

<u>ชุด primer</u>	<u>ขนาดของ PCR product (bp)</u>
ชุดที่ 1 16S+A, 16S-D	533
ชุดที่ 2 16S+C, 16S-E	471
ชุดที่ 3 16S+D, 16S-F	553
ชุดที่ 4 16S+E, 16S-G	635
ชุดที่ 5 16S+F, 16S-H	490

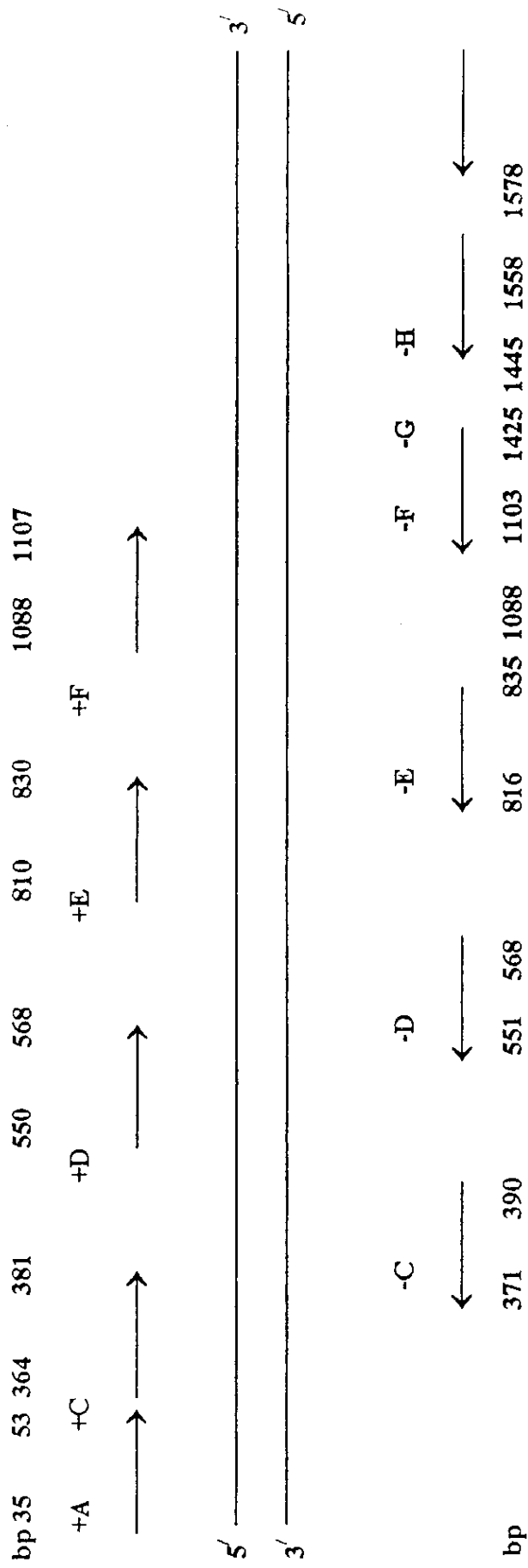
การสังเคราะห์ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR

1. เตรียม reaction mixture ใน 0.5 ml microcentrifuge tube (50 µl reaction)

ดีเอ็นเอ (150 ng/µl)	5	µl
10xbuffer (Promega)	5	µl
25 mM MgCl ₂ (Promega)	3	µl
50 mM dNTPs (Boehringer Mannheim)	8	µl
20 pmoles primer 1	2.5	µl
20 pmoles primer 2	2.5	µl
Taq polymerase (5 unit/µl) (Promega)	0.2	µl
sterile water	23.8	µl
mineral oil (Sigma)	50	µl

2. สภาวะที่ทำ

denaturation	94°C	1 นาที
annealing	50°C	1 นาที
extension	72°C	1.5 นาที
เป็นจำนวน 40 รอบ		



รูปที่ 1 ตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการสังเคราะห์ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (Edward *et al.*, 1989)

5.2 การจำแนกสายพันธุ์ของ *B. subtilis* โดยอาศัยความแตกต่างของ Repetitive DNA

ทำการสังเคราะห์ Repetitive DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer Rep1RI และ Rep 2I
การสังเคราะห์ Repetitive DNA โดยวิธี PCR (Versalovic *et al.*, 1994)

