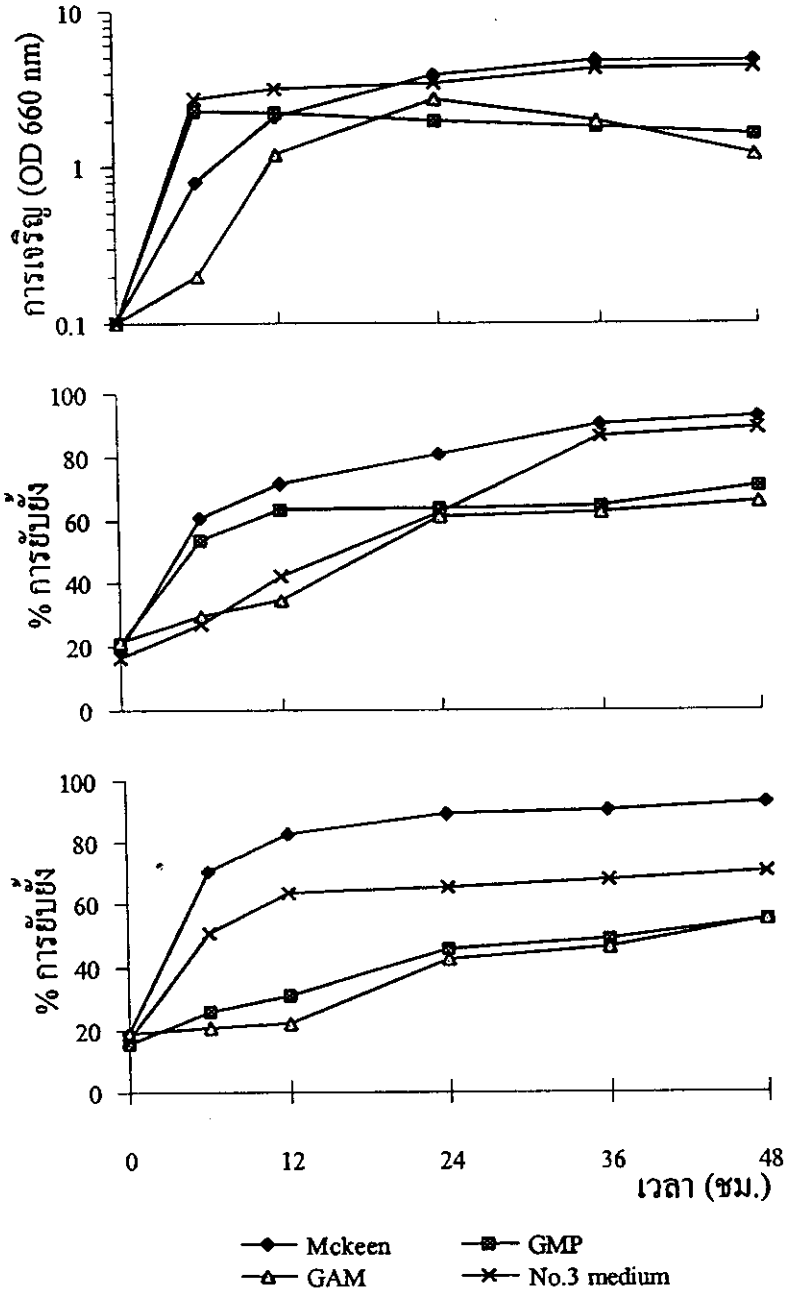
ผลและวิจารณ์

ก. การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก *Bacillus* spp. 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 ตามลำดับโดยเชื้อเริ่มเจริญได้ดีในช่วงชั่วโมงที่ 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*



ภาพที่ 4 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* NSRS 89-24

สาเหตุโรคราสนิมในถั่วและพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในอาหารเหลว Eugon ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Puccinia pelargonii-zonalis* จะมีมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth เช่นเดียวกับ Iwai และ Omura (1982) ที่กล่าวว่าการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวนั้นขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ 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* NB 22 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 สูตรก็ให้ผลเช่นเดียวกับ *B. subtilis* NSRS 89-24 ผลแสดงดังภาพที่ 5 โดยพบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Mckeen สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 91.5 และ 92 ตามลำดับ ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการ

ผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวจาก *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

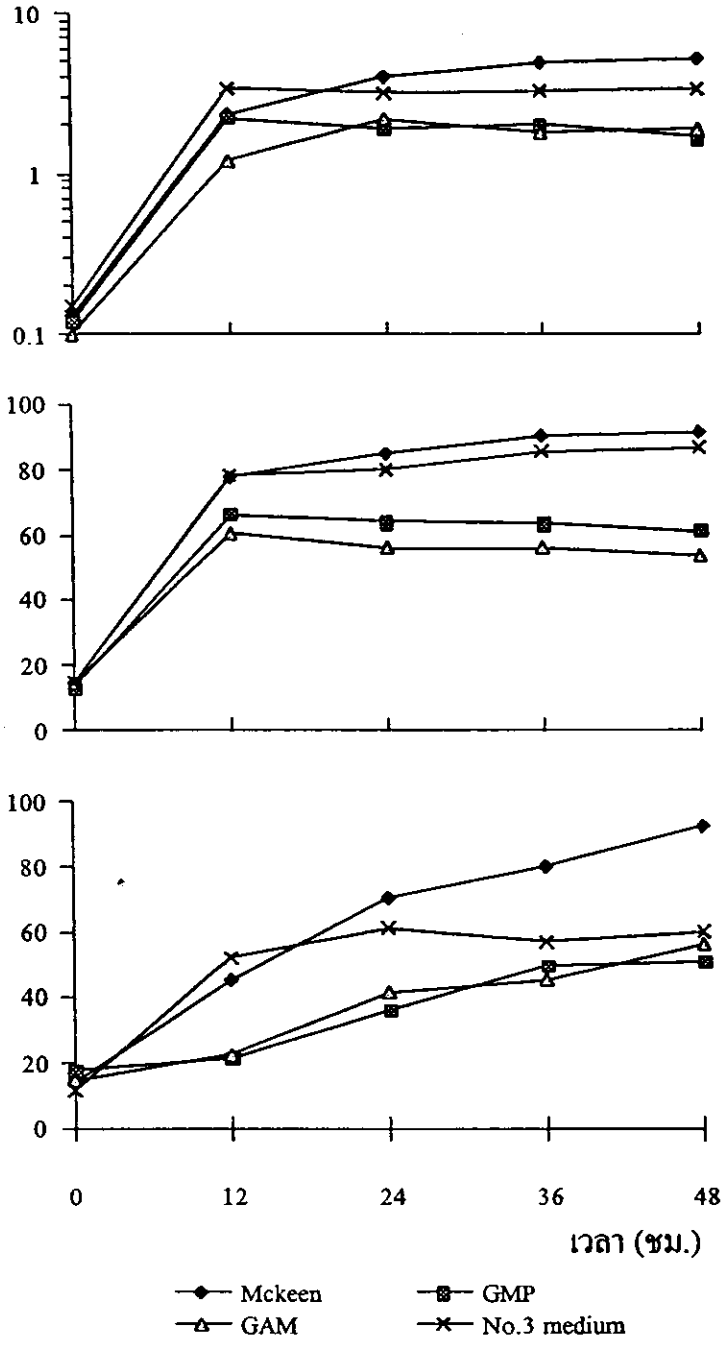
จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรต่างๆพบว่าอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 คือ อาหารเหลวสูตร Mckeen จึงศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

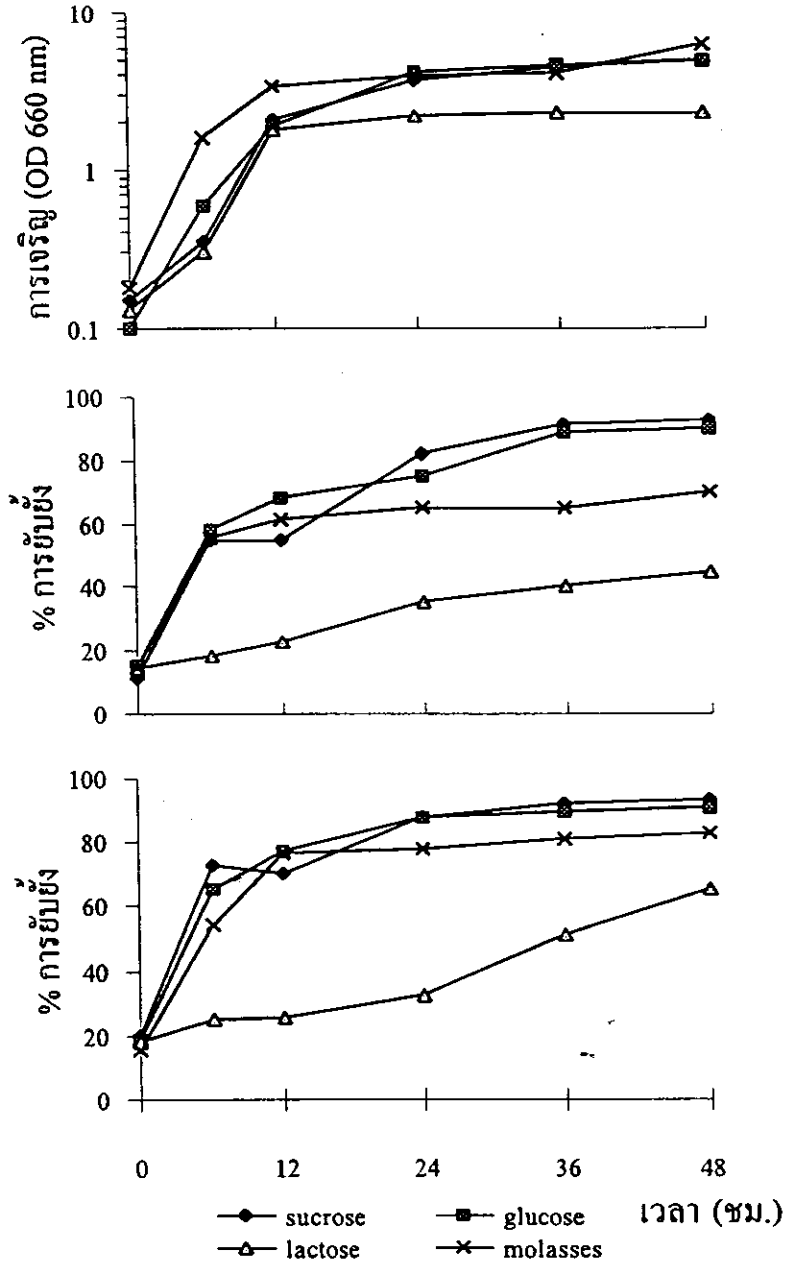
ในการศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen ที่เปลี่ยนแปลงชนิดของน้ำตาลจากกลูโคสเป็นซูโครส แลคโตส และโมลาส ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 6) และ *Bacillus* 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 หรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้

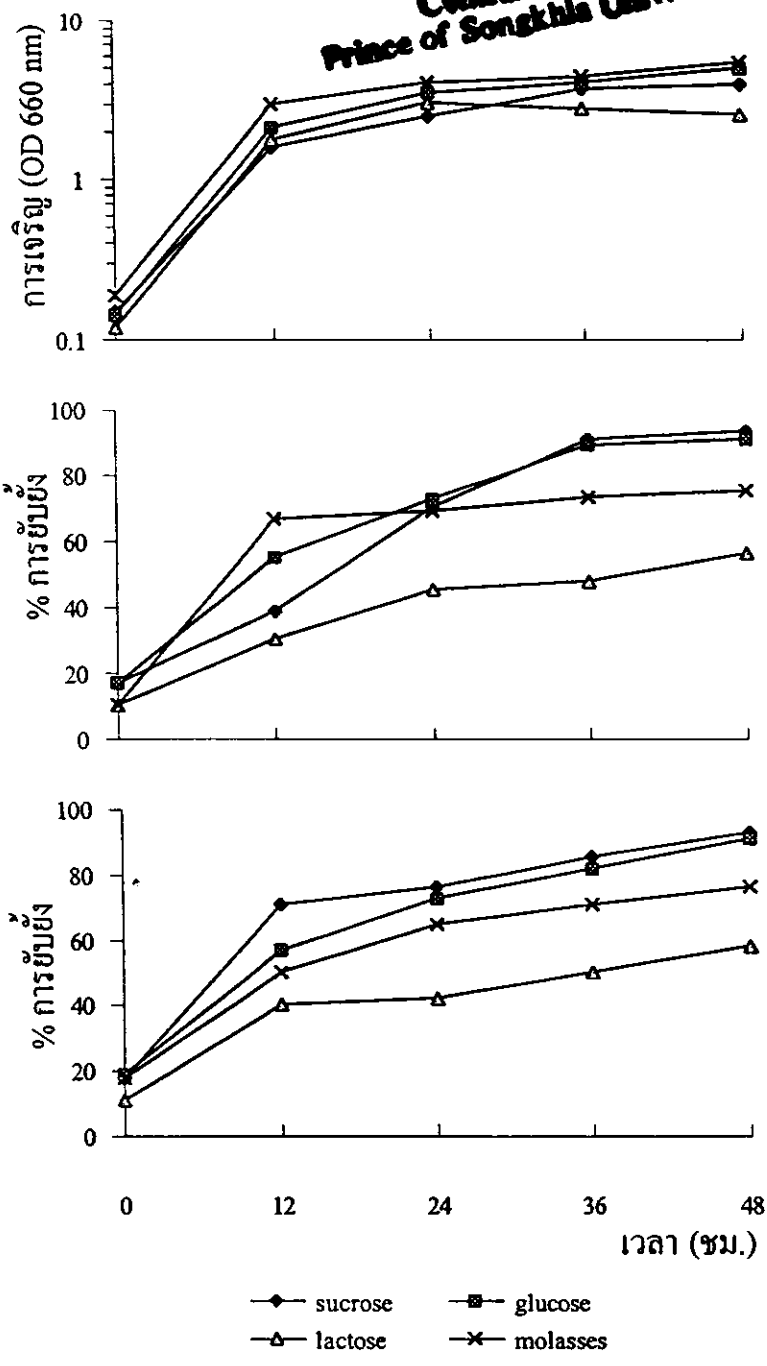


ภาพที่ 5 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 6 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24

Central Library
Prince of Songkhla Univ...



