วัสดุและวิธีการ

1.1 จุลินทรีย์

Bacillus LN 007 เป็นแยกโดยอาจารย์มานะ กาณจนมณีเสถียร 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)

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ มี Potato Dextrose Agar (PDA), Nutrient Broth (NB), Glucose – Asparagine mineral salts Medium (GAM), No. 3 Medium, Mckeen และ Glucose-Meat Extract Peptone Medium (GMP)

2. การวิเคราะห์

2.1 การเจริญของเชื้อ

วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดากรดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หรือ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (A.O.A.C, 1990)

2.2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Dobois et al., 1956)

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อราของสารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Mckeen et al., 1986)

2.3.1 การเตรียมสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

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

2.3.2 การเตรียมจานเพาะเชื้อรา

2.3.2.1 Pyricularia oryzae

เลี้ยงเชื้อในจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วใช้ cork borer

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบๆโคโลนี นำวุ้นที่เจาะได้ไปวางกลางจานอาหาร PDA จานใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (33 °C) 4 วัน จนได้โคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร

2.3.2.2 *Rhizoctonia solani*

เลี้ยงเชื้อในจานอาหาร PDA ใช้เชื้ออายุประมาณ 1 วัน ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.3.2.1

2.3.3 การทดสอบ

2.3.3.1 เตรียมอาหาร PDA double strength ผสมกับส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.3.1 ในอัตราส่วน 1:1 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ จานควบคุมใส่น้ำกลั่นแทนส่วนใส

2.3.3.2 เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้วให้นำเชื้อราจากข้อ 5.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางลงตรงกลางจานอาหาร

2.3.3.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วสังเกตุการเจริญของเชื้อรา โดยเชื้อรา *P. oryzae* จะใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน ส่วนเชื้อรา *R. solani* ใช้เวลาประมาณ 2 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีข่องชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม 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 โดยเปลี่ยนชนิดของน้ำตาลจากกลูโคส เป็น ซูโครส แลคโตส และ โมลาส (molasses) โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนชนิดละ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างควบคุมใช้อาหารเหลวตามสูตรอาหารที่คัดเลือกได้

2.1.2 ผลของปริมาณ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา จากข้อ 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

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

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

3. ศึกษาชนิดของ complex medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา

สารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือ โมลาส และที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน คือ น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ โดยทำการทดลองดังนี้

3.1 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 2 แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นโมลาส โดยให้มีความเข้มข้นของโมลาสเป็น 1.0 2.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมจากข้อ 2 แต่เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็นน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ที่มีความเข้มข้น 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข. การศึกษาการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก Bacillus โดยการเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ในการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา จะทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยเลี้ยง Bacillus ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนามี ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในถังหมักขนาด 3 ลิตร มีอาหารเหลวที่เหมาะสม (ซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาบนเครื่องเขย่า) ปริมาตร 1.5 ลิตรน โดยจะเก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 12 24 36 และ 48 เพื่อนำไปวัดการเจริญของเซลล์ วัดพีเอชและทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้ 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 (ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที)

3. ผลของอัตราการให้อากาศ

เลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการกวนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 แล้วทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการให้อากาศที่ 1 และ 2 VVM

4. ศึกษาจลนพลศาสตร์ในถังหมักของเชื้อ Bacillus 2 สายพันธุ์

เลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3 แล้วทำการ ศึกษาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

5. การผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราจาก Bacillus NSRS-89-24 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร

5.1 การผลิตในถังหมัก 30 ลิตร

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ในอาหารที่มีโมลาส 5 % เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักขนาด 30 ลิตร ที่มีอาหารอยู่ 10-20 ลิตร ให้อากาศ 1VVM อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35^0องศาเซลเซียส แล้วติดตามการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา

5.2 การผลิตในถังหมัก 100 ลิตร

ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ในอาหารตาม 5.1 ในถังหมักขนาด 100 ลิตร (ใช้ถังหมักของศูนย์เทคโนโลยีการชีวภาพที่มหาวิทยาลัยมหิดลดังกล่าว) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับ 5.1 (90 ลิตร) ติดตามการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา

ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* MK 007 ในอาหารที่มีโมลาส 3% เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 10% เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีการเติมแร่ธาตุตามอื่นๆ ตามอาหารสูตร Mckeen โดยใช้สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับ 5.1 ติดตามการเจริญและการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา