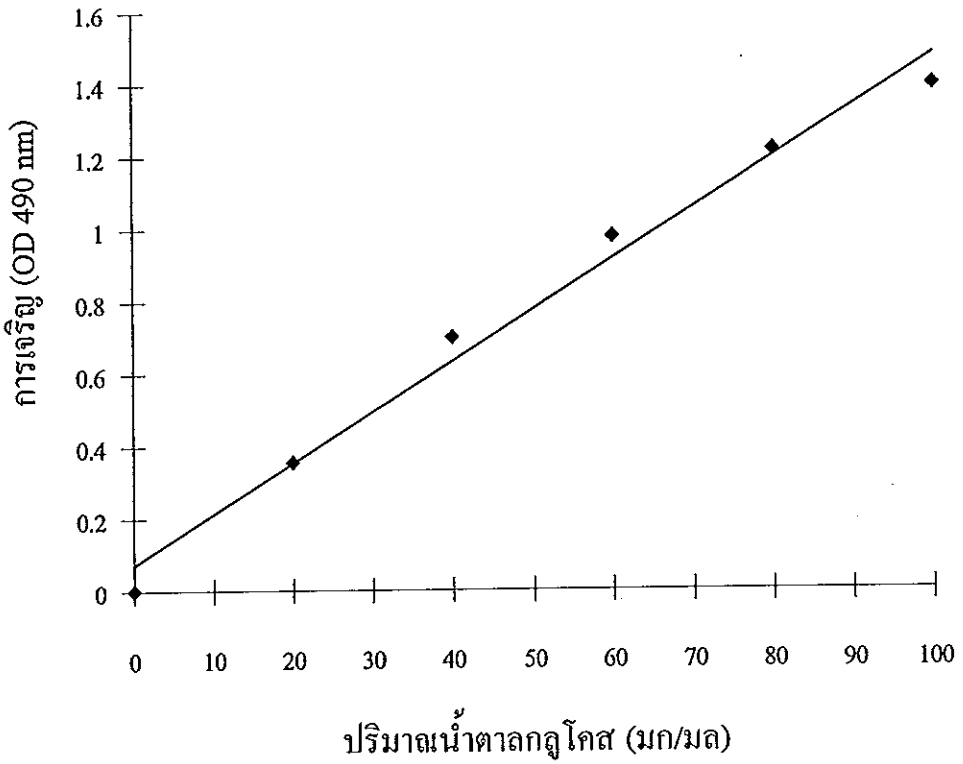
glucose	15.0	กรัม
peptone	6.0	กรัม
meat extract	3.0	กรัม
yeast extract	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม

$MgSO_4.7H_2O$	0.25	กรัม
distilled water	1000	มล.
pH	7.0	

ละลายส่วนประกอบต่างๆในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วย 0.1 N NaOH และ 0.1 N HCl ใส่วุ้นลงไปและหลอมให้ละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐาน



กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายกลูโคสมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ชนิดของสูตรอาหาร (% การยับยั้ง)			
	Mckeen	GMP	GAM	No. 3 medium
0	18.9^{e}	20.5^{c}	21.2^{d}	16.4^{e}
12	70.8^{d}	62.8^{b}	34.5^{c}	42.1^{d}
24	80.7^{c}	63.4^{b}	61.2^{b}	62.1^{c}
36	90.2^{b}	63.9^{b}	62.5^{b}	86.2^{b}
48*	92.5^{aA}	70.2^{aC}	65.2^{aD}	88.7^{aB}

หมายเหตุ ในสดมส์เดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

* อักษรตัวใหญ่ในแถวเดียวกันที่เหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ชนิดของสูตรอาหาร(% การยับยั้ง)			
	Mckeen	GMP	GAM	No. 3 medium
0	18.9^{d}	15.4^{e}	18.7^{e}	16.7^{e}
12	82.9^{c}	30.9^{d}	21.8^{d}	63.5^{d}
24	88.9^{b}	45.8^{c}	42.5^{c}	65.5^{c}
36	90.6^{b}	48.9^{b}	45.9^{b}	67.9^{b}
48*	92.8^{aA}	55.2^{aC}	55.0^{aD}	70.0^{aB}

หมายเหตุ ในสดมส์เดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

* อักษรตัวใหญ่ในแถวเดียวกันที่เหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ชนิดของสูตรอาหาร (% การยับยั้ง)			
	Mckeen	GMP	GAM	No. 3 medium
0	15.0^{d}	13.2^{d}	14.5^{d}	14.9^{d}
12	77.2^{c}	65.9^{a}	60.3^{a}	78.1^{c}
24	84.6^{b}	64.1^{b}	55.9^{b}	80.0^{b}
36	90.0^{a}	63.5^{b}	55.9^{b}	85.6^{a}
48*	91.5^{aA}	60.8^{cC}	53.9^{cD}	86.7^{aB}

หมายเหตุ ในสดมส์เดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

* อักษรตัวใหญ่ในแถวเดียวกันที่เหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ชนิดของสูตรอาหาร (% การยับยั้ง)			
	Mckeen	GMP	GAM	No. 3 medium
0	13.9^{e}	17.8^{e}	14.6^{e}	11.4^{d}
12	45.3^{d}	21.2^{d}	22.8^{d}	51.8^{c}
24	70.4^{c}	35.9^{c}	41.5^{c}	60.7^{a}
36	80.1^{b}	49.1^{b}	45.1^{b}	56.9^{b}
48*	92.0^{aA}	50.9^{aD}	55.8^{aC}	60.0^{aB}

หมายเหตุ ในสดมส์เดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

* อักษรตัวใหญ่ในแถวเดียวกันที่เหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS89-24

เวลา (ชม.)	แหล่งคาร์บอน (% การยับยั้ง)			
	ซูโครส	กลูโคส	แลคโตส	โมลาส
0	11.3	15.4	14.3	14.3
12	55.0	67.9	22.5	61.3
24	81.8	75.1	35.5	64.9
36	91.5	88.8	40.2	65.0
48	92.6[a]	90.0[b]	44.6[d]	70.0[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	แหล่งคาร์บอน (% การยับยั้ง)			
	ซูโครส	กลูโคส	แลคโตส	โมลาส
0	19.9	17.9	17.9	15.4
12	70.1	76.9	25.5	76.1
24	87.8	87.8	32.1	77.5
36	91.8	89.7	50.8	80.5
48	93.0[a]	90.5[b]	65.5[d]	82.5[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	แหล่งคาร์บอน (% การยับยั้ง)			
	ซูโครส	กลูโคส	แลคโตส	โมลาส
0	16.8	16.9	10.5	10.5
12	38.9	55.3	30.5	66.7
24	70.2	72.5	45.7	68.9
36	91.0	89.3	47.8	73.5
48	93.2[a]	90.7[b]	56.4[d]	75.1[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	แหล่งคาร์บอน (% การยับยั้ง)			
	ซูโครส	กลูโคส	แลคโตส	โมลาส
0	17.8	18.9	10.8	17.5
12	70.5	56.8	40.2	50.2
24	76.5	72.4	42.1	64.8
36	85.4	81.9	50.3	70.9
48	92.4[a]	90.7[b]	57.9[d]	76.1[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลของซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของซูโครส (% การยับยั้ง)			
	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%
0	10.0	12.1	15.8	18.9
12	20.6	56.8	60.5	70.2
24	45.6	70.3	78.5	85.6
36	51.2	80.1	89.3	92.8
48	60.5[d]	82.3[c]	91.5[b]	95.4[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลของซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของซูโครส (% การยับยั้ง)			
	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%
0	14.7	19.2	20.2	25.3
12	55.8	72.5	76.5	80.6
24	68.9	74.8	80.4	85.7
36	70.5	79.1	85.9	94.8
48	74.9[d]	80.5[c]	90.9[b]	96.4[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลของซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของซูโครส (% การยับยั้ง)			
	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%
0	10.5	15.6	18.4	18.4
12	20.6	40.8	49.1	52.6
24	32.1	55.6	69.7	79.4
36	56.8	64.1	89.6	91.6
48	58.1[d]	67.9[c]	91.0[b]	97.3[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลของซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