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

ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วจึงทำการศึกษาถึงปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *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 สามารถยับยั้งเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ร้อยละ 95.4และ 96.5 ตามลำดับ ส่วนสารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 97.3 และ 96.1 ตามลำดับ

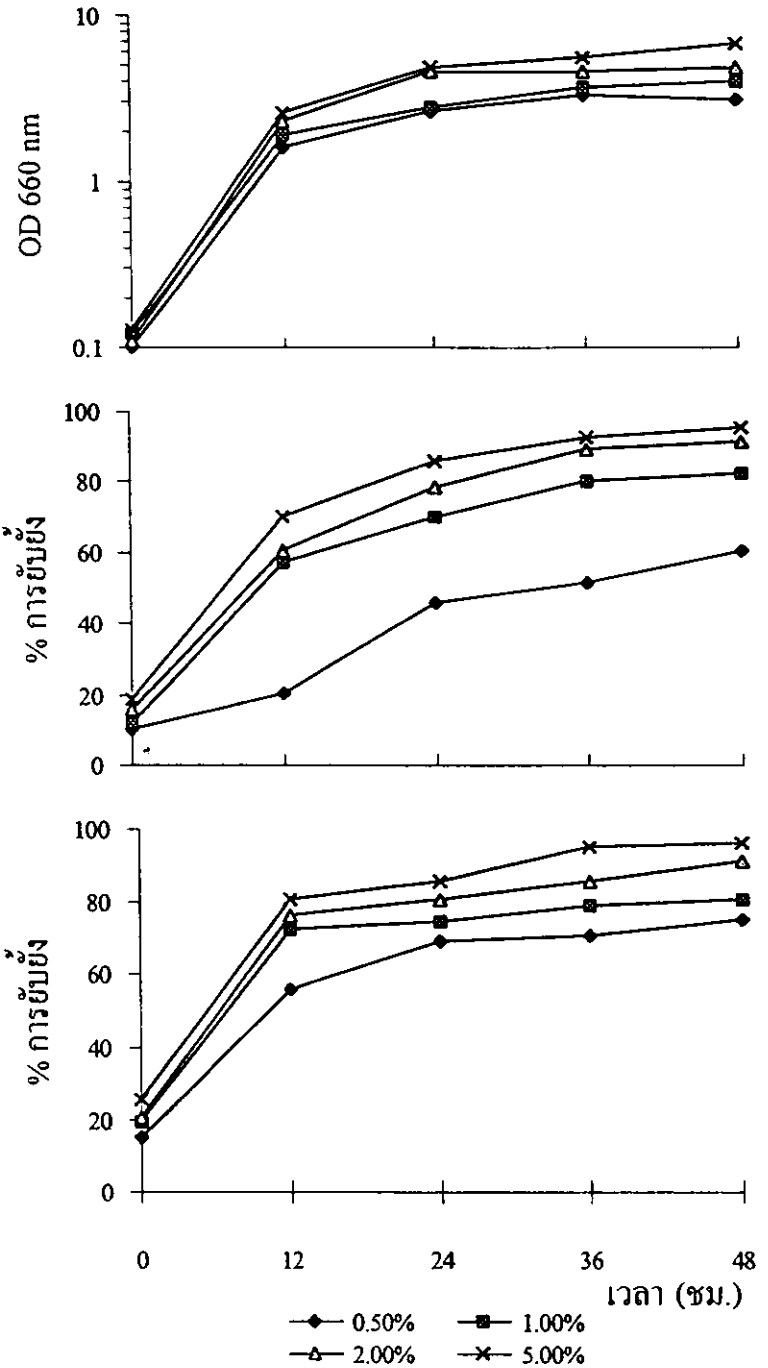
จากการทดลองสรุปว่า ในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen นั้นจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5.0 เพราะว่าสารที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ดีที่สุด ซึ่งจะเห็นว่าระดับความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้นั้นค่อนข้างสูง

2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

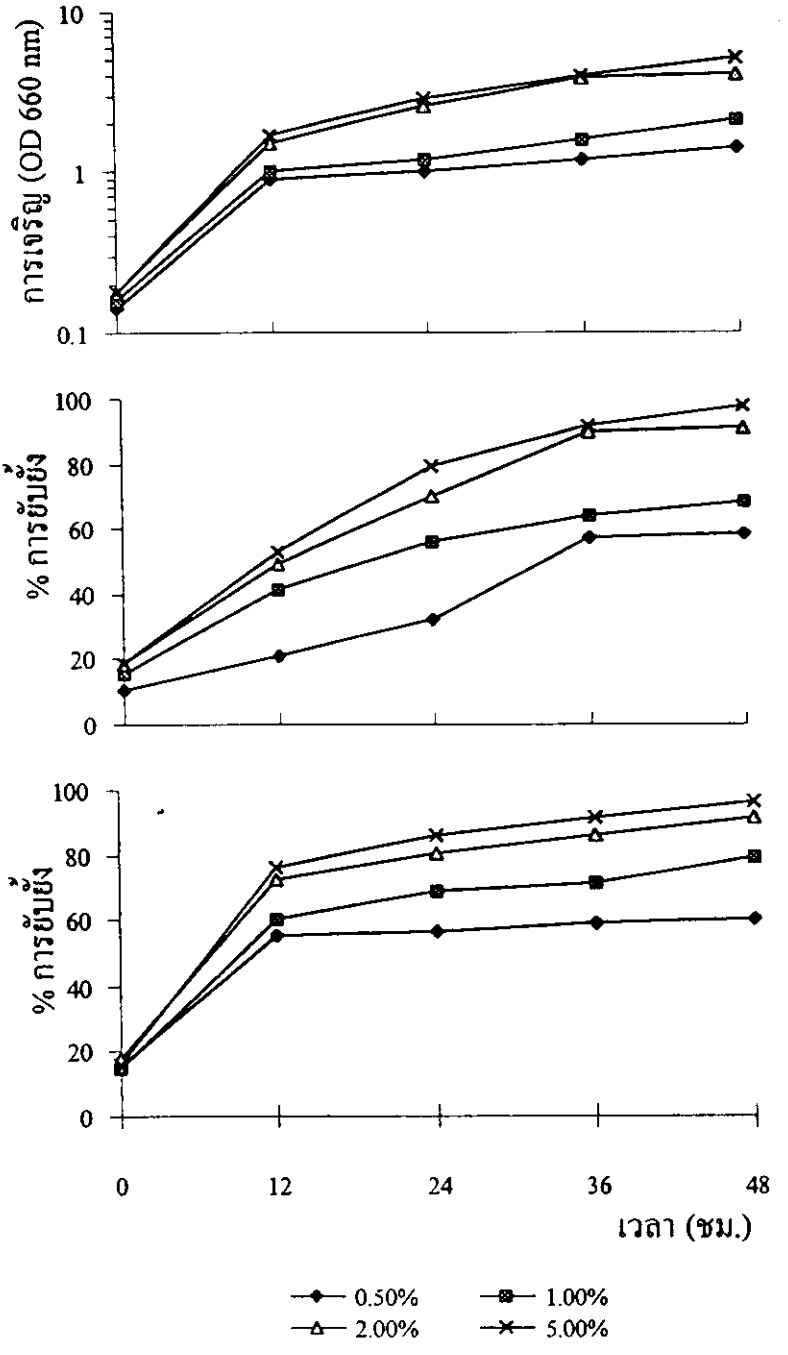
การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ผลแสดงดังภาพที่ 10 และ 11 ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและสามารถสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีกว่าการใช้ 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

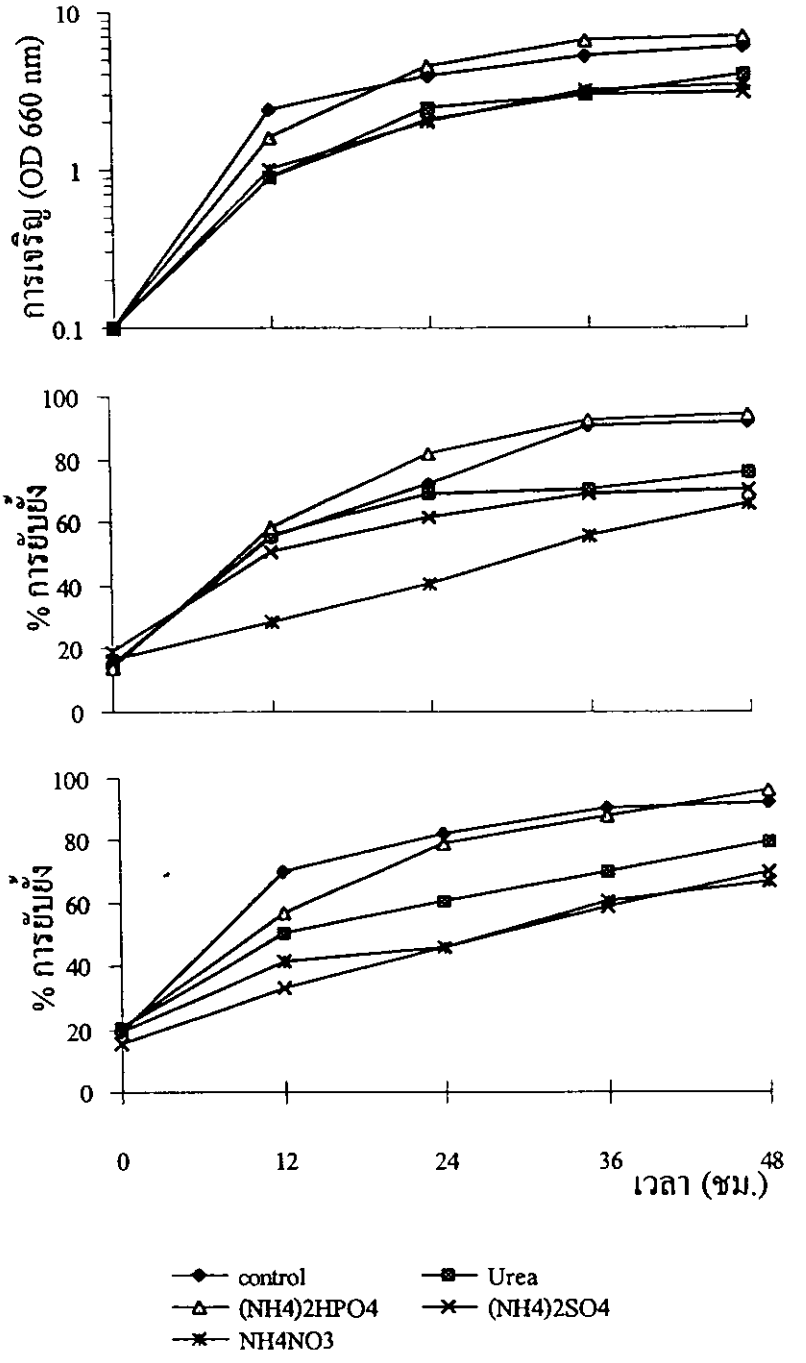
Sandrin และคณะ (1990) รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบนั้น ไนโตรเจนต้องอยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้ง่ายในกระบวนการเมตาโบลิซึม การทดลองนี้ พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารปฏิชีวนะได้มากในอาหารเหลวสูตร Mckeen ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น $(NH_4)_2HPO_4$ แต่จากการทดลองของ Sumino และคณะ (1993) ผลิต purine nucleoside จาก *B. subtilis* AB-471 พบว่า



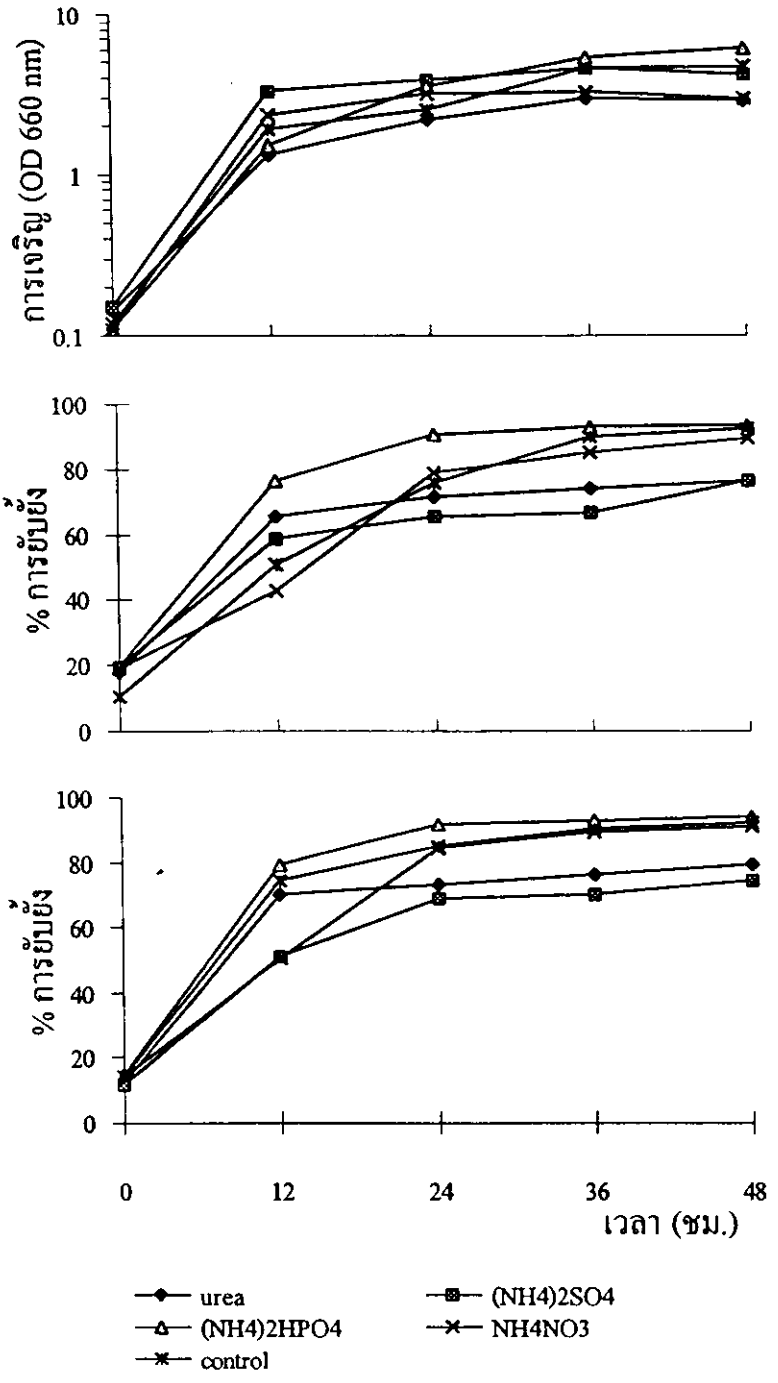
ภาพที่ 8 ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 9 ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 10 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

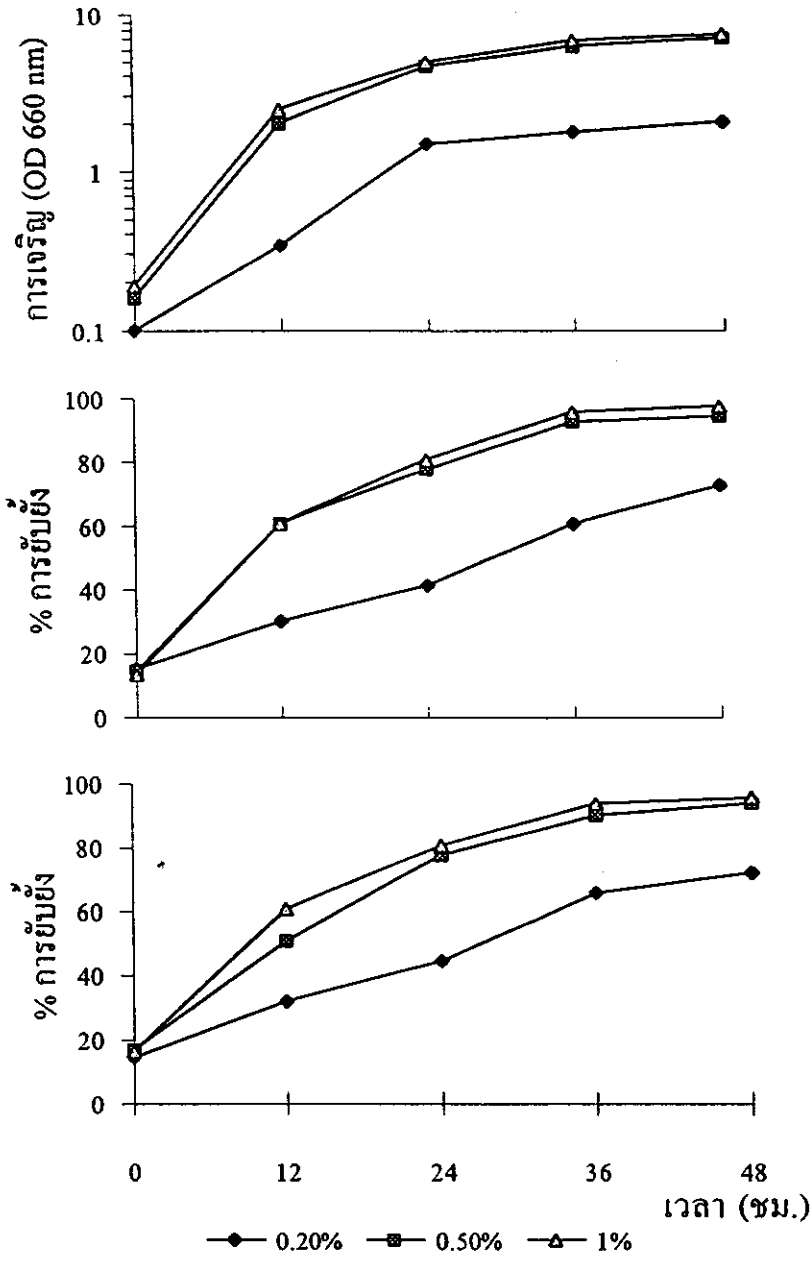
แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตก็คือ $(NH_4)SO_4$ และ urea ส่วน Aharonowitz และ Demain (1979) พบว่าเมื่อใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน หรือร่วมกับ asparagine จะมีผลไปลดการสร้างสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *B. subtilis*

นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนจะมีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวแล้วปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมก็มีความสำคัญเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบถึงปริมาณของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก *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

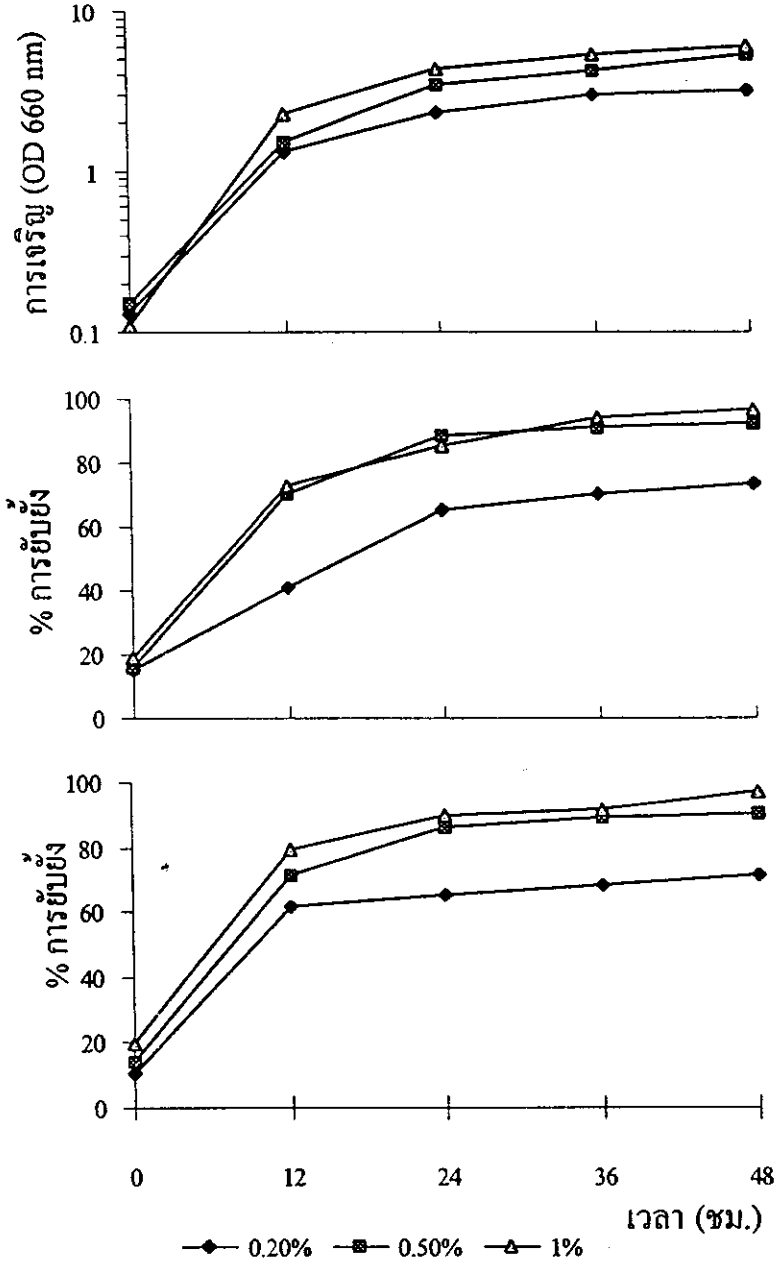
Rytter และคณะ (1989) กล่าวว่าอาหารจะมีผลต่อกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะและเช่น Pusey และ Wilson (1984) พบว่า Yeast extract ที่ผสมกับอาหาร NB จะเป็นการส่งเสริมให้ *B. subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร NB อย่างเดียว และจะไม่ค่อยพบการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ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

2.3 ผลของการเติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย

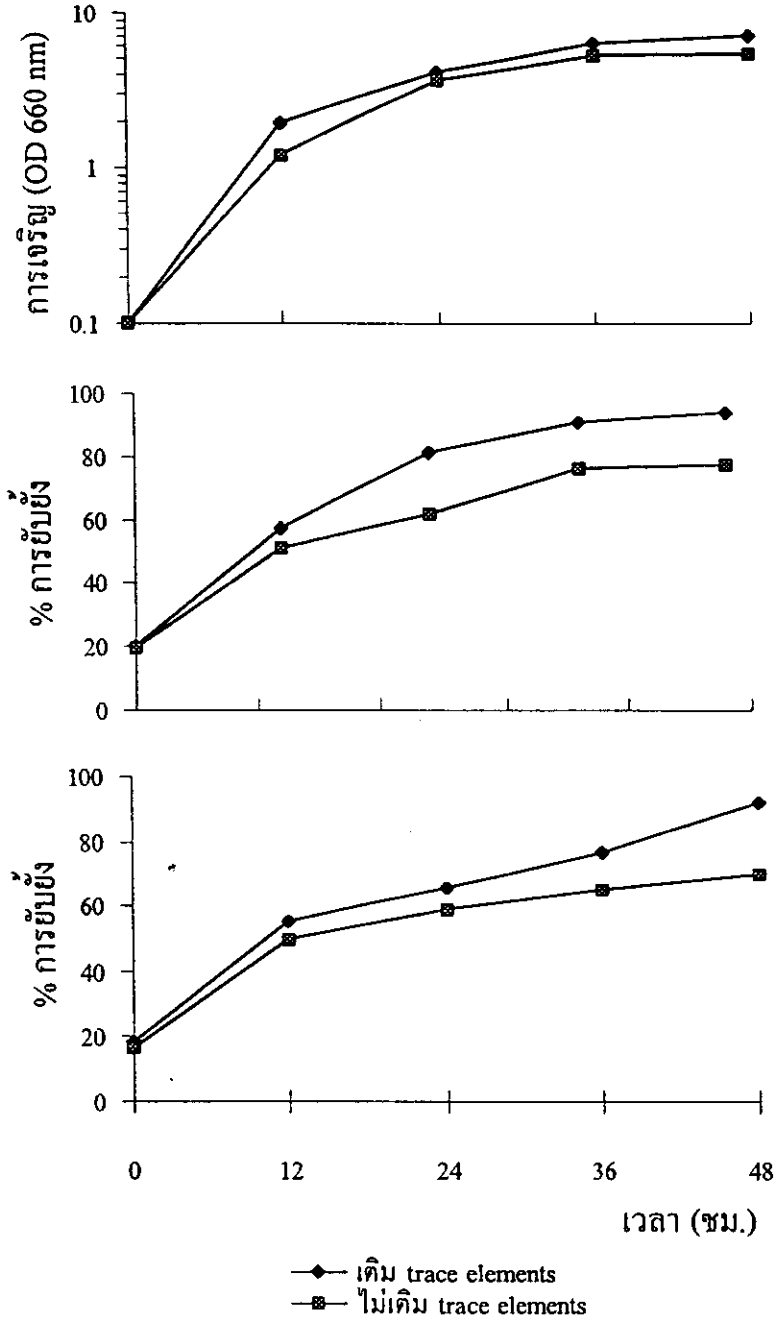
การเปรียบเทียบผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย ในอาหารสูตร Mckeen ซึ่งประกอบด้วย $MnSO_4.4H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$ และ $FeSo_4.7H_2O$ กับอาหารสูตร Mokeen ที่ไม่เติมโลหะเหล่านี้ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 14) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 15) พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร Mokeen ที่ประกอบด้วยโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย เชื้อ *B. subtilis* NSRS



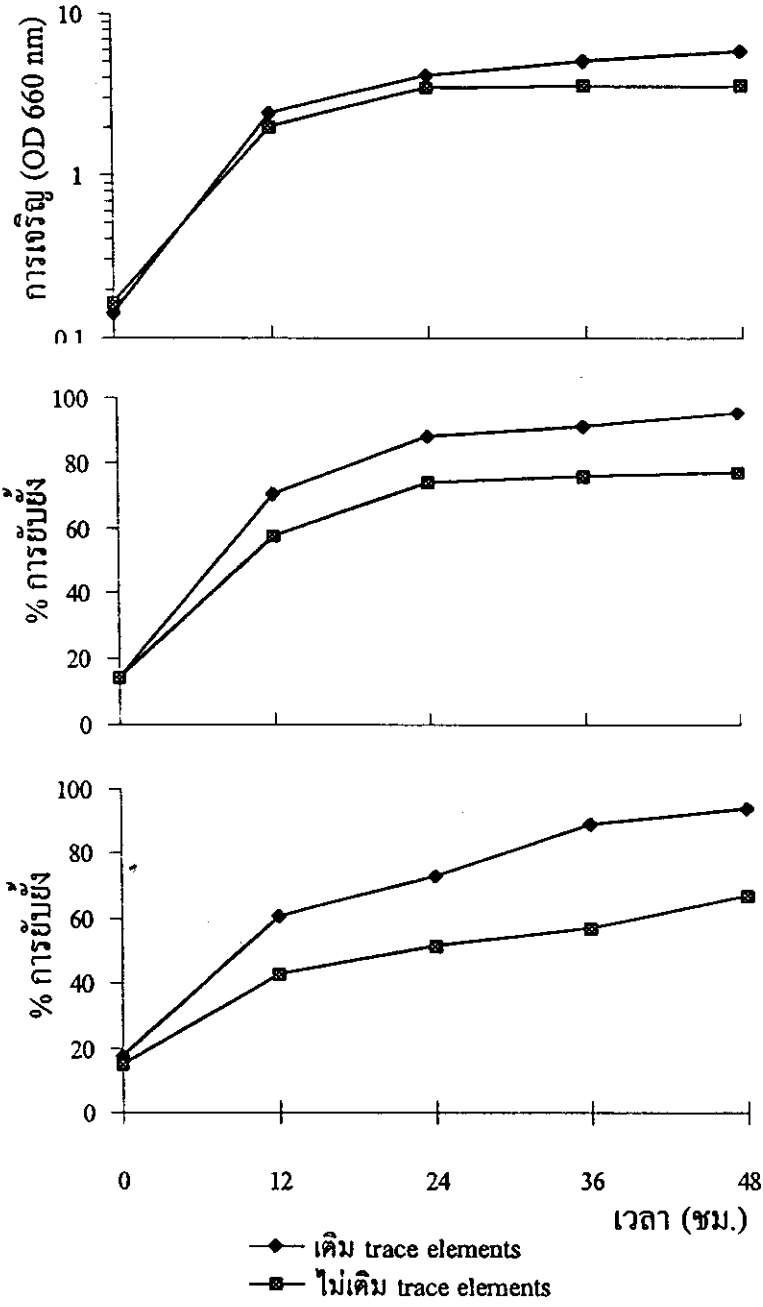
ภาพที่ 12 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



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



ภาพที่ 14 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 15 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เจริญและสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เหตุโรคข้าวได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร Mckeenที่ไม่มีโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยเป็นองค์ประกอบ 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 $MgSO_4.7H_2O$ ซึ่งเป็นโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยสีท ในทำนองเดียวกัน Bemheimer และ Avigad (1970) ศึกษาการผลิต Subtlysin ซึ่งเป็นสารพวก Subfactin จาก B. subtilis พบว่า Mg^{2+} ซึ่งเป็นโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย จะมีผลไปเพิ่มอัตราการออกฤทธิ์ของ Subtilysin และมีรายงานของ Brana และคณะ (1985) กล่าวไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส และโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย จะมีผลอย่างมากในการผลิตสารปฏิชีวนะ

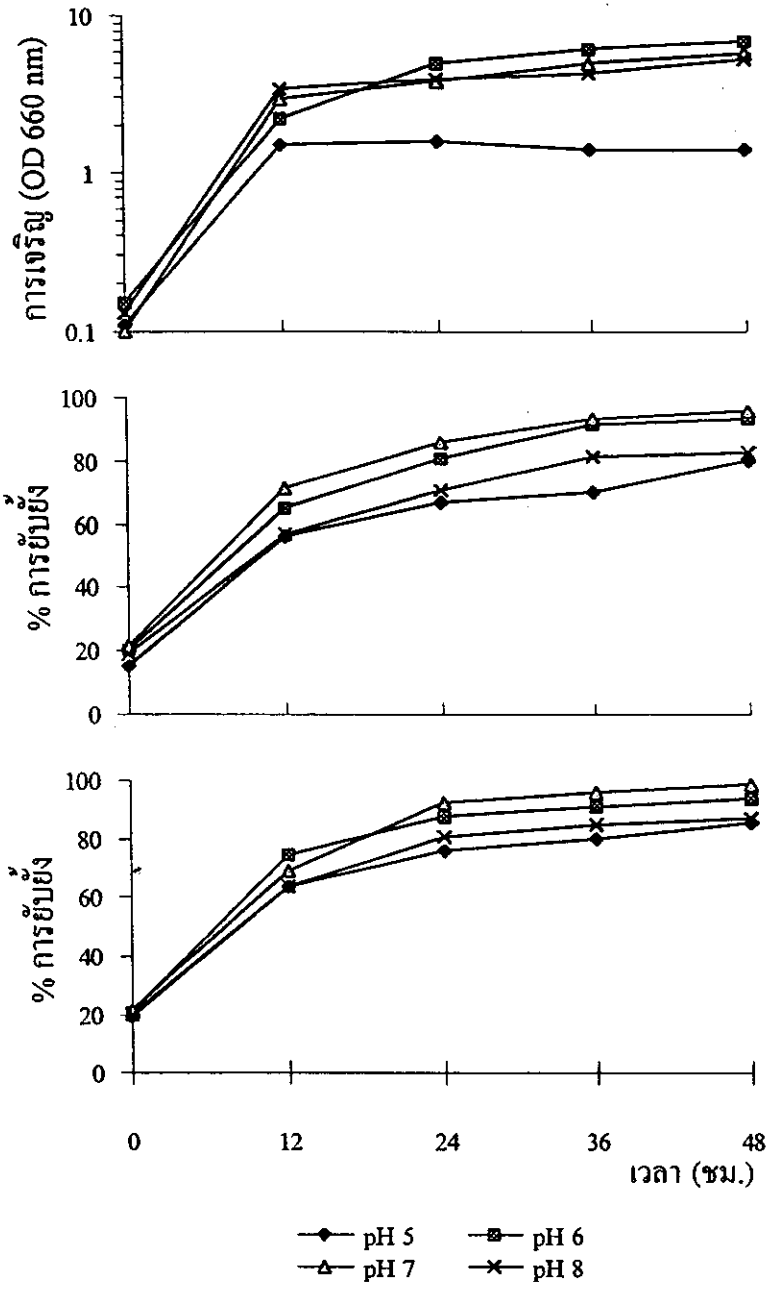
สุชาดา คูชัยสิทธ์ (2535) เลี้ยงเชื้อ subtilis B31 ในอาหารเหลวที่ขาดแร่ธาตุ $MgSO_4.7H_2O$, FeSO4.$7H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, K_2SO_4 และ NaCl ผลปรากฏว่าถ้าขาดเกลือซัลเฟตของแมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และโปแตสเซียม มีผลให้ไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะหรือผลิตได้ในปริมาณที่น้อยหรือทำให้ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเปลี่ยนแปลงไปโดยทำให้มีการผลิตสารปฏิชีวนะได้น้อยกว่าชุดควบคุมที่มีแร่ธาตุต่างๆ ครบถ้วนและเมื่อเพิ่มเติมแร่ธาตุบางชนิดเช่น $MnSO_4.4H_2O$, Cl_2 และ KCl โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.001 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการผลิต B. subtilis B31 ผลปรากฏว่า B. subtilis B31 ยังมีการผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การเพิ่ม $CaCl_2$ มีผลทำให้เกิดการผลิตสารปฏิชีวนะดีขึ้น และยังช่วยในการรักษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเหลว โดยปกติการรักษาการเปลี่ยนแปลงจะใช้ $CaCO_3$ ในการรักษาค่าพีเอชของการ