1. เตรียม reaction mixture ใน 0.5 ml microcentrifuge tube (25 μ l reaction)

ดีเอ็นเอ (150 ng/ μ l)	3	μ l
5x Gitscher's buffer	5	μ l
BSA(20 mg/ml)	0.2	μ l
100% DMSO	2.5	μ l
50mM dNTPs	1.25	μ l
50 pmoles primer Rep1RI	1	μ l
50 pmoles primer Rep2I	1	μ l
<i>Taq</i> polymerase (5 unit/ μ l)	0.5	μ l
mineral oil	25	μ l

2. สภาพะที่ทำ

ขั้นตอนที่1	95°C	7	นาที
ขั้นตอนที่2	94°C	1	นาที
ขั้นตอนที่3	44°C	1	นาที
ขั้นตอนที่4	65°C	8	นาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึงขั้นตอนที่ 4 เป็นจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนสุดท้าย 65°C 15 นาที

6. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

6.1 Agarose gel eletrophoresis

ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5% agrose gel ในสารละลาย 1xTBE buffer pH 8.0 หรือสารละลาย 1xTAE buffer pH 8.0 ทำการแยกสารโดยใช้กระแสไฟฟ้าตรงขนาด 100 โวลต์ในระดับคงที่ นาน 30 นาที ทำการย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide (0.5 µg/ml) แล้วนำไปส่องดูด้วย UV light transilluminator บริเวณที่มีดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นแถบเรืองแสง

หมายเหตุ ในกรณีที่ทำการศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ Repetitive DNA ด้วยวิธี PCR จะใช้ agrose gel และ Synergel 1.5% ในการแยกขนาดดีเอ็นเอ

6.2 การหาลำดับเบสของ DNA product โดยใช้ Automated DNA sequencer (Taq Dye Deoxy Cycle Terminator Kit, Applied Biosystems)

ในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยนำดีเอ็นเอที่ได้ 5 µl ผสมกับ Terminator premix (Taq Dye Deoxy Cycle Terminator Kit, Applied Biosystems) 8 µl, ชุด primer ของ 16S (3.2 pmole) 1.0 µl และ sterile water 6 µl แล้วปรับให้สถานะของ PCR ดังนี้คือ denaturation 96°C นาน 30 วินาที annealing 50°C นาน 15 วินาที และ extension 60°C นาน 4 นาที จำนวน 25 รอบ จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้มาเติมสารละลาย 3 M sodium acetate pH 4.5 ปริมาตร 3 µl และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute เอทานอลที่เย็นจัดในปริมาตรสองเท่า เก็บที่อุณหภูมิ -20°C นาน 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ทำให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วยสารละลาย deionized formamide : 50 mM EDTA pH 8.0 ในอัตราส่วน 5:1 ปริมาตร 4 µl นำไปต้มที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นจึงนำไปแยกบนแผ่น 6% polyacrylamide gel ที่มียูเรียผสมอยู่ โดยที่แผ่นเจลดังกล่าวจะใช้กับเครื่อง Applied Biosystems 373 DNA Automatic Sequencer ซึ่งทำหน้าที่วิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ผลการทดลอง

1. การเตรียมดีเอ็นเอแม่พิมพ์จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

จากการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียพบว่าโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 5 µg/ml ปริมาตร 100 µl (จาก culture 5 ml) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 12 kb และมีคุณภาพเหมาะสมสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โรโบโซมอลดีเอ็นเอและ Rep DNA โดยวิธี PCR ต่อไป

2. การสังเคราะห์ 16S โรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR

เมื่อนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ศึกษามาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับสังเคราะห์ 16S โรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วย primer ชุด +A/-H พบว่าจะได้ดีเอ็นเอขนาด 1500 bp และมีดีเอ็นเออื่นๆ ปะปนออกมาด้วย จึงจำเป็นต้องทำการตัดดีเอ็นเอดังกล่าวออกไปก่อนใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้ GENE Clean II kit (Lajolla, B101), QIAGEN II gel extraction kit หรือ QIAGEN PCR purification kit โดยดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการใช้ GENE Clean II kit (Lajolla, B101) จะมี ความสะอาดพอกับดีเอ็นเอที่ใช้วิธี QIAGEN II gel extraction kit แต่การทำความสะอาดดีเอ็นเอด้วย QIAGEN PCR purification kit จะให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำสุด

3. การศึกษาลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

3.1 การสังเคราะห์ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สะอาดแล้วมาเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบ nested PCR โดยใช้ชุด primer (A/-D), (C/-E), (D/-F), (E/-G) และ (F/-H) พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดไว้คือ 530, 470, 550, 630 และ 490 bp ตามลำดับ หลังจากนั้นก็เตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer

3.2 การหาลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Automated DNA Sequencer

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer นั้นจะศึกษาดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย ดังนั้นผลที่ได้จึงค่อนข้างแน่นอนและมีความผิดพลาดน้อยมาก จากการศึกษพบว่าสามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ประมาณ 80-90% ของความยาวดีเอ็นเอทั้งสาย เช่นสามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย primer ชุด (+A/-D) ของ *Bacillus* sp. LN002 ได้ประมาณ 490 bp จากดีเอ็นเอทั้งหมด 530 bp (รูปที่ 2)

เมื่อได้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอแต่ละสายแล้วจะนำมาหาลำดับเบสทั้งเส้นได้โดยอาศัยบริเวณที่มีลำดับเบสซ้อนทับกัน เช่นบริเวณปลาย 3' ของดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย primer ชุด (+A/-D) จะมีลำดับเบสตรงกันกับบริเวณปลาย 5' ของดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย primer ชุด (+C/-E) ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนกระทั่งได้ลำดับเบสของดีเอ็นเอครบทั้งสาย

จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่า 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *B. subtilis* ATCC6633, NSRS89-24, NSRS 89-26, ROI-I, *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 มีขนาด 1225, 1230, 1239, 1236, 1438 และ 1449 bp ตามลำดับ

CAATTCGAGC GGACAGATGG GAGCTTGTTT CCCTGATTTT AGCGGGCGGA	50
CGGGTGAGTA ACACGTGGTT AACCTGCCTG TAAGACTGGG ATAAATCCGG	100
GAAACCCGGG GCTAATACCG GATGGTTGTT TGAACCGCAT GGTTTCAGACA	150
TAAAAGGTGG CTTCGGCTAC CACTTACAGA TGGACCCGCG GCGCATTAGC	200
TAGTTGGTGA GGTAACGGCT CACCAAGGCG ACGATGCGTA GCCGACCTGA	250
GAGGGTGATC GGCCACACTG GGACTGAGAC ACGGCCAGACTCCTACGGG	300
AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTGACGGAGCAAC	350
GCCGCGTGAG TGATGAAGGT TTTCGGATCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA	400
AGAACAAGTG CCGTTCAAAT AGGGCGGCAC CTTGACGGTA CCTAACCACG	450
AAGCCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG	490

รูปที่ 2 ตัวอย่างลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยใช้แม่พิมพ์จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. LN002 แล้วสังเคราะห์ nested DNA ด้วยวิธี PCR ใช้ primer ชุด (+A/-D) แล้วหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer (Taq Dye Deoxy Cycle Terminator Kit, Applied Biosystems)

3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม PC/GENE

เมื่อนำข้อมูลของลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ศึกษามาเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงระหว่างกันด้วยโปรแกรม PC/GENE พบว่าลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus* แต่ละสายพันธุ์ที่ศึกษาจะมีความซ้ำกันและแตกต่างกันในบางตำแหน่ง (รูปที่ 3) และสามารถสรุปเปอร์เซ็นต์ความตรงกันของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus* ระหว่างสายพันธุ์ที่ศึกษา

%homology	BS	B24	B26	LN	MK	ROI-1
BS		58.53	61.71	66.69	66.29	63.43
B24			80.08	83.58	75.85	51.14
B26				65.94	65.21	57.85
LN					94.37	50.89
MK						57.61