	ความเข้มข้นของซูโครส (% การยับยั้ง)			
เวลา (ชม.)	0.5	1.0	2.0	5.0
0	15.6	14.5	17.8	15.8
12	55.1	60.2	72.1	75.9
24	56.3	68.9	80.2.	85.9
36	58.7	71.2	85.9	91.2
48	60.3[d]	78.9[c]	91.6[b]	96.1[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 13 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	แหล่งไนโตรเจน (% การยับยั้ง)				
	กลูตามิก	ยูเรีย	$(NH_4)_2HPO_4$	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4NO_3
0	15.3	14.6	13.8	18.9	16.7
12	55.1	55.5	58.3	50.7	28.7
24	72.3	69.1	81.6	61.5	40.6
36	90.5	70.1	92.7	68.9	55.6
48	92.0[b]	76.1[c]	94.0[a]	70.2[d]	65.9[e]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 14 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	แหล่งไนโตรเจน (% การยับยั้ง)				
	กลูตามิก	ยูเรีย	$(NH_4)_2HPO_4$	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4NO_3
0	18.9	20.1	20.4	15.2	18.9
12	70.1	50.6	56.6	33.4	41.5
24	82.1	60.5	78.9	45.6	45.6
36	90.3	69.9	88.2	58.6	60.3
48	92.4^{b}	79.5^{c}	96.0^{a}	69.9^{d}	66.8^{e}

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 15 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	แหล่งไนโตรเจน (% การยับยั้ง)				
	กลูตามิก	ยูเรีย	$(NH_4)_2HPO_4$	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4NO_3
0	10.1	17.4	19.5	19.6	18.7
12	50.9	65.0	76.1	58.4	42.9
24	75.6	71.5	90.2	65.0	78.9
36	89.7	73.9	92.6	66.6	84.6
48	91.9^{a}	76.1^{c}	93.4^{a}	76.1^{c}	88.9^{b}

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 16 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	แหล่งไนโตรเจน (% การยับยั้ง)				
	กลูตามิก	ยูเรีย	$(NH_4)_2HPO_4$	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4NO_3
0	13.9	12.3	14.9	11.5	14.3
12	74.3	70.2	78.9	50.9	50.2
24	84.6	73.2	91.5	68.7	84.3
36	90.1	75.8	92.7	70.1	88.9
48	92.0^{b}	78.9^{c}	94.0^{a}	74.3^{d}	90.8^{b}

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 17 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2HPO_4$ (% การยับยั้ง)		
	0.2%	0.5%	1.0%
0	15.3	14.5	12.9
12	30.2	60.5	60.9
24	41.2	77.3	80.9
36	60.9	92.8	95.8
48	72.8^{c}	94.6^{b}	97.6^{a}

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 18 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2HPO_4$ (% การยับยั้ง)		
	0.2%	0.5%	1.0%
0	14.5	16.7	16.1
12	31.8	50.9	60.4
24	44.2	77.6	80.5
36	65.5	90.2	93.8
48	72.0^{c}	93.5^{b}	95.9^{a}

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 19 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus sp.* LN 007

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2HPO_4$ (% การยับยั้ง)		
	0.2%	0.5%	1.0%
0	14.9	15.5	18.5
12	40.5	70.1	72.5
24	65.1	88.2	85.3
36	70.2	90.6	93.6
48	73.0^{c}	92.0^{b}	96.1^{a}