ผลิตสารปฏิชีวนะ แต่เนื่องจาก $CaCO_3$ เป็นสารที่ไม่ละลายและทำให้อาหารขุ่น ส่วนการใช้แคลเซียมในรูป $CaCL_2$ จะละลายน้ำได้ดีกว่า

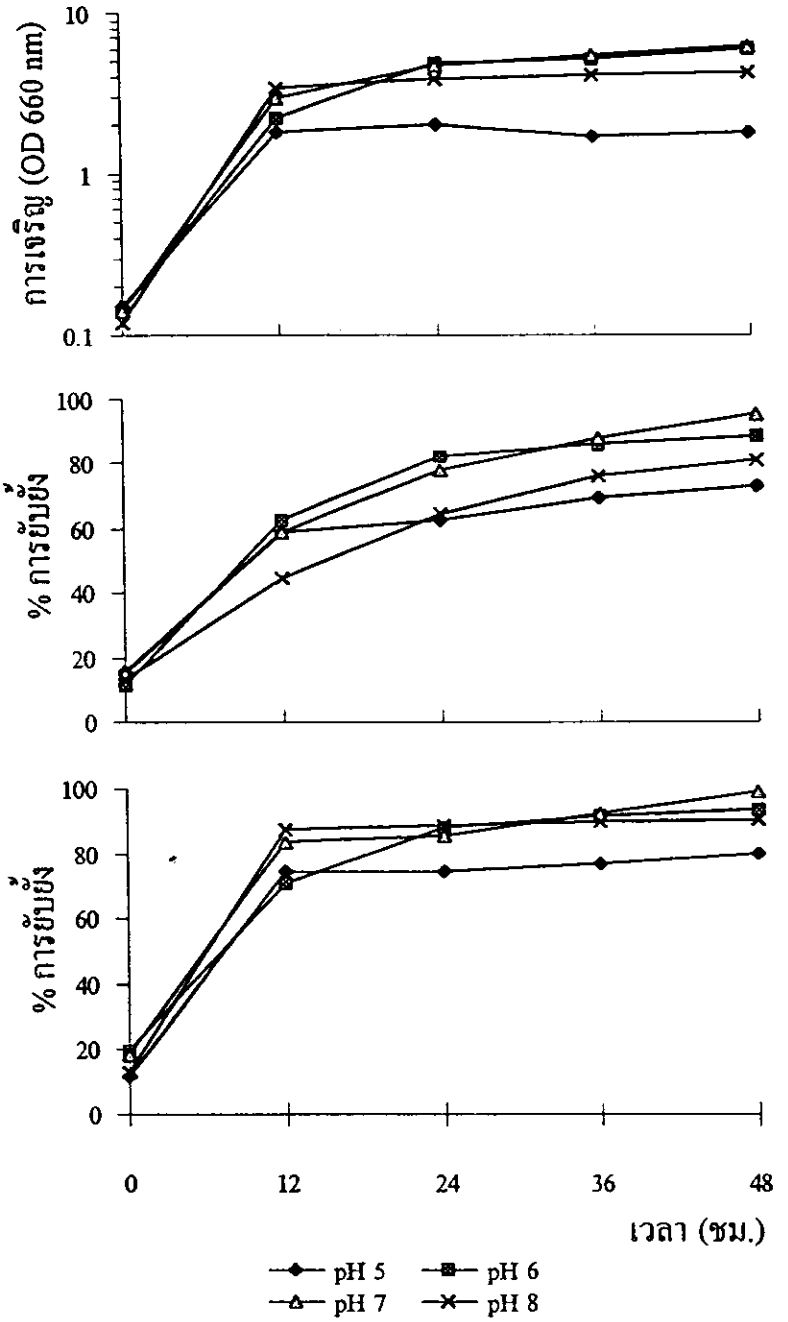
สมใจ ศิริโชค (2537) กล่าวว่าโดยทั่วไปมักจะพบโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยเจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด และฟาร์มามีเดีย (ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองได้จากเอมบริโอของเมล็ดฝ้ายที่บดละเอียด) ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ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

2.4 ผลของพีเอชเริ่มต้น

นอกจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนสำคัญต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว 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 เช่นเดียวกับการศึกษาของ 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)



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



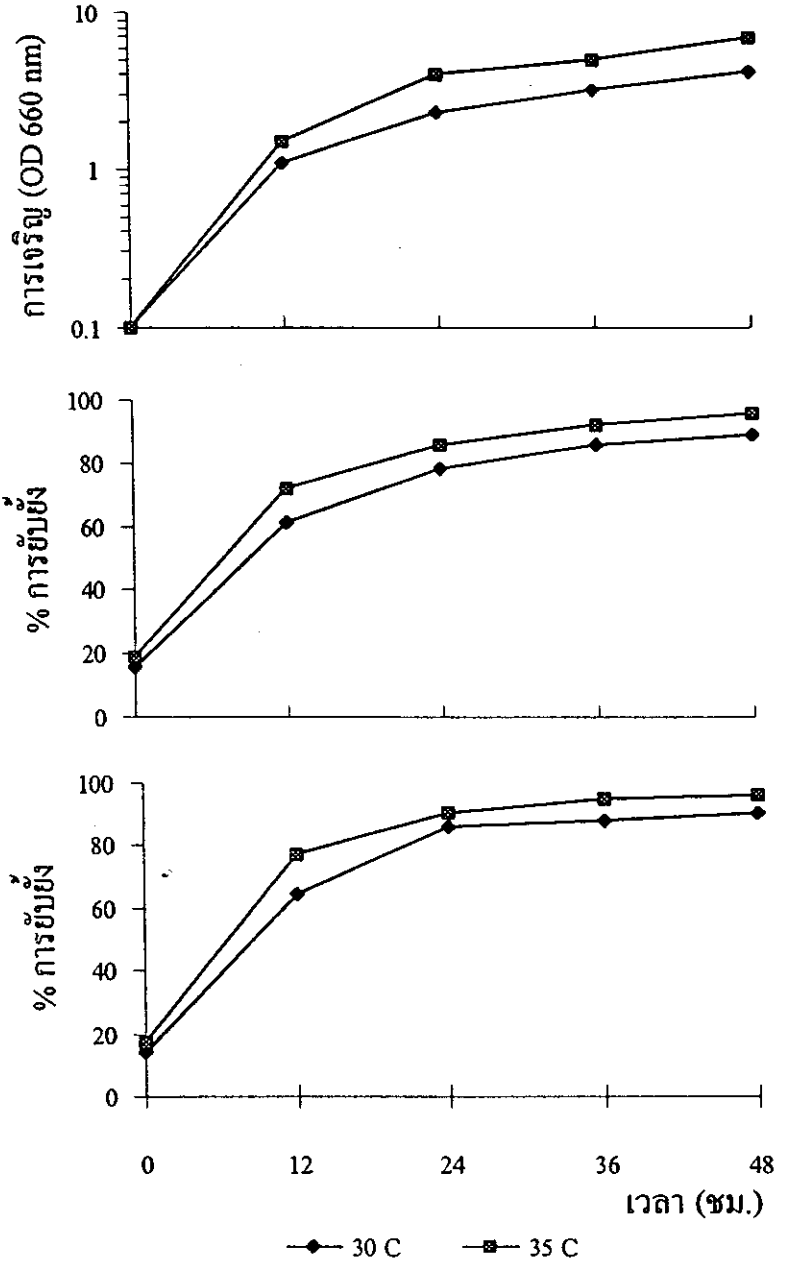
ภาพที่ 17 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* sp. LN 007

2.5 ผลของอุณหภูมิ

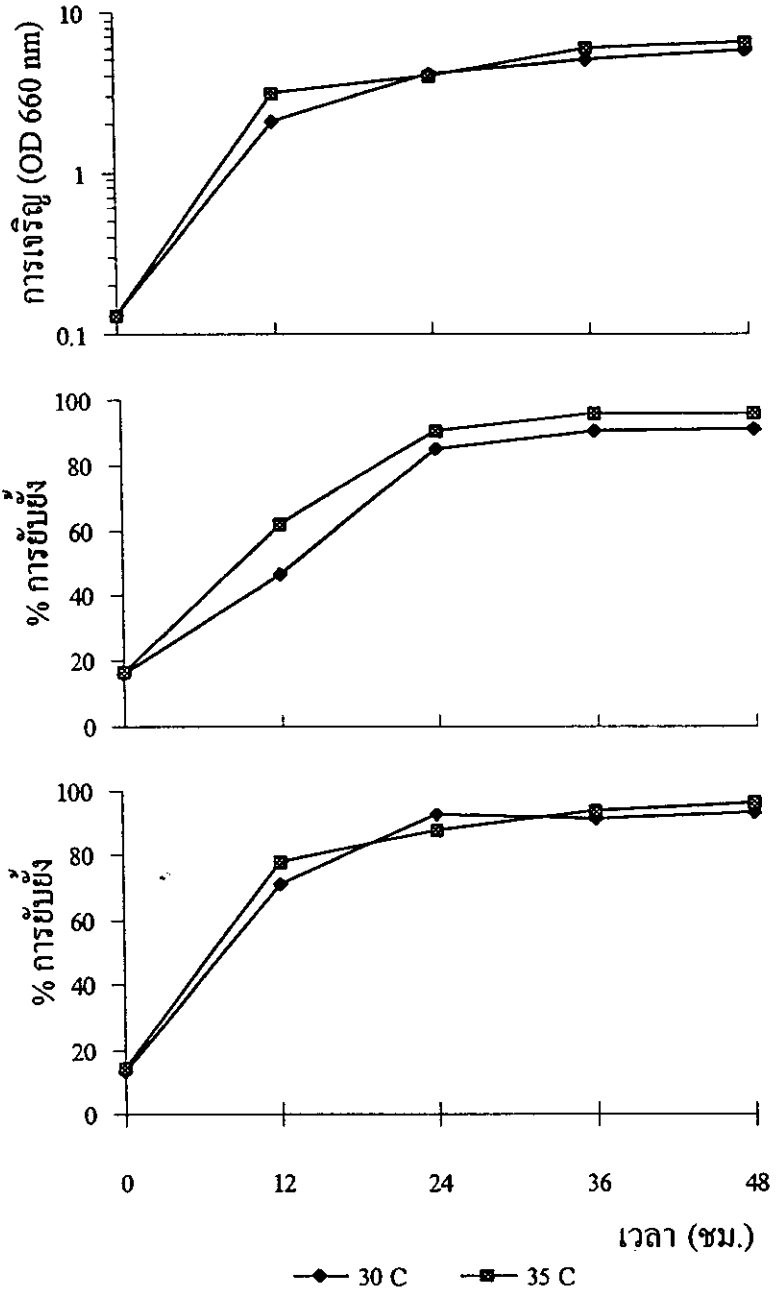
ผลของอุณหภูมิต่อการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 18) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 19) เพื่อผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีที่อุณหภูมิ 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 โดยใช้โมลาสเป็นสับสเตรทของเชื้อพบว่าเชื้อเจริญและผลิตสารได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

2.6 ผลของการให้อากาศ

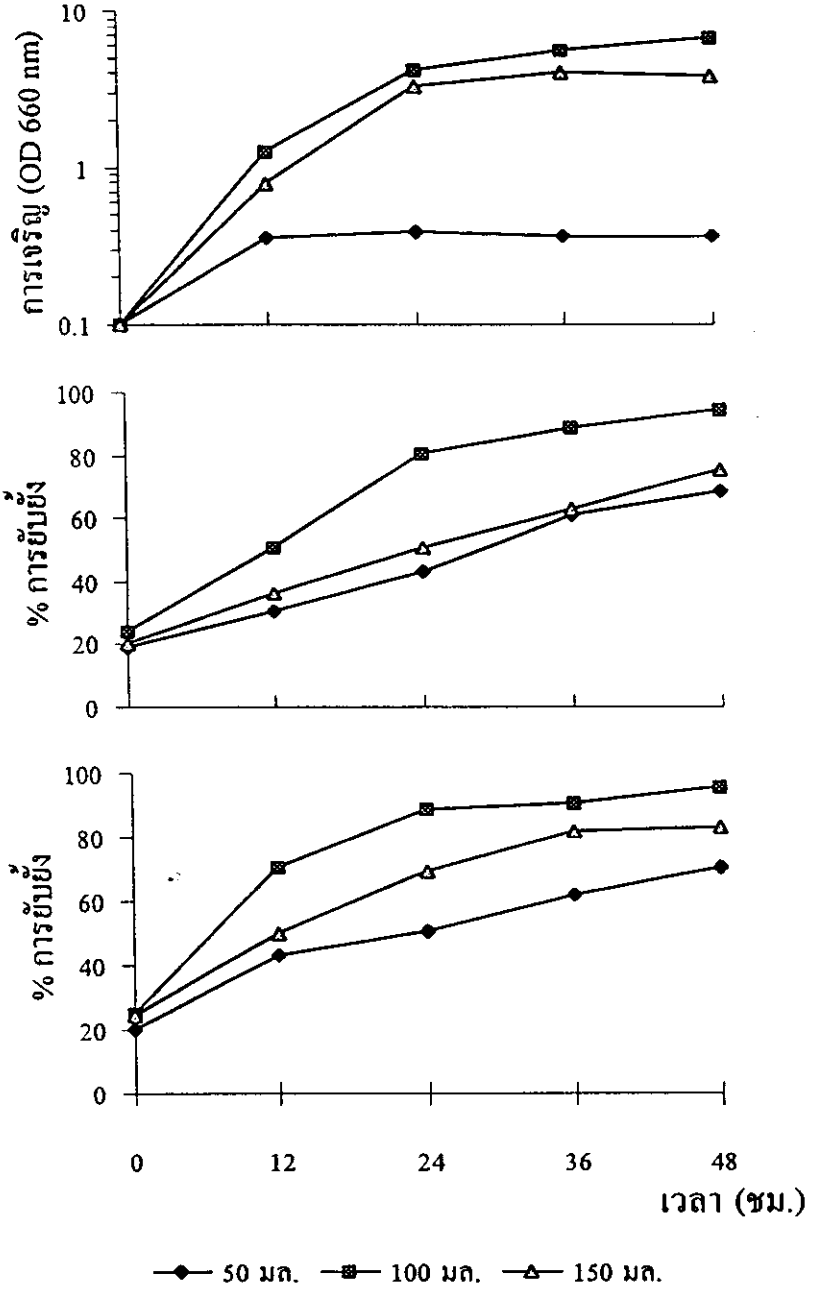
ผลจากการศึกษาถึงการให้อากาศในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 20) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 21) เพื่อผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยการเปลี่ยนปริมาตรของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ แต่ไม่เปลี่ยนขนาดของฟลาสก์ และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ 50 100 และ 150 มิลลิลิตร ต่อฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าปริมาตรของอาหารที่แตกต่างกันในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว กล่าวคือ เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ เจริญและสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ดีกว่าอาหารที่มีปริมาตร 50 และ 150 มิลลิลิตรตามลำดับ 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 และคณะ (1993) ศึกษา