หมายเหตุ BS, ROI-1, B24, B26, MK และ LN หมายถึง *B. subtilis* ATCC6633, ROI-1, NSRS89-24, NSRS89-26, *Bacillus* sp. MK007 และ LN002 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างระหว่างลำดับเบสบริเวณ 16S
 ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียเป็น 4 กลุ่ม
 คือ กลุ่มที่ 1 *B. subtilis* ATCC6633, กลุ่มที่ 2 *B. subtilis* ROI-I, กลุ่มที่ 3 *B. subtilis* NSRS
 89-24 และ NSRS89-26 และกลุ่มที่ 4 *Bacillus* LN002 และ MK007

กลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633 และ ROI-I นั้นจะมีลำดับเบส
 แตกต่างจาก *Bacillus* ทั้งหมดที่ศึกษาและระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 ก็มีความแตกต่างกันอย่าง
 ชัดเจน ในขณะที่กลุ่มที่ 3 พบว่ามีความคล้ายคลึงของลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอล
 ดีเอ็นเอระหว่าง *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26 สูงถึง 80% และพบว่าในลำดับเบส
 ที่ 500-1000 ของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ NSRS89-26
 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกัน 64% มีลำดับเบสแตกต่างไปจาก *Bacillus* สายพันธุ์อื่นๆ
 ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ จัดเป็นตำแหน่งที่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *Bacillus* ที่
 ศึกษาเหล่านี้มากที่สุดโดยที่บริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่สามารถสังเคราะห์ด้วย primer ชุด
 (+D/-F) เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณที่ 500-1000 ดังกล่าวข้างต้นเพื่อหาจุดตัดของเอนไซม์
 ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม PC/GENE แล้วได้ ข้อมูลดังนี้คือแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้จะมี
 จุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งแตกต่างกัน จึงทำให้สามารถใช้เป็นวิธีหนึ่งที่จะ
 จำแนกแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันเบื้องต้นโดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจาก
 ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็น 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วย primer ชุด (+D/-F) ย่อยด้วยเอนไซม์
 ตัดจำเพาะแล้วใช้ผลที่ได้จากการทำ gel electrophoresis มาเปรียบเทียบแบบแผนของชิ้น
 ดีเอ็นเอที่จะสามารถบ่งชี้ได้ว่าดีเอ็นเอที่ศึกษานั้นควรจะเป็นของ *B. subtilis* NSRS89-24 หรือ
 NSRS89-26 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถใช้ในการจำแนกแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ออก
 จากกันได้ได้แก่ *AccI*, *AflIII*, *ApaI*, *AsuI*, *BinI*, *HgiIII* และ *MboI* ซึ่งสามารถตัดดีเอ็นเอของ
B. subtilis NSRS89-26 ได้เพียงสายพันธุ์เดียว

ในกลุ่มสุดท้ายพบว่าลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 มีความคล้ายคลึงกัน 94% และเป็นกลุ่มที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ *B. subtilis* เมื่อพิจารณาลำดับเบสบริเวณที่ 700-1350 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันถึง 96% พบว่าเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกันมากกับ *Bacillus* สายพันธุ์อื่นที่ศึกษาและเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด บริเวณนี้สามารถสังเคราะห์ได้ด้วย primer ชุด (+F/-H) ในทำนองเดียวกันก็สามารถใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม PC/GENE ซึ่งพบว่าสามารถแยกแวกที่เรียทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันได้โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็น 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วย primer ชุด (+F/-H) แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ *Mbo*II ซึ่งมีจุดตัดที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. MK007 เพียงสายพันธุ์เดียว

Bs	---CCGAAGTTATCATACATGGACTGCCGATGAGCGAATACA--CCAGAC	45
ROI-1	-----ATACGAGTAGACGTGGTCCGCTGCA-TGCTGA--CG--CATAAC	39
B24	-----ACG-----TCCGGTCCTATAA---TCATT--	21
B26	-----A-----GCAGT-----	6
MK	GAACAGTTGCTTAGGGTGAACGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC	50
LN	-----CAATTC	6

Bs	TGATGA---TAAAGCGTGTCTAACTACCCGATGCT---ATAGTGTGCAG	88
ROI-1	AGTAGTGGTCTTTAGCAAG-AATCATCCCGATACT---CGGTGGTTCAA	85
B24	GA--GCG-AC-GTGG-AGTGT-----CCTA--TTTAGCG--CG-A-GG	53
B26	-G--GCG-ACAGTGG-ACTTT-----CCTG--TTTA-CG--CG-ACGG	38
MK	GA--GCGGACAGATG-GGAGCTTGCTTCCCTGATGTTAGCGG-CGGACGG	96
LN	GA--GCGGACAGATG-GGAGCTTGTTCCCTGATTTTAGCGGGCGGACGG	53

. . . * . . . **.. * . * . .