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 20 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2HPO_4$ (% การยับยั้ง)		
	0.2%	0.5%	1.0%
0	10.7	14.4	19.5
12	61.2	70.9	79.1
24	65.3	85.6	89.6
36	67.9	89.2	91.5
48	71.2[c]	90.1[b]	97.1[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 21 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (% การยับยั้ง)	ไม่เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (% การยับยั้ง)
0	20.1	19.4
12	57.2	50.9
24	81.0	61.5
36	90.5	75.9
48	93.5[a]	77.1[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 22 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (% การยับยั้ง)	ไม่เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (% การยับยั้ง)
0	18.2	16.5
12	55.4	50.0
24	65.8	58.9
36	76.4	65.3
48	92.3[a]	70.1[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 23 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (% การยับยั้ง)	ไม่เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (% การยับยั้ง)
0	14.1	14.2
12	70.2	57.2
24	87.6	73.6
36	90.8	75.9
48	95.1[a]	77.0[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 24 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (% การยับยั้ง)	ไม่เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (% การยับยั้ง)
0	17.1	14.9
12	60.5	42.6
24	72.8	51.5
36	88.9	56.9
48	94.1[a]	66.9[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 25 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	พีเอชเริ่มต้น (% การยับยั้ง)			
	5	6	7	8
0	15.0	19.9	21.2	18.8
12	55.8	64.5	70.4	56.9
24	66.9	80.2	85.3	70.5
36	70.0	91.1	92.8	81.2
48	80.0[d]	92.9[b]	95.4[a]	82.6[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 26 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	พีเอชเริ่มต้น (% การยับยั้ง)			
	5	6	7	8
0	18.9	20.3	21.5	19.8
12	64.0	74.6	69.1	64.0
24	76.2	88.0	92.3	81.0
36	80.1	91.3	95.6	85.2
48	85.6[c]	93.5[b]	98.5[a]	86.9[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 27 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	พีเอชเริ่มต้น (% การยับยั้ง)			
	5	6	7	8
0	15.5	11.3	14.9	12.9
12	58.5	62.5	58.5	44.2
24	62.5	81.9	77.8	64.0
36	69.4	85.6	87.4	76.1
48	73.1[d]	88.5[b]	95.0[a]	80.9[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 28 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	พีเอชเริ่มต้น (% การยับยั้ง)			
	5	6	7	8
0	11.5	19.6	18.1	12.6
12	74.5	70.4	83.6	87.3
24	74.5	87.9	85.4	88.3
36	76.8	91.5	92.3	89.5
48	80.0[d]	93.1[b]	98.7[a]	90.2[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	อุณหภูมิ (% การยับยั้ง)	
	30°C	35°C
0	15.9	18.6
12	61.3	71.5
24	77.9	85.6
36	85.6	92.1
48	88.4[b]	95.6[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 30 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	อุณหภูมิ (% การยับยั้ง)	
	30°C	35°C
0	14.3	17.2
12	64.3	77.2
24	85.7	90.4
36	87.6	94.6
48	90.2[b]	96.3[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 31 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ผลของอุณหภูมิ (% การยับยั้ง)	
	30°C	35°C
0	16.0	16.2
12	46.2	61.3
24	84.7	90.3
36	90.5	95.5
48	91.1[b]	96.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 32 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ผลของอุณหภูมิ(% การยับยั้ง)	
	30°C	35°C
0	13.1	14.4
12	70.9	77.5
24	92.9	87.9
36	91.6	93.8
48	93.5[b]	96.5[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 33 ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ปริมาตรของอาหาร (% การยับยั้ง)		
	50 มล.	100 มล.	150 มล.
0	18.9	23.8	20.2
12	30.5	50.5	35.8
24	42.9	80.5	50.9
36	60.5	88.7	62.5
48	68.1[c]	94.5[a]	75.5[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 34 ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ปริมาตรของอาหาร (% การยับยั้ง)		
	50 มล.	100 มล.	150 มล.
0	20.2	25.2	24.5
12	42.9	70.5	50.1
24	50.5	88.9	69.1
36	62.1	90.6	81.6
48	75.5[c]	95.7[a]	82.9[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 35 ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ปริมาตรของอาหาร (% การยับยั้ง)		
	50 มล.	100 มล.	150 มล.
0	16.2	16.2	16.0
12	67.6	70.9	55.5
24	80.2	91.0	80.2
36	84.0	95.7	90.3
48	87.4[c]	98.5[a]	91.5[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 36 ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ปริมาตรของอาหาร (% การยับยั้ง)		
	50 มล.	100 มล.	150 มล.
0	19.9	19.9	19.9
12	82.8	77.5	70.9
24	89.1	90.0	87.9
36	90.1	93.8	91.9
48	91.2[b]	96.2[a]	92.3[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 37 ผลของ silicone ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	Silicone (% การยับยั้ง)		