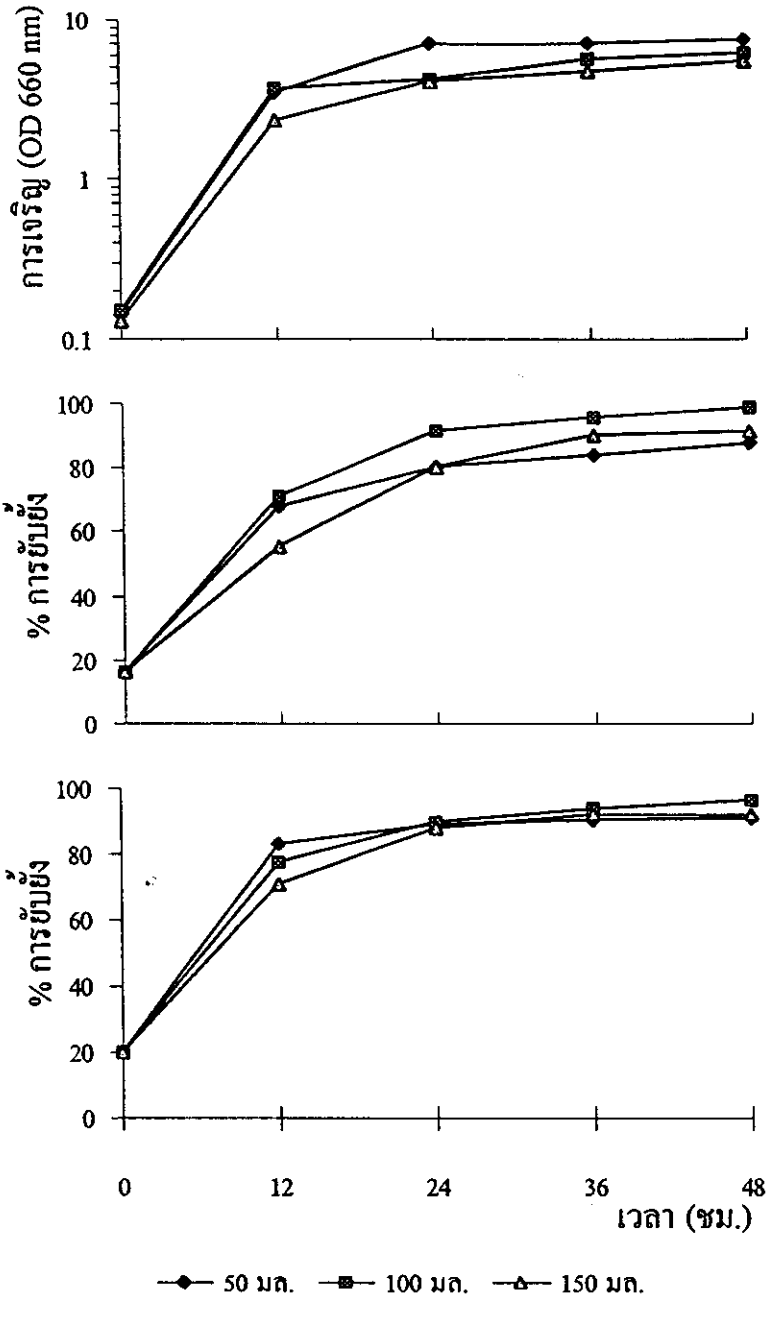
ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 20 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 21 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

การผลิต purine nucleoside จาก *B. subtilis* AB-471 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก็คือ เลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 200 มล. ซึ่งมีอาหารปริมาตร 40 มล. ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

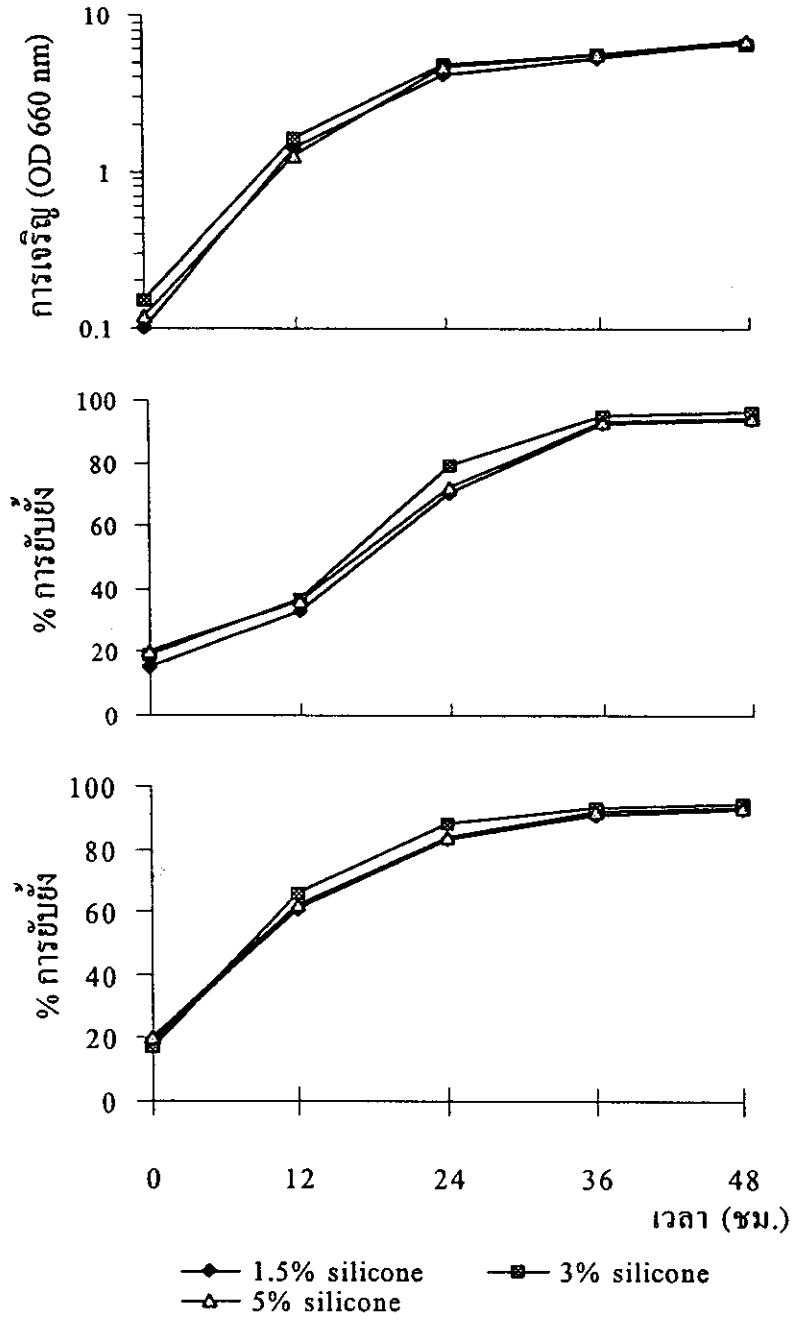
2.7 สารกำจัดฟอง

การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 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 ในถังหมักขนาด2.5 ลิตร ของ สุชาดา กูชัยสิทธิ์ (2535) พบว่า สารกำจัดฟองทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการกำจัดฟองแตกต่างกัน โดยที่แต่ละชนิดมีความสามารถในการกำจัดฟองได้ดีตามลำดับคือ silicone > antispumin > PG-2000 และการใช้ silicone เชื้อจะยังคงผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี ส่วนการใช้ antispuminจะทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะลดต่ำลง ในขณะที่การใช้ PG-2000 จะทำให้เชื้อไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะ

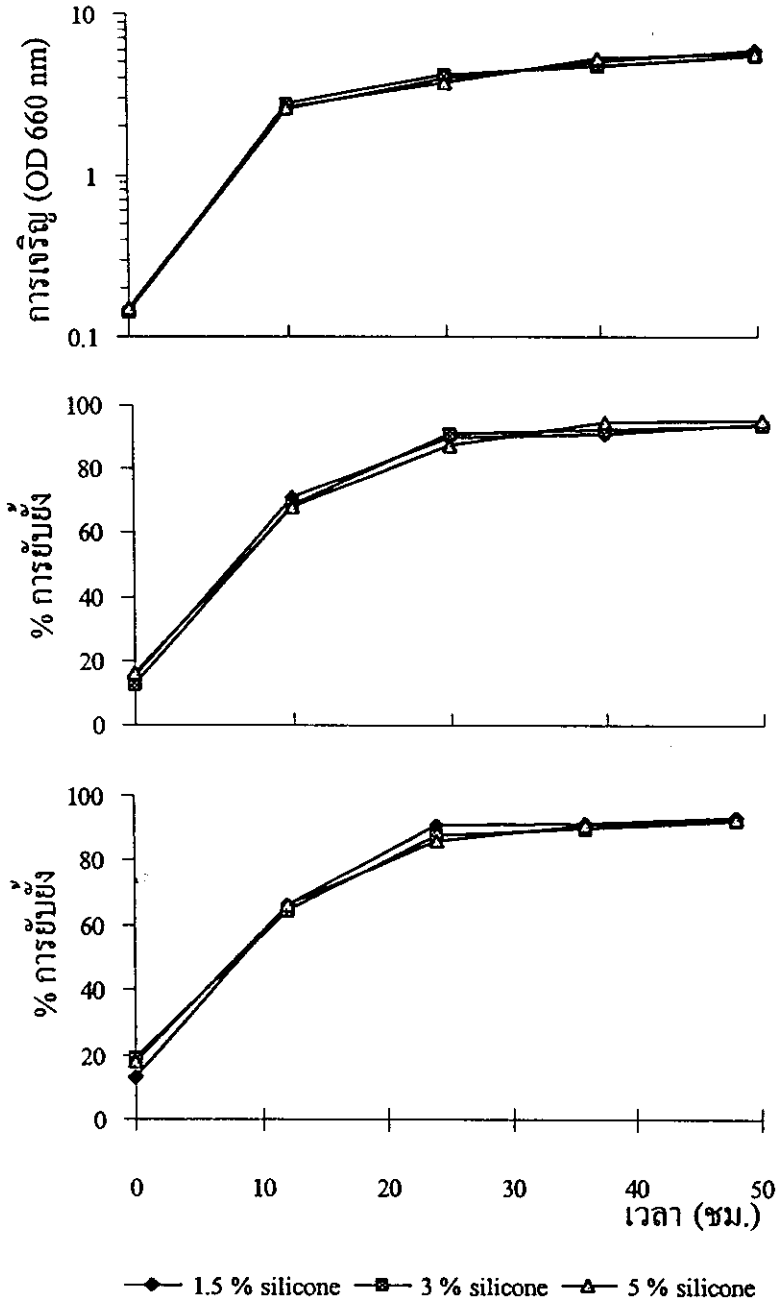
3. ชนิดของ complex medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา

3.1 การใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน

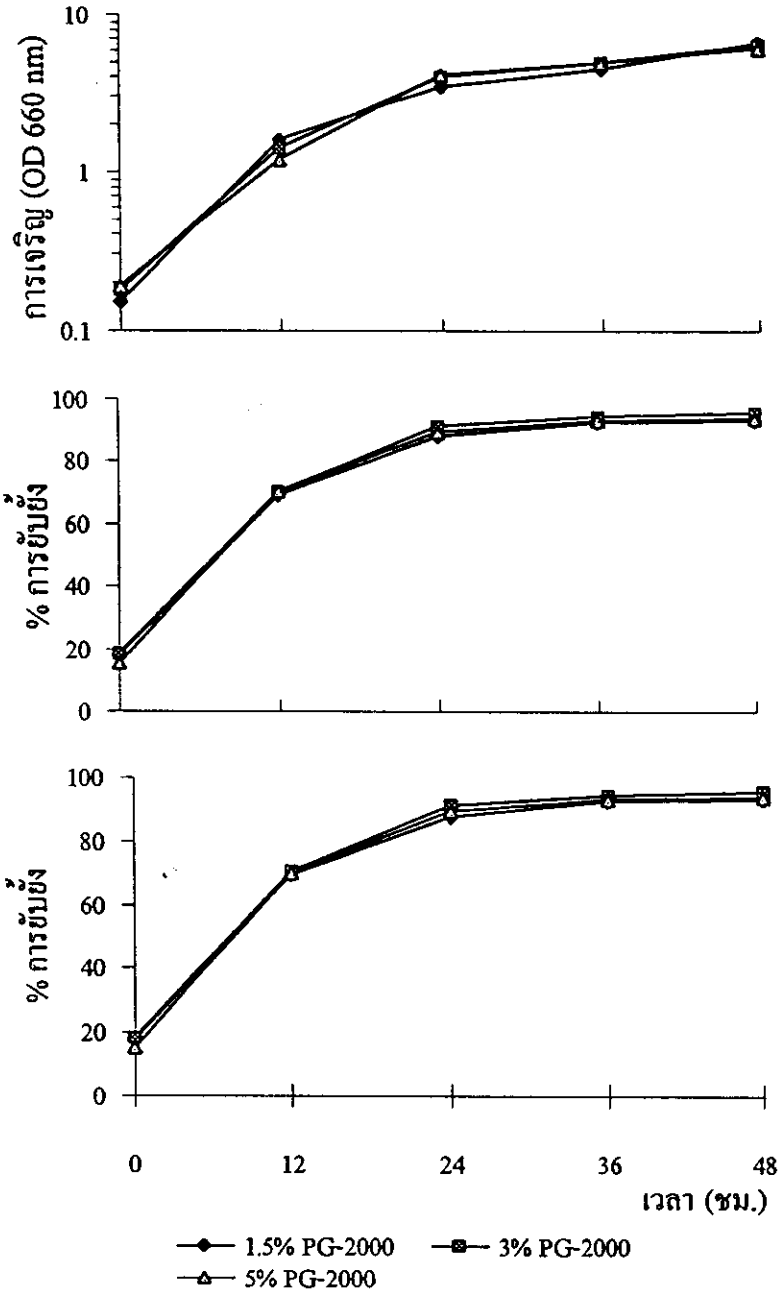
โมลาสเป็นวัสดุเศษเหลือของอุตสาหกรรมน้ำตาล เหตุผลสำคัญในการใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนก็คือราคาต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมี แร่ธาตุ สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และวิตามิน องค์ประกอบทางเคมีของโมลาสที่วิเคราะห์ได้แสดงดังตารางที่ 3 โดยโมลาสมีน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 58 เมื่อใช้โมลาสนี้ร้อยละ 1 2 และ 5 แทนซูโครสร้อยละ 5 ในอาหารสูตร Mckeen ที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ผล