Bs	AT-----TCCCGATGTA-----CGAGTGTG-CGACATTT---CC--GA	120
ROI-1	GA-----ACTCGTGGAA-----CCGGAAAGTCTGAATAG---CTTTAA	120
B24	-TGGTAAAGTGGTA-----CT--CCTTAAGA---TGGATAATC---GG	87
B26	-TGATAAACTGGTA-----CT--CCTTAGAT---GGATAATTC---GG	72
MK	GTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA	146
LN	GTGAGTAACACGTGGTTAACTGCC-TGTAAGACTGGGATAAATCCGGGA	102

. . * . . * * . .

Bs	TGTTATAGAGC--ACGCAGTCATCATGTGAT-----CAG-GCACGCTCT-	161
ROI-1	GGCCTAATTGC--GCTCCA-CTAGTTGAGTG-----CGTGGCACT-ACGG	161
B24	AACC---GG-CTA-TACCGGATG-TTGT--GACCGCATG-TTCATACTA	128
B26	AACC---GGGCTA-TAC-GGATG-TTGT--GAC-GCATG-TTCAAACTA	112
MK	AACC-G-GGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACAT	194
LN	AACCCG-GGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACAT	151

.. . . * . * . . **.. *.. . * . * .

Bs	--TAGATCTAGACA--GAC-ATGTACTGATGACCAATACTAGCGTACTGA	206
ROI-1	GGAAAGGTCAGCACT-CAGCGAAGTCCGGCAGATCTAGCCAGGCGGTACCA	210
B24	AAA--GTGG-TTCGG-TACCA-TTACAGATGA--CCGCGGCGCATTAGCT	171
B26	AA---GTGG-TTCGGCTACCACTTACAG-TGA--CCGCG-CGCATTAGCT	154
MK	AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT	244
LN	AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT	201

.* .*. ..* * .*.*. .*. . **... ..

Bs	AACCGAATATTTGTC-----CATCAA-----CCGATC--AT	236
ROI-1	AATCTAAGCGGTAA-----GTACA-----CGAAGC--AC	239
B24	AGTTGT--GAGTAACGGCTCACCAG-CGACGATG-GTATCCGACCTGAG	217
B26	AGTTGT--GAGTA-CG-CTCACCA-G-CGACGATCGGTATCCGACCTGAG	198
MK	AGTTGGTGAGGTAAACGGGTGACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGACCTGAG	294
LN	AGTTGGTGAGGTAAACGGGTGACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGACCTGAG	251

. * ..*. * .* * *

Bs	TTG----TC--CAGCTACAT--TC-----CTAATT--TCTACAAC	266
ROI-1	GTGGAGAACACAGCATCAA--CCTGTTG---GGCCTATA--CCCATGTC	282
B24	AGG-TGATCGGCCACA-CTGG-ACTG-GACACGGCCC-TACTC-TACGGG	261
B26	AGG-TGATCGGCCACA-CTGG-ACTG-CACACG-CCA-GACTC-TACGGG	241
MK	AGGGTGATCGGCCACA-CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG	343
LN	AGGGTGATCGGCCACA-CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG	300

..* .* * .*. * * .. * ..

Bs	-AACTGC--TAATT-ATCTAT--CGAT-GACA-----C---CGGTGATG-	300
ROI-1	GAACAGC--GAGGAGATCATATACATTTGACA-----C---TAGTGATCC	322
B24	AGGCAGCAGTAGGGA-TCTTCCGCAATGGACGAAA-TCTGACGGAGCAAC	309
B26	AGGCAGCAGTAGGGA-TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC	290
MK	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC	392
LN	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC	350

..*.* .*... **.. *..* ***. * .*. *

Bs	-----TGAGTTTGGTTGTA-AGGTTGTTAGGAG	327
ROI-1	AC-----TCTCCTCCTCTGAC-CACAAGCGGGTTT	351
B24	GGCGCGTGAGTGATGAAG-TTTTCGGATC-TAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	357
B26	GGCGCGTGAGTGATGAAG-TTTTCGGATC-TAAAGCTCTGTTGTTAGG-A	337
MK	GGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	443
LN	GGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	400

* . * * . * . .

Bs	ACAATA-----CGTTGATAGGCG-----TACTTGACGTACTAAC--CGAA	365
ROI-1	CCAATGAAGGCCGGTTGAATGT-----TCCAAGGCCAATTAACTGCAAT	396
B24	AGAACAA-TGCCGTTCAAATAGG-CG-CAC-TTGACGTACGGAC--CAGA	401
B26	AGAACAA-TGC-GTTCAAATAGG-CGGCAC-TTGACG---GTAC--CT-A	377
MK	AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGCGCGGCACCTTGACG---GTAC--CT-A	487
LN	AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGCGCGGCACCTTGACG---GTAC--CT-A	444

** . * . * . * * . * . . * . * . .

Bs	GCC-----ACGCTAATA-----GTGCCA-CAGCCGCG-----TAATAG	397
ROI-1	TCC-----CAACAA-----GCC--CGGACATC-----CATTAT	422
B24	ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG-	450
B26	ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG-	426
MK	ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG	494
LN	ACCACGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG	537

. ** . * . . *** * . * *

BS	TAGTGCA-GTTGTCCGAATTATT--GGC--TAAAGGGTTGCAGGCG--TT	440
ROI-1	ACGCGGT-GTTGTCC--ATTATT--AGC-----GGGATTGTTGG-----	456
B24	TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT-GGGCGTAAAGGGC--GCAG-CGGAAT	496
B26	TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGC-CGCAG-CGGTTT	474
MK	TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTT	587
LN	TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTT	544

. * . . ***** * . * . * . ** . ** * . *

Bs	CTTAATT--TGATTGAAAGCCC-CCGTTACCGGGAGGTC--CATTGGAA	485
ROI-1	---ATTA--AGTACGGAAGTACGCCGATTAACGTAGGAAGTACAAAACGG	501
B24	TCTAAGTCTGA-ETGAAAGCCCCCGGCTCA-CCGGGGAGG-TCATTGGAA	543
B26	CTTAAGTC-GA-TTGAAA--CCCCGGCTCA-CCGGGGAGG-TCATTGGAA	518
MK	CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA	637
LN	CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA	594

... ... ** * * * * ...*.. **... ..

Bs	ACTGGG-AACTTGAGTGCAGAGAGGAGAGTGGAAATNCCACTGTAG-CGG	533
ROI-1	ACTTAC-ACCTGCCCAGC-GTCTAGTCGAGTAACCCGTCACCGGAGTCTG	549
B24	ACTGGGGAAC TTGA-----TGCAGAGAGATGGAAT-CCACTG--TACGG	585
B26	ACTGGGGA-CTTGAGTGAATTCAAAGAGAGATGAAT-CC-CGT--TACGG	563
MK	ACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGG	687
LN	ACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGG	644

***.. * **.. * * . . **.

Bs	TGAAATGCTAGAGATGTGGAGAACAC-C---ATGCCAAGA-----AGCTG	574
ROI-1	GAATGGGACTGATCGAGAGAATGATCAC---TTACGT--A-----ATCTA	589
B24	TGAAATGCGTAAGATTGAG-----AACAC--ATGGCAAG-CATC--TCTG	626
B26	TGAAATGCGTAAGATTGAG-----A-CAC--ATGGCA-A-G-CATCCTTCTT	604
MK	TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG	737
LN	TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG	694

..*...** * * ...*.. .**.

Bs	G-TTGAGACCCATGAGGGATTTGTACAACTGAGGGTACTG---GGA--	618
ROI-1	AATTGAGACACATGCAAGCATCCTGTCGTACGACCGAGACAA-CTGGA--	636
B24	GTCG--TACT-G-----ACA-ACTGGG--	644
B26	G-CT--ACCTAG-----ACAGACTGGG--	623
MK	GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAT--TGCGTGGGGAGCGAAGAGGATT	785
LN	GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA--AGCGTGGGGAGCGAAGAGGATT	742

. . . * . . * . **.