	1.5%	3.0%	5.0%
0	15.2	18.9	20.1
12	32.9	36.4	35.9
24	70.1	78.9	72.3
36	92.7	95.1	93.1
48	94.8[b]	95.0[b]	94.1[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 38 ผลของ silicone ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	Silicone (% การยับยั้ง)		
	1.5%	3.0%	5.0%
0	18.9	17.3	20.1
12	60.6	66.0	62.0
24	83.0	88.2	83.4
36	90.4	93.0	91.5
48	93.0[b]	94.0[b]	93.3[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 39 ผลของ silicone ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	Silicone (% การยับยั้ง)		
	1.5%	3.0%	5.0%
0	14.6	12.7	15.9
12	70.5	68.4	67.8
24	89.7	90.6	86.9
36	90.5	92.1	94.6
48	94.6[b]	94.8[b]	95.0[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 40 ผลของ silicone ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	Silicone (% การยับยั้ง)		
	1.5%	3.0%	5.0%
0	12.9	19.1	17.8
12	66.0	64.3	66.0
24	90.8	87.9	85.6
36	91.3	89.7	90.7
48	93.1[b]	91.8[b]	92.6[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 41 ผลของ PG-2000 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	PG-2000 (% การยับยั้ง)		
	1.5%	3.0%	5.0%
0	17.9	18.3	16.7
12	53.5	65.1	60.7
24	84.0	87.9	85.9
36	93.8	95.9	94.1
48	94.8[b]	95.0[b]	95.5[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 42 ผลของ PG-2000 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	PG-2000 (% การยับยั้ง)		
	1.5%	3.0%	5.0%
0	17.9	18.2	15.3
12	68.9	70.2	69.8
24	87.6	90.9	89.1
36	92.4	94.3	93.1
48	93.1[b]	93.5[b]	93.4[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 43 ผลของ PG-2000 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	PG-2000 (% การยับยั้ง)		
	1.5%	3.0%	5.0%
0	15.6	12.8	14.6
12	76.1	73.6	79.8
24	89.7	87.4	85.6
36	92.5	90.9	93.7
48	93.4[b]	92.0[b]	94.3[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 44 ผลของ PG-2000 ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	PG-2000 (% การยับยั้ง)		
	1.5%	3.0%	5.0%
0	16.6	18.9	17.9
12	75.6	80.2	77.7
24	84.2	83.8	86.4
36	87.4	87.9	87.4
48	92.0[b]	91.3[b]	93.7[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 45 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของโมลาส (% การยับยั้ง)			ซูโครส 5.0% (% การยับยั้ง)
	1.0%	2.0%	5.0%	
0	15.9	16.5	17.0	18.9
12	45.6	51.9	66.7	70.2
24	45.9	68.3	73.2	85.6
36	50.1	70.2	85.9	92.8
48	60.9[d]	72.8[c]	87.9[b]	95.4[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 46 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของโมลาส (% การยับยั้ง)			ซูโครส 5.0% (% การยับยั้ง)
	1.0%	2.0%	5.0%	
0	18.2	17.9	18.3	15.2
12	61.9	65.2	66.9	80.6
24	70.4	77.5	85.5	85.7
36	73.6	79.6	86.5	94.8
48	75.9[d]	80.0[c]	86.5[b]	96.4[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 47 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของโมลาส (% การยับยั้ง)			ซูโครส 5.0% (% การยับยั้ง)
	1.0%	2.0%	5.0%	
0	15.9	18.1	19.1	18.4
12	36.9	41.2	55.6	52.6
24	45.6	62.7	72.9	79.4
36	55.9	70.1	80.3	91.6
48	60.8[d]	72.0[c]	85.9[b]	97.3[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 48 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของโมลาส (% การยับยั้ง)			ซูโครส 5.0% (% การยับยั้ง)
	1.0%	2.0%	5.0%	
0	15.6	17.3	18.1	15.8
12	50.1	61.3	73.5	75.9
24	55.9	70.3	82.6	85.9
36	66.1	75.8	84.9	91.2
48	69.0[d]	80.4[c]	87.0[b]	96.1[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 49 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ (% การยับยั้ง)			$(NH_4)_2HPO_4$ 1.0% (% การยับยั้ง)
	10%	20%	30%	
0	15.6	14.6	17.6	13.8
12	28.9	31.2	44.5	58.3
24	31.9	42.5	65.9	81.6
36	41.2	45.6	70.2	91.0
48	45.9[d]	55.6[c]	75.6[b]	93.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 50 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ (% การยับยั้ง)			$(NH_4)_2HPO_4$ 1.0% (% การยับยั้ง)
	10%	20%	30%	
0	13.6	17.9	14.6	20.4
12	25.8	29.5	55.6	57.8
24	36.5	38.6	64.9	82.5
36	46.9	58.9	70.1	88.2
48	49.8[d]	61.5[c]	74.9[b]	94.5[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 51 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ (% การยับยั้ง)			$(NH_4)_2HPO_4$ 1.0% (% การยับยั้ง)
	10%	20%	30%	
0	12.4	14.6	16.3	18.5
12	25.3	25.0	29.6	72.5
24	31.2	44.6	59.9	85.3
36	35.9	50.3	63.9	93.6
48	41.3[d]	54.9[c]	72.0[b]	96.1[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 52 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ (% การยับยั้ง)			$(NH_4)_2HPO_4$ 1.0% (% การยับยั้ง)
	10%	20%	30%	
0	15.9	15.3	14.6	19.5
12	22.8	32.6	40.3	79.1
24	33.0	39.0	55.9	89.6
36	44.6	48.9	67.9	91.5
48	46.9^{d}	60.8^{c}	75.6^{b}	97.1^{a}