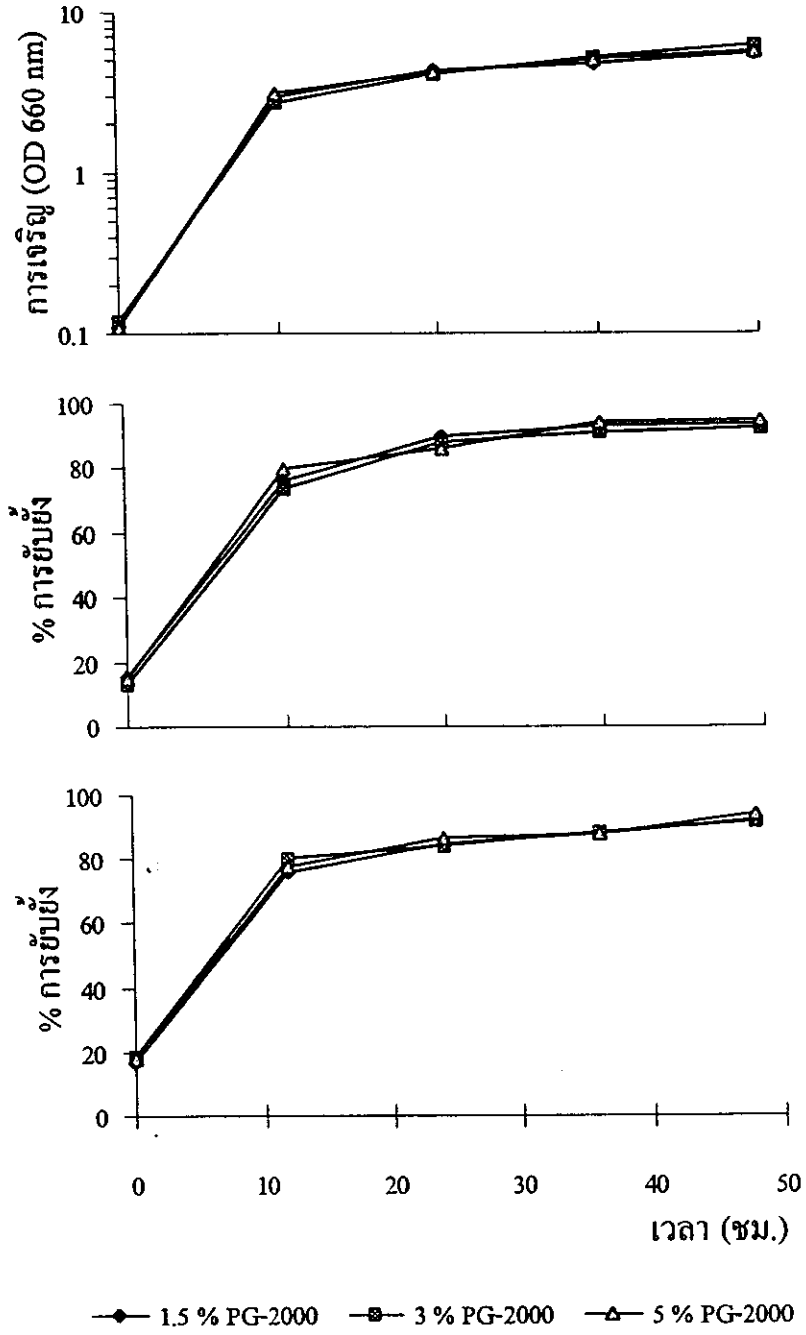
ภาพที่ 22 ผลของ silicone ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



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



ภาพที่ 24 ผลของ PG-2000 ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



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

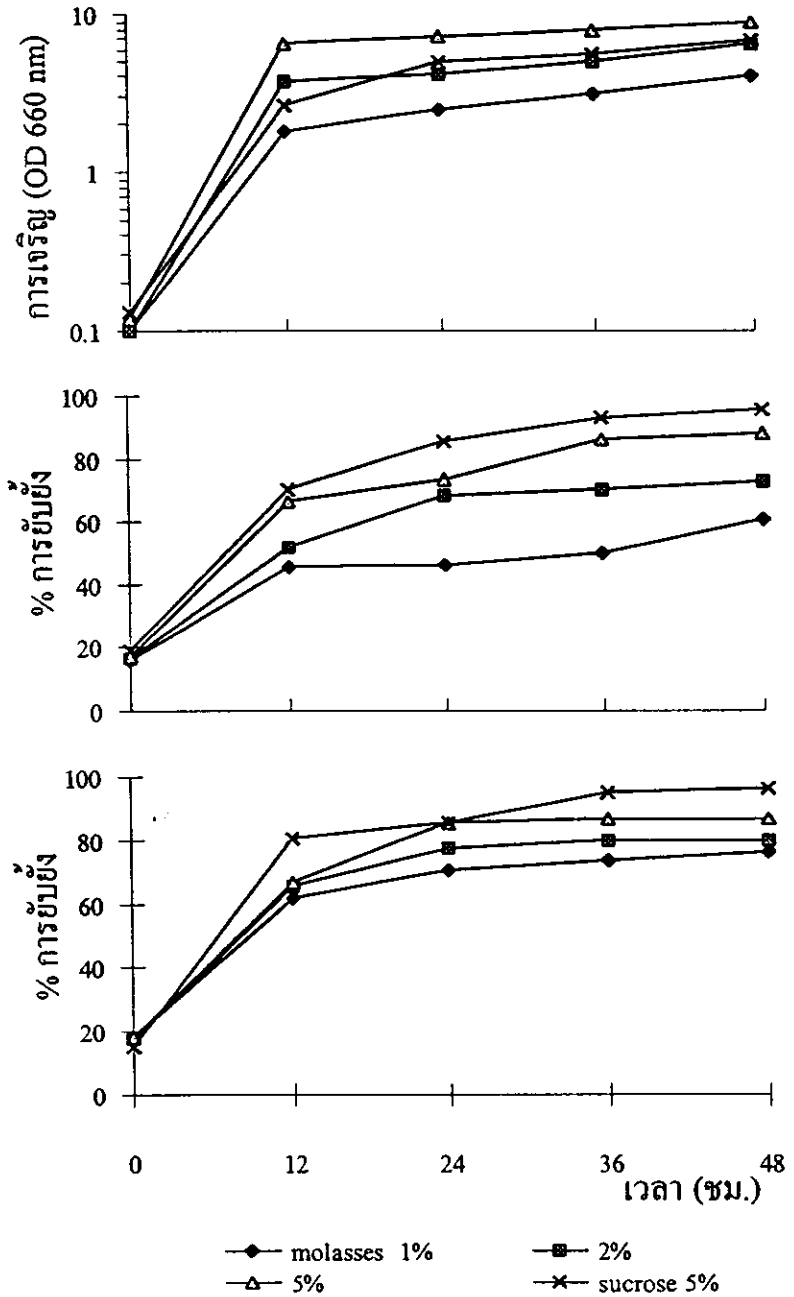
การทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 (ภาพที่ 26) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 27) เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีที่สุดเมื่อใช้โมลาสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนซูโครส โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 45, 46, 47 และ 48) และสารที่ผลิตได้จาก *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

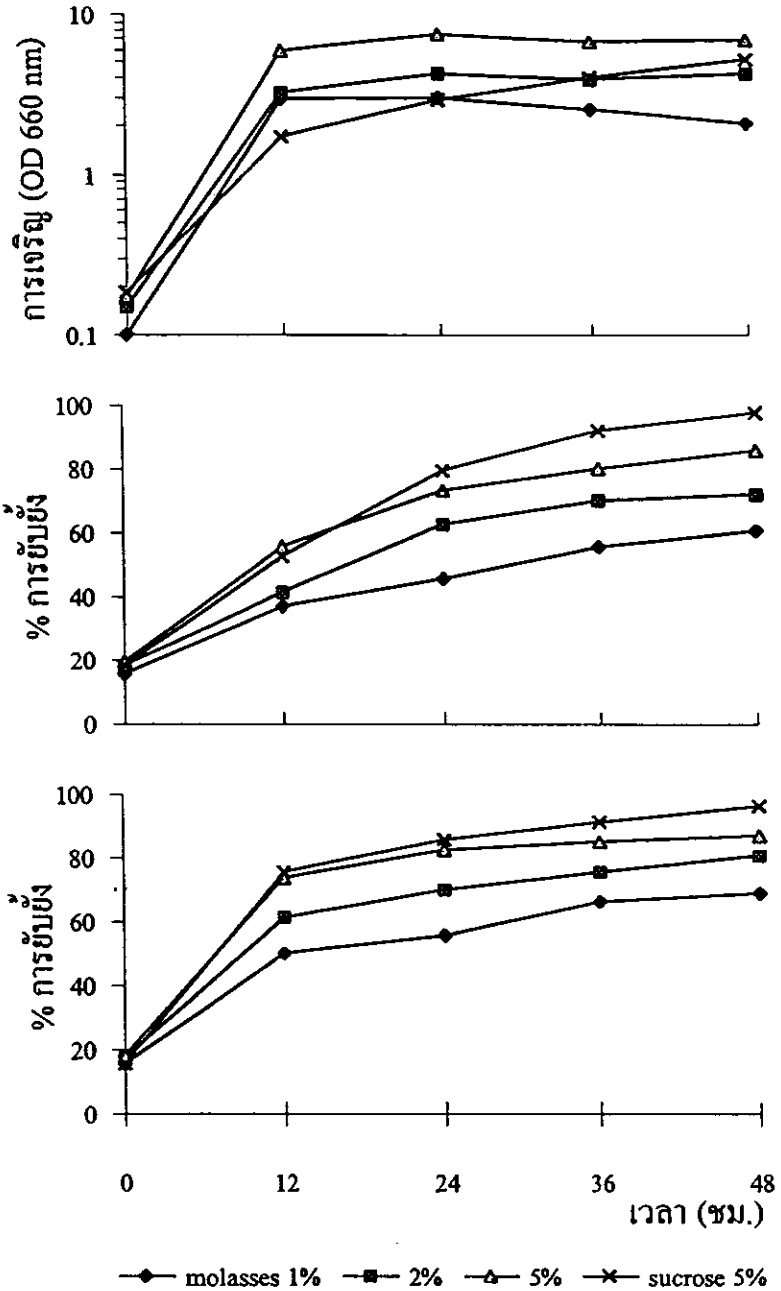
น้ำตาลทั้งหมด	58 %
สารที่ละลายได้ทั้งหมด	83 %
แมกนีเซียม	300.916 (มก./ล)
แมงกานีส	4.581 (มก./ล)
เหล็ก	29.494 (มก./ล)

3.2 การใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้เป็นแหล่งไนโตรเจน

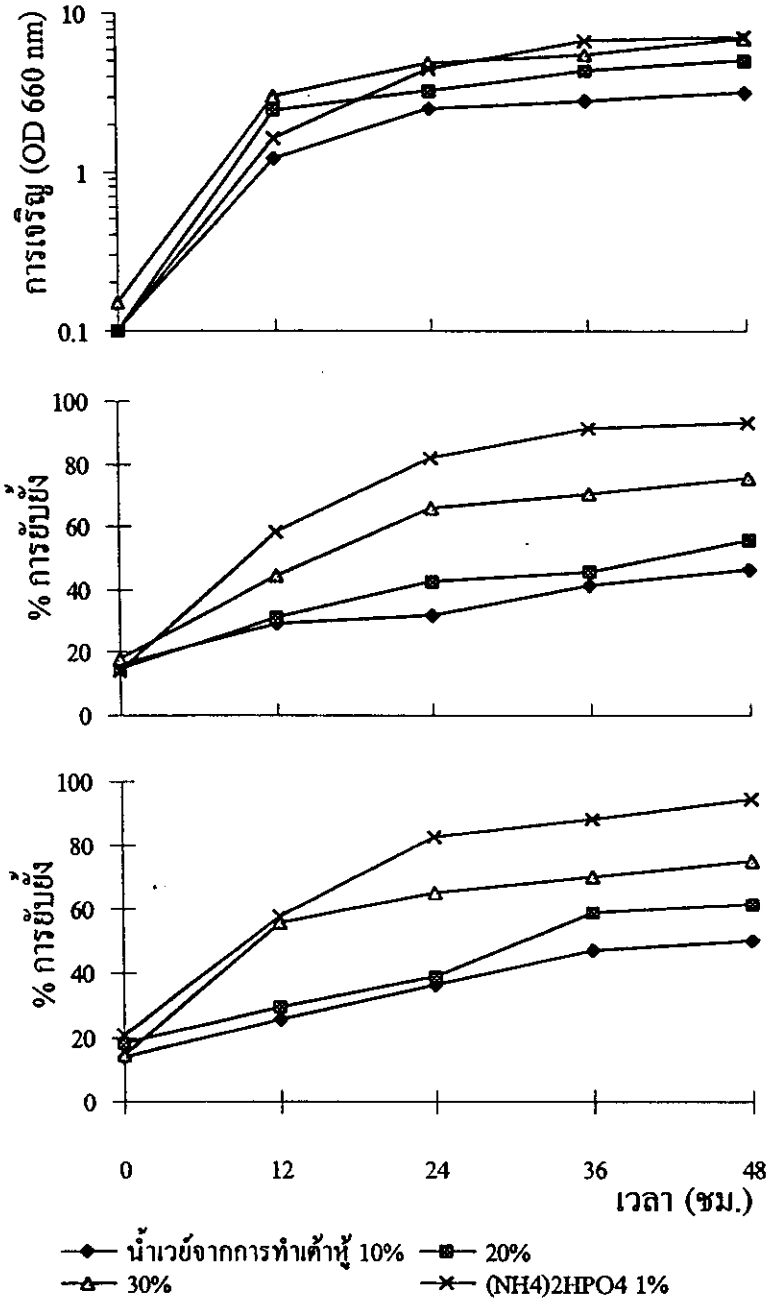
การทดลองใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้แทน $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 1.0 ในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุงที่มีซูโครสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ (ไนโตรเจน 0.074 % และ โปรตีน 0.42%) ร้อยละ 10 20 และ 30 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 28) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 29) เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีเมื่อใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 49,50,51 และ 52) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24



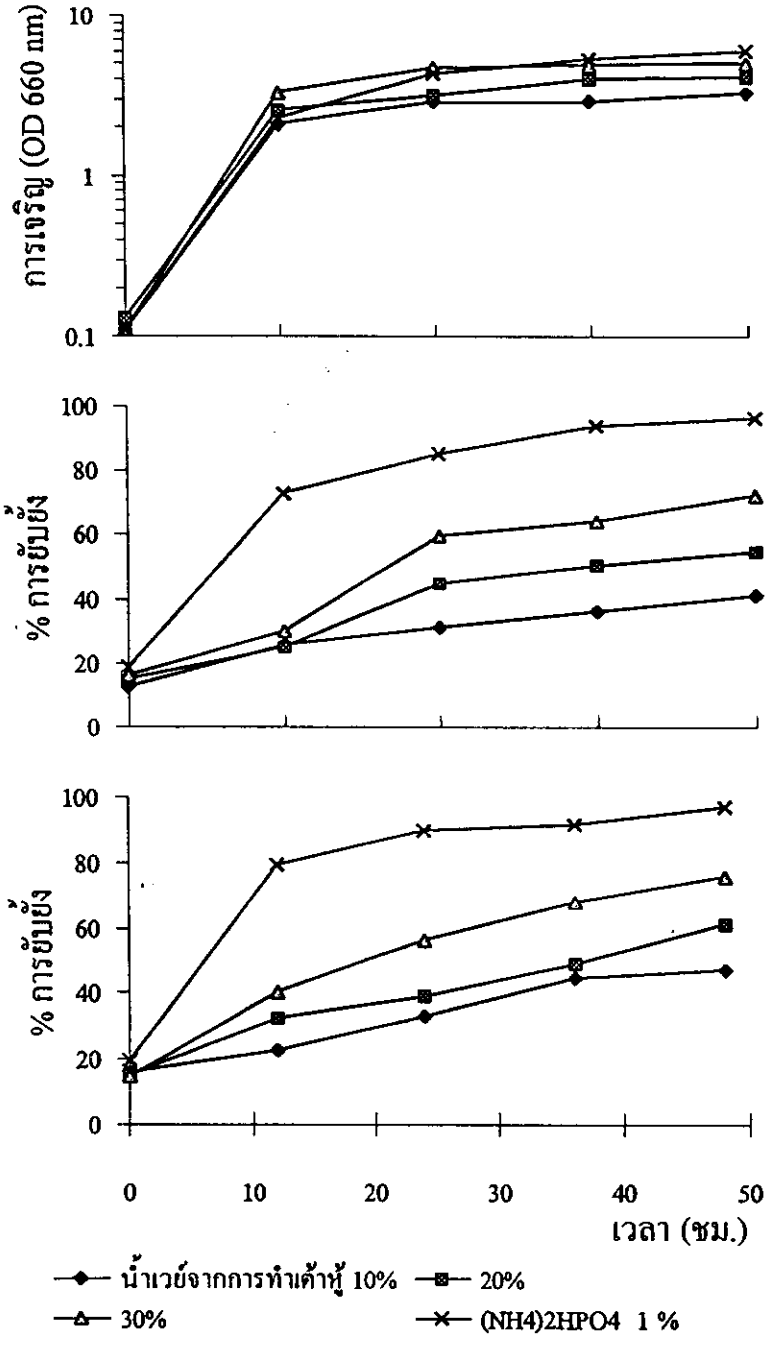
ภาพที่ 26 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 27 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* sp. LN 007