Bs	-----CACAGATGTACT-GTATCACC-----CTAAGAGATGT----AGGT	653
ROI-1	-----CACAGATAAACC-GTATCACC-----CTAACAGATCA----GTTA	671
B24	----ACACAGATAAACCGGTATCACC-----CTAACATATCTA----TTA	681
B26	----ACAGAGATAAACCGGTATCGCC-----CTAACAGATGTA----TTA	660
MK	AGATACCCTGGTAGTCCA----CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA	831
LN	AGATACCCTGGTAGTCCA----CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA	788

* .*. *... * *. ** *. *. *...

Bs	GGGTTCCGCTTATGTCAGTAGCTTAC-ATCCCT-GG-GATCGTGCAGATG	700
ROI-1	GGGTTCCGCCCTTA---TGTAAGTACCTAACCCGCGG-GATCGC-CAGT--	714
B24	GAGGGTTTC---CGCC-----CTTTAATGC-TGCAGTTAACGC-----	715
B26	GGGTTCCGTCTATCTCT-----CTACCTAGCCTGCAGGGATCGC-CGATAA	704
MK	GGGGGTTTC---CGCC-----CCTTAGTGC-TGCAGCTAACGC-----	865
LN	GGGGGTTTC---CGCC-----CCTTAGTGC-TGCAGCTAACGC-----	822

*. *... . * * . ..* . . * ... **

Bs	AATCAAGATGACGGGCCGACAGGTGGATTGTTATTGGGAACCGAGACTAC	750
ROI-1	AATCAAGTTGNCGGGCC-CCACGTGTCTTGTTATCA-ACACCGAGACTAC	762
B24	-ATTAAG----CACTCCGCC---TGG--GGAGTACGGCCGC-AAGGCTG-	753
B26	TAAGATG----CGGGCCGACAGGTGG--AGGTTATTGACAG-GAGACTAC	747
MK	-ATTAAG----CACTCCGCC---TGG--GGAGTACGGTCGC-AAGACTG-	903
LN	-ATTAAG----CACTCCGCC---TGG--GGAGTACGGTCGC-AAGACTG-	860

*. *. * *. ** * **. *. *... . . . **. **, .

Bs	-GTTGCTCAGGAACCAATAGACTCCCT---CGGGAATAAGTGTCTGTG	796
ROI-1	AGCTGAAGTCCGACACCATG-AGGCTCCCT---CGGGATTAAGTGTCTGTG	808
B24	--AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-----CG---CACAAAGCGGTGGA	793
B26	GTTGACTCTTACATCTGGT-AGACTCCTTGCGCGGGACGTGTCTGTGTG	796
MK	--AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-----CG---CACAAAGCGGTGGA	943
LN	--AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-----CG---CACAAAGCGGTGGA	900

.. *. *. ** ** **. **..