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 53 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ควบคุมพีเอช (% การยับยั้ง)	ไม่ควบคุมพีเอช (% การยับยั้ง)
0	10.9	7.8
12	20.9	22.2
24	43.0	64.5
36	80.3	98.2
48	94.1[b]	97.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 54 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	ควบคุมพีเอช (% การยับยั้ง)	ไม่ควบคุมพีเอช (% การยับยั้ง)
0	15.9	16.3
12	32.9	20.1
24	59.3	71.7
36	67.0	94.5
48	95.0[b]	99.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 55 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ควบคุมพีเอช (% การยับยั้ง)	ไม่ควบคุมพีเอช (% การยับยั้ง)
0	14.3	15.6
12	56.1	50.3
24	80.0	98.2
36	97.0	99.0
48	97.5[b]	100.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 56 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	ควบคุมพีเอช (% การยับยั้ง)	ไม่ควบคุมพีเอช (% การยับยั้ง)
0	13.7	15.2
12	39.7	47.6
24	73.7	88.7
36	94.6	99.2
48	98.1[b]	100.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 57 ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

	อัตราการกวน (% การยับยั้ง)		
เวลา (ชม.)	200 rpm	300 rpm	500 rpm
0	6.2	7.8	8.6
12	39.2	22.2	37.5
24	57.4	64.5	84.1
36	80.1	98.2	85.5
48	95.8[b]	99.8[a]	86.0[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 58 ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	อัตราการกวน (% การยับยั้ง)		
	200 rpm	300 rpm	500 rpm
0	12.5	16.9	14.9
12	60.9	70.5	65.9
24	69.9	89.5	89.5
36	85.3	100.0	92.5
48	95.1[b]	100.0[a]	93.2[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 59 ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

	อัตราการกวน (% การยับยั้ง)		
เวลา (ชม.)	200 rpm	300 rpm	500 rpm
0	19.0	10.4	10.4
12	55.5	51.1	86.1
24	63.3	90.8	92.2
36	87.5	100.0	92.7
48	97.9[b]	100.0[a]	93.4[c]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 60 ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

เวลา (ชม.)	อัตราการกวน (% การยับยั้ง)		
	200 rpm	300 rpm	500 rpm
0	5.0	5.1	4.7
12	62.5	64.3	83.8
24	75.5	85.4	88.6
36	83.4	96.3	91.6
48	92.7[b]	99.6[a]	92.2[b]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 61 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	อัตราการให้อากาศ (% การยับยั้ง)	
	1.0 VVM	2.0 VVM
0	7.8	5.8
12	22.2	42.9
24	64.5	99.0
36	97.8	100.0
48	98.1[b]	100.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 62 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24

เวลา (ชม.)	อัตราการให้อากาศ (% การยับยั้ง)	
	1.0 VVM	2.0 VVM
0	16.9	15.8
12	70.5	75.4
24	93.2	97.8
36	95.1	100.0
48	97.9[b]	100.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 63 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* sp. LN 007

	อัตราการให้อากาศ (% การยับยั้ง)	
เวลา (ชม.)	1.0 VVM	2.0 VVM
0	10.4	12.5
12	51.1	51.0
24	90.8	98.0
36	96.8	100.0
48	97.0[b]	100.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 64 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ *Bacillus* sp. LN 007

	อัตราการให้อากาศ (% การยับยั้ง)	
เวลา (ชม.)	1.0 VVM	2.0 VVM
0	4.5	7.8
12	64.0	71.5
24	85.2	95.8
36	94.5	100.0
48	96.8[b]	100.0[a]

หมายเหตุ ในแถวเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววาสนา มู่สา

วัน เดือน ปี เกิด 11 เมษายน 2512

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2534