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



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

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 พบว่าการใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30 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 ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนไม่ได้ แต่สามารถใช้กากถั่วเขียวเป็นแหล่งไนโตรเจนแทน L-asparagine

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

ข. การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก Bacillus โดยการเลี้ยงในถังหมักขนาด 3 ลิตร

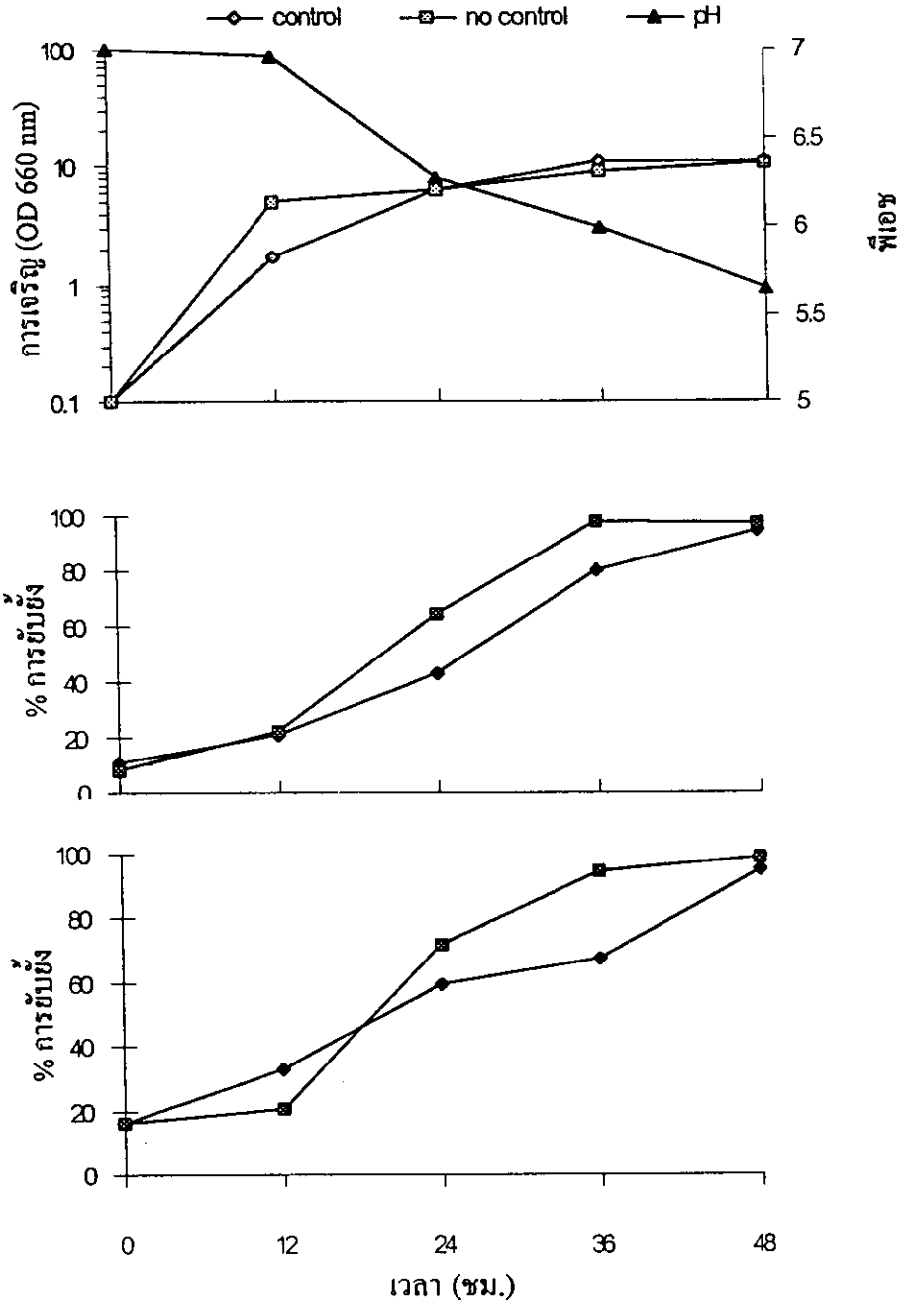
ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชเริ่มต้น และความสัมพันธุ์ของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ รวมทั้งจลนพลศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ Bacillus สองสายพันธุ์ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเหลว (ซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาบนเครื่องเขย่า) ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง ประกอบด้วย sucrose 50.0 ก/ล, $(NH_4)_2HPO_4$ 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

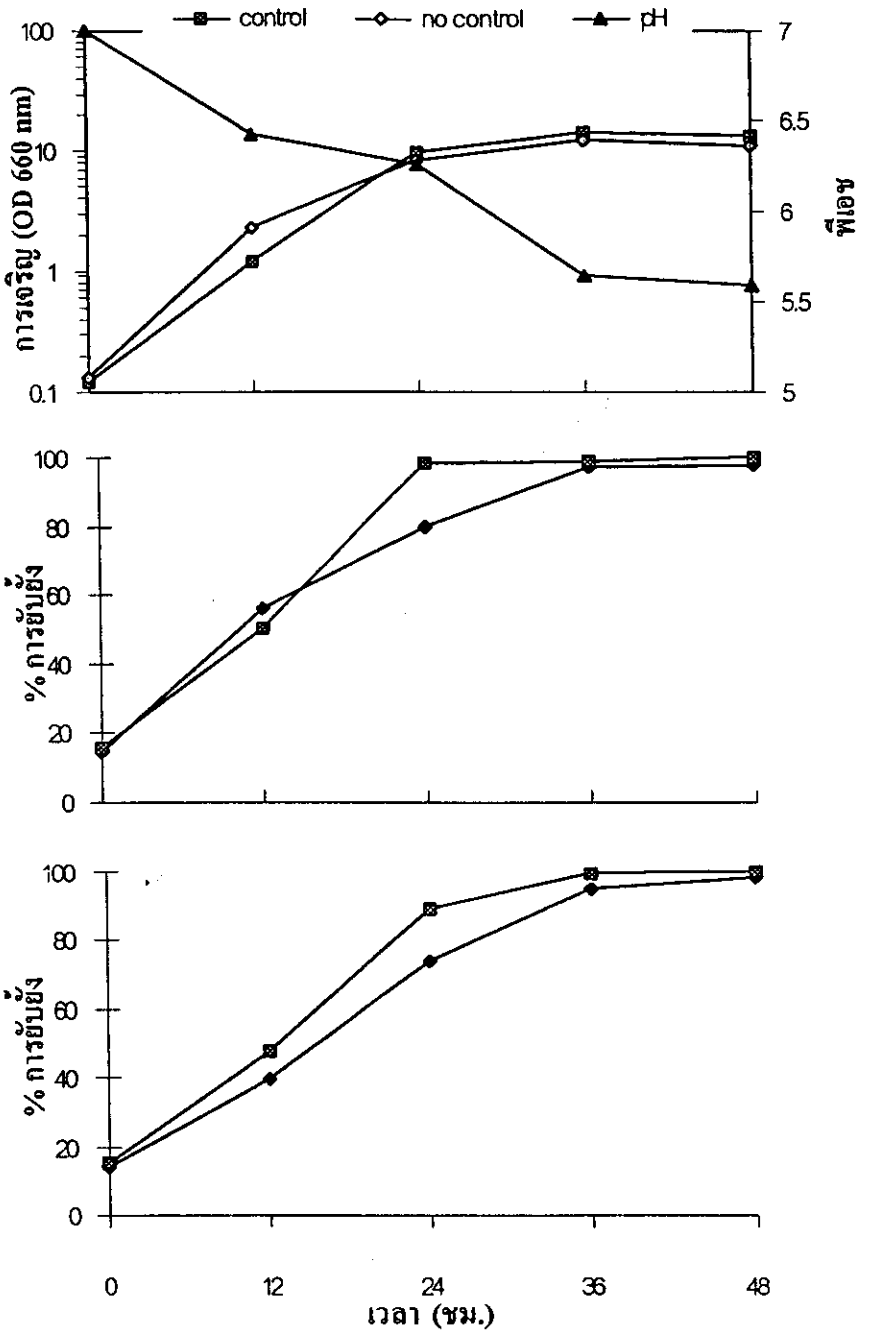
เปรียบเทียบผลการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 30) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 31) เมื่อมีการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชเริ่มต้น โดยใช้อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 300รอบต่อนาที และให้อากาศ 1.0 VVM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 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 ถ้าไม่มีการควบคุมพีเอชและ Dissolved Oxygen Tension (DOT) ในถังหมักพีเอชจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 6.8 ถึง 8.8 ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้คงที่ที่ 6.8 ในการเลี้ยงเชื้อจะใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.33 VVM

2. ผลของอัตราการกวน

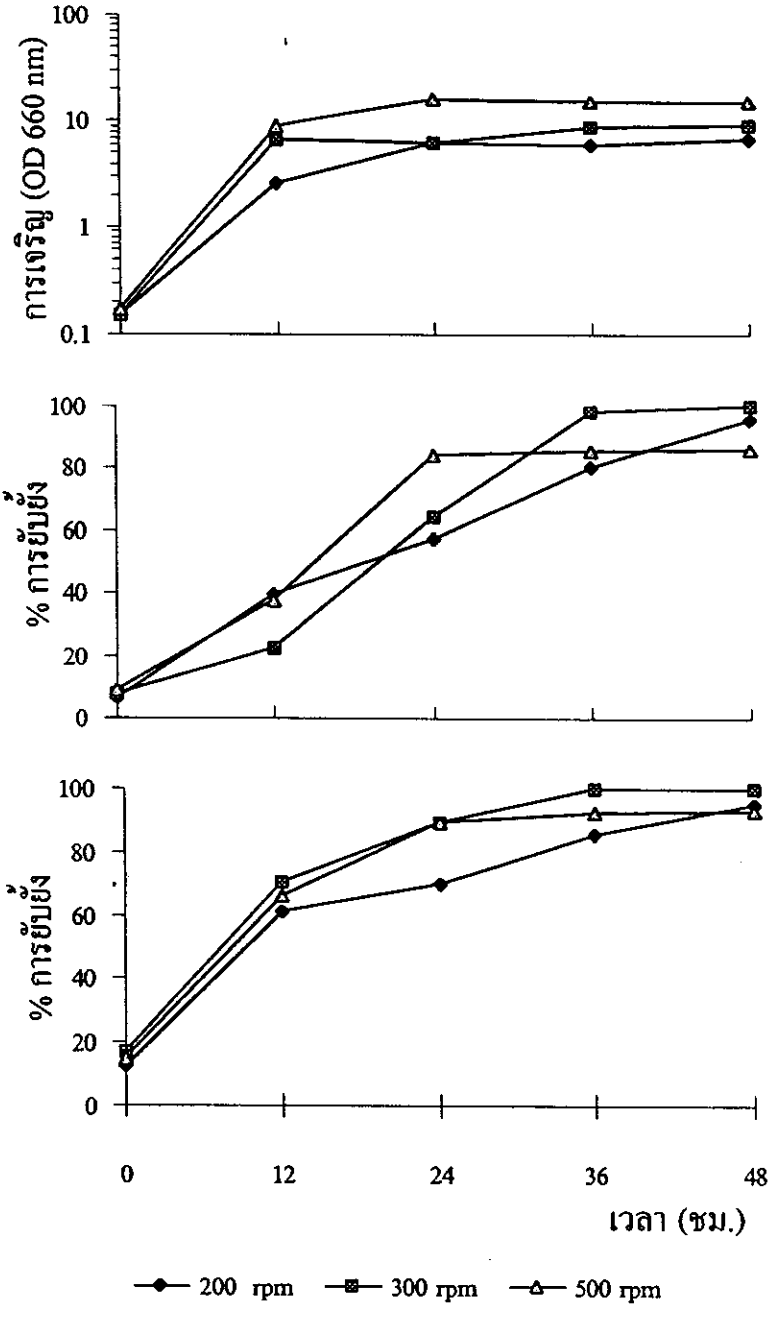
การเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนที่ 200 300 และ 500 รอบต่อนาที โดยควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 VVM และไม่มีการควบคุมพีเอชเริ่มต้น พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดี และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 57, 58,59 และ 60) โดยสารที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 (ภาพที่ 32) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 99.8 และ100.0 ตามลำดับ และส่วนสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 33) สามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 100.0 และ 98.8 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนพีเอชลดลงเล็กน้อย จะเห็นว่าการใช้อัตราการกวนที่มากหรือน้อยเกินไปจะมีผลให้การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราลดต่ำลงได้



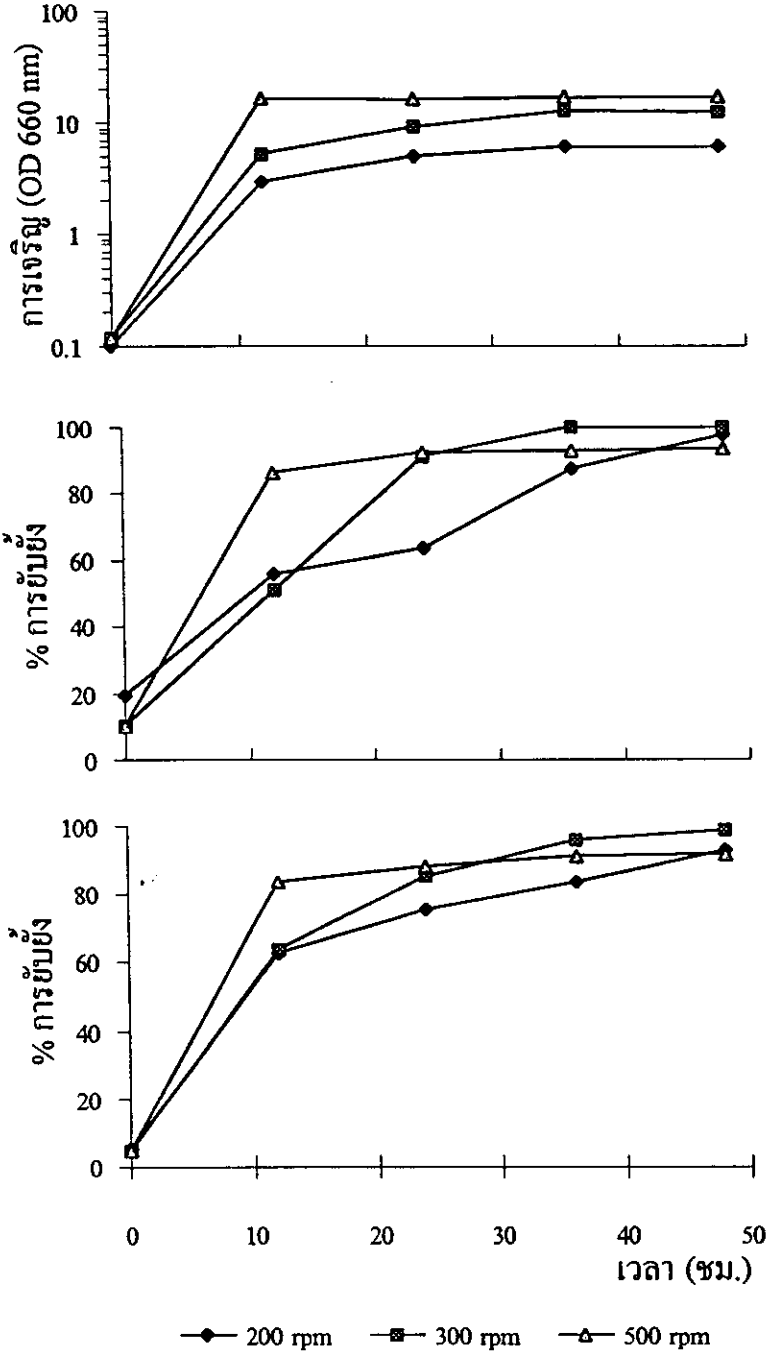
ภาพที่ 30 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 31 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 32 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



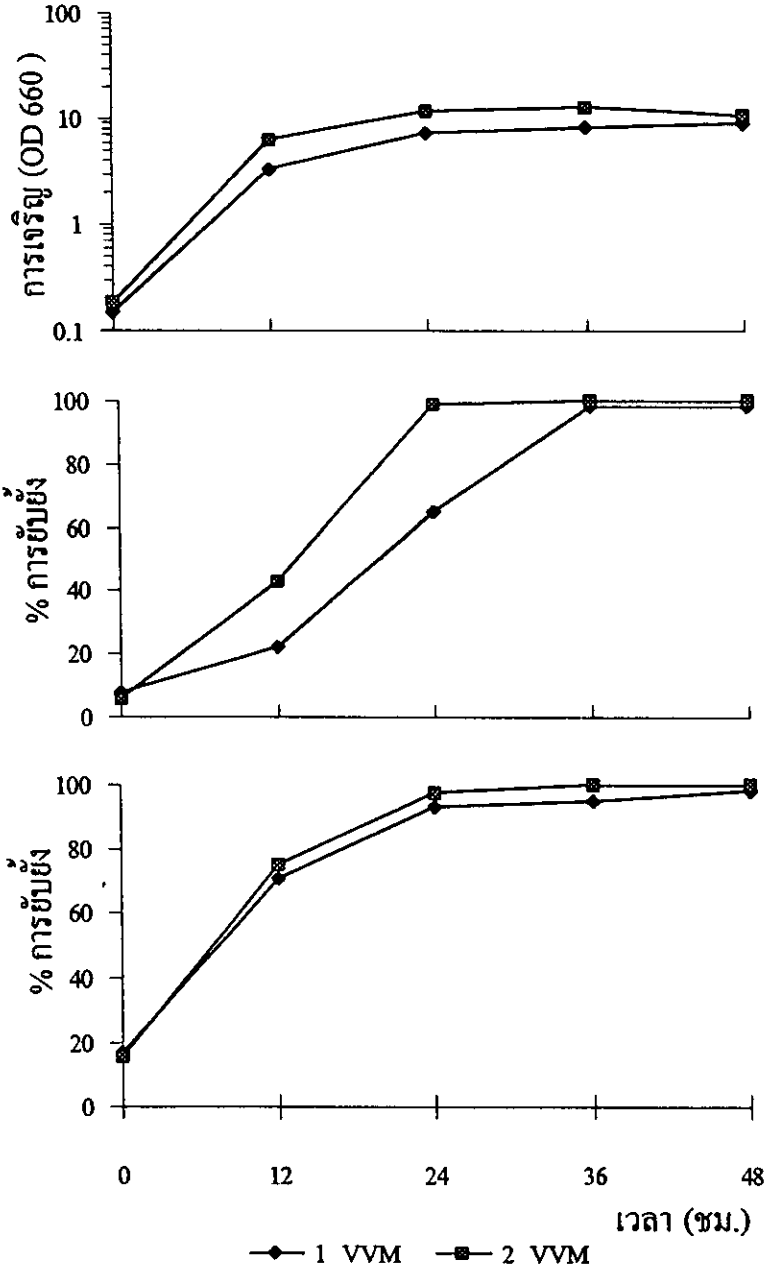
ภาพที่ 33 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* sp. LN 007

3. ผลของอัตราการให้อากาศ

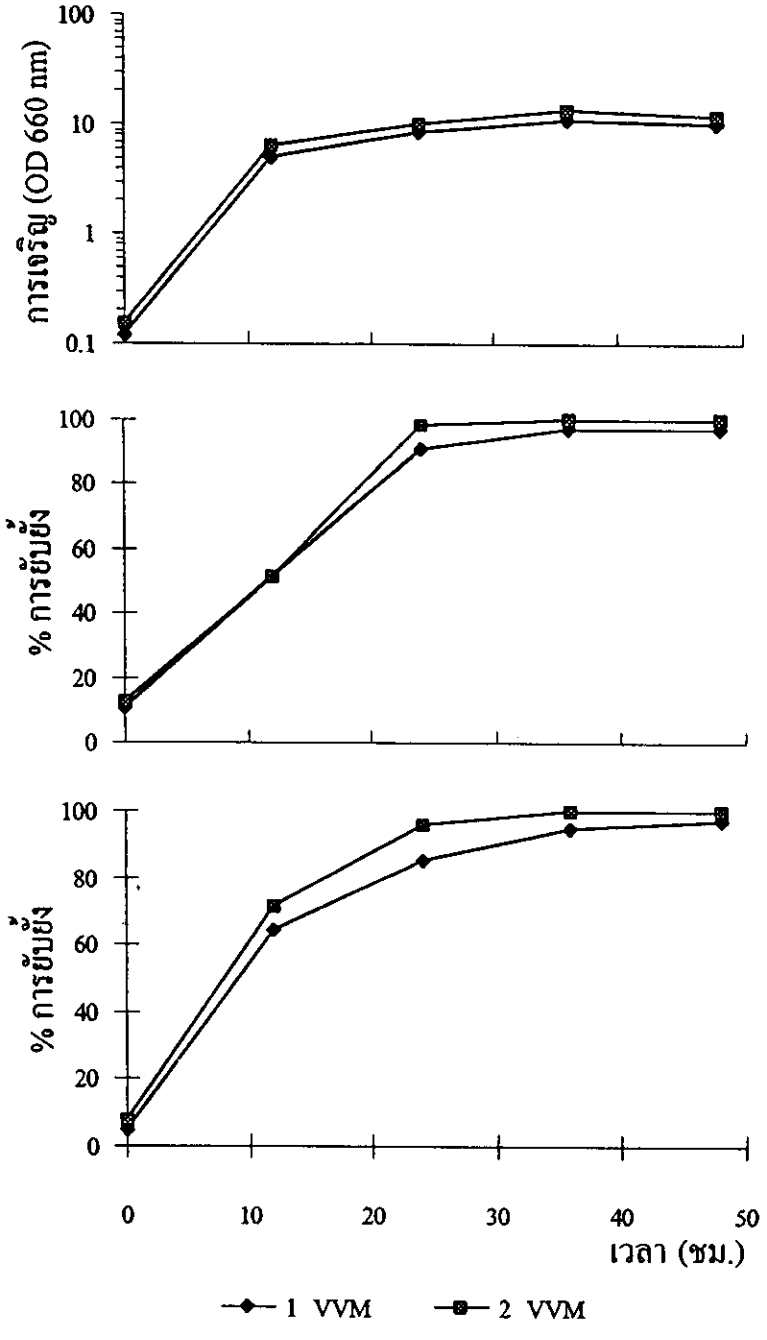
การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในถังหมักที่มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอช เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบอัตราการให้อากาศระหว่าง 1 และ 2 VVM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการให้อากาศ 2 VVM เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราได้ดี และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) 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 คือ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0-1.25 VVM และอัตราการกวน 100-150 รอบต่อนาที ส่วน Sen และ Swaminathan (1997) ผลิต Surfactin จาก *B.subtilis* DSM 3256 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Surfactin คือ อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียสใช้อัตราการกวน 140 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.75 VVM



ภาพที่ 34 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *B. subtilis* NSRS 89-24

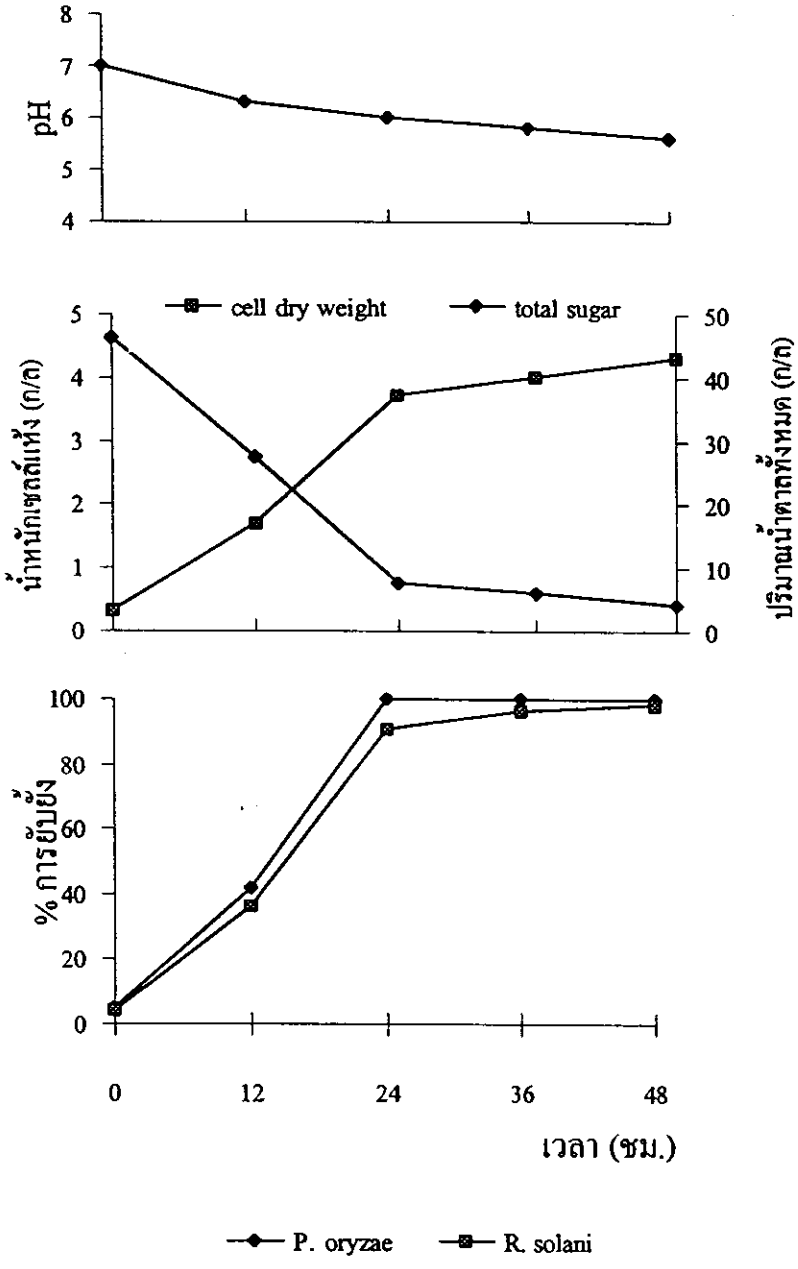


ภาพที่ 35 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* sp. LN 007

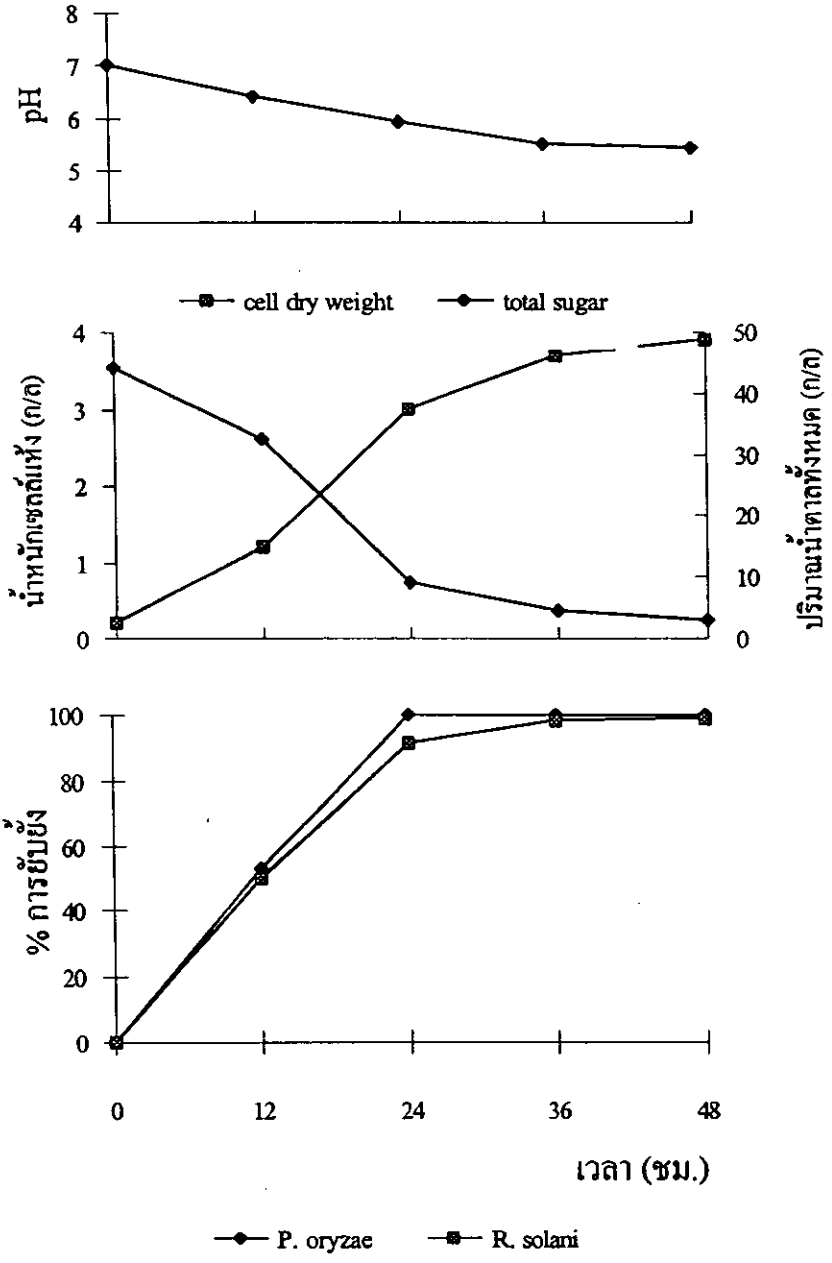
4. จลนพลศาสตร์ของการเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ของ *Bacillus* สองสายพันธุ์

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ระบบการหมักแบบกะซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยการเลี้ยงเชื้อในระบบปิด ซึ่งมีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัด โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 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

จากการทดลองนี้จะเห็นว่าเชื้อ*Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงของพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวคล้ายๆกัน



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



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

5. การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก Bacillus ในถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 100 ลิตร

5.1 การผลิตในถังหมัก 30 ลิตร

เนื่องจากจะต้องมีการใช้เชื้อ *Bacillus* เป็นจำนวนมากสำหรับทดลองในแปลงนา จึงได้ทดลองเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร และมีอาหารอยู่ 10 ลิตร ให้อากาศ 1 VVM อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35^{0}ซ โดยอาหารที่ใช้ประกอบด้วยโมลาส 5 % แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 % พบว่า *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 เจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง มีค่าความขุ่น OD 660 เป็น 9.5 และน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 25 ก/ล. เหลือ 3 ก/ล ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เมื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว พบว่าสามารถยับยั้ง *Rhizoctonia solaui* ได้ 94.12 % และยับยั้ง *Pyricularia grisea* ได้ 88.66 % เมื่อใช้น้ำหมักของเชื้ออายุ 36 ชั่วโมงขึ้นไป (ภาพที่ 38 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราของ *Bacillus* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในอาหารที่มีโมลาส 5 % และแอมโมเนียมซัลเฟต 1%)

การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในการผลิตอาศัยอุตสาหกรรม สามารถใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยที่ไม่จำเป็นจะต้องเติมแร่ธาตุอย่างอื่นอีก ก็ทำให้ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อรา สาเหตุโรคข้าวทั้ง 2 ชนิดได้

5.2 การผลิตในถังหมัก 100 ลิตร

เมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ในถังหมักขนาด 100 ลิตร โดยใช้อาหารเช่นเดียวกับ 5.1 แต่เพิ่มโมลาสเป็น 10 % ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 39 พบว่าเชื้อมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยที่มีน้ำตาลเหลืออยู่ 35 กรัมต่อลิตร สำหรับการสร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบว่ายับยั้งได้ 60-63 % เมื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