Bs	TCTCACCTTCTAATTGGTAATCCACACCAC-CTGACTATGCACATCATT	845
ROI-1	TCTCACCTTCTAAGTGGTAATCCACGCCAC-CTGACTATGCACATCATT	857
B24	GCATGTGGTTT-----AATTCGAATAGC-CTTAC----CAGGTCT-T	829
B26	TGGTGTGGGAAGTG--GAARATCCGCAGGGCACTGTCTATGCCGATCAGT	844
MK	GCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCCAAGAAC---CTTACCAGGTCT-T	989
LN	GCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCCAAGAAC---CTTACCAGTTCT-T	946
	. * * . . . * * * . * . * .	
Bs	GGC--CCTAGTATG---CGTACAACGAGAAGTGGATACTCA-CTCTGCCCT	889
ROI-1	GGC--CCTAGTATG---CGTACAACGAGTAGTGGGAAGTCAAGTCTCCCT	902
B24	GACATCC----TC-TGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTC----CTTCGG	870
B26	GGCATTAGTGATCGTGACAACC---GAGAGTGGGAGAGTC----AATCT-	886
MK	GACATCC----TC-TGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCC----CTTCGG	1030
LN	GACATCC----TC-TGACAATCCTAGAGATAAGGCGTCCC----CTTCGG	987
	* . * . * . * . * . * . * . * . * .	
Bs	ATAC-G-GTACCCTGTAAATGACGACAAGTATAACCAGTACTATCCAATCG	937
ROI-1	ATACTG-GTACCCTCTCATGACGAG-----CGGTACTGTC-ATAGG	941
B24	GAGCAGAGTGACAGGTGGTG-CATGGTTGTCGTC-AGCTCGTGTCTGAG	918
B26	-ATCC-TTTGACTGGTAAGGCATGGACGGTTACTAGTACG-GCCCTATG	933
MK	GGGCAGAGTGACAGGTGGTG-CATGGTTGTCGTC-AGCTCGTGTCTGAG	1078
LN	GGGCAGAGTGACAGGTGGTG-CATGGTTGTCGTC-AGCTCGTGTCTGAG	1035
	.. * . * . * . * . * . * . * . * .	
Bs	T----CCTCGACCAATCACCATCTAAGGATC--CATACCGA-----	972
ROI-1	A----CCTCATAACGTGTCAATCGTGGAATC-----GCCGAAACCAATAA	982
B24	-TGAACCGCATGCTTCCGCATAAATCCAGCAGCCGCCAGTATCGTAAG	967
B26	-TGAACCGCATGCTTCCGCATAAATCCAGCAGCAGCCAGGAATCGAAAA	982
MK	ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA-----CGAGC-GCAACCCCTTGATCTTAGT	1122
LN	ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA-----CGAGC-GCAACCCCTTGATCTTAGT	1079
	 * . * . * . * .	

Bs	CCGATGC-TGTCTAGGGGTCTCG-TAAACCGC-----CGATA---C	1008
ROI-1	CCGATGCCTGTCTAGGGGTCTCGCTAAAGCGC-----CGATA----	1019
B24	TATTGG--TTTTGAGCAGTACCTCGATGTCGCTATATCCATCAGTAAGCC	1015
B26	TACTAGGCCTTTTGAAGCAGTGCCTCGATATCG-TTTAAGCATCAATAACCC	1031
MK	T-----GCCA-----GCATT-----CAGTTGGGC	1141
LN	T-----GCCA-----GCATT-----CAGTTGGGC	1098

* . * * . . *

Bs	GTGCACTG--ACGCCAAACA-ACCGAGA-TATTC-TGGCTGTCAGC-TGA	1052
ROI-1	--GCGCTACCACGCCAARCAGACCGAGACAATTC-AGGCTGGCAGCCTGA	1066
B24	TCTCAAAATTCTAGCCGAACCTACTTTATAATTCCGTGTGGGCCAGTCTGG	1065
B26	TAT-ACATTCTAGCTGAACCTACTTTATAAGTTTCGTGTGGGTCAGT-TAG	1079
MK	ACTCTAAGG-TGACTG-----CCG---GTGACAAACCGG	1171
LN	ACTCTAAGG-TGACTG-----CCG---GTGACAAACCGG	1128

. * . * . * ** . ..

Bs	TTGTGATTAACTAGATGTGCGTACG-AGATCCAATACGTGTGTATCGT-A	1100
ROI-1	TTGTGATTAACTAGATTAGCGTGAGGAGATCCAGTACCTGAGTATCGTGA	1116
B24	TTTATGT-ATCTCGAAGTGACGGCTACGAGTCTCAGTATAGTTCTCTATA	1114
B26	TTTATGT-ATATCGAAGTACAGT-TACGAGT-TCAGTGTAGTTCTCGAGA	1126
MK	AAGAAG-----GTGGGGATGACTTCAAATCA-----TCA---	1200
LN	AGGAAG-----GTGGGGATGACGTCAAATCA-----TCATG-	1159

. * * . ** .

Bs	GAACTGAGATAG-GTAACAC-CAGATTGGAAAGC-TACACGCCA--GGAT	1145
ROI-1	GAACTGAGATAG-GTAATCCTCGATTGGGAAGCATGCACGCGGAGGGAT	1165
B24	-TCGTTTCCTTGCGATATCTTCGATATTAGAGG-----GCGATATTAG--	1156
B26	GTAGTTTCCTTGCGATATCTTCGATTTATAAAG-----GCGC-ATTAG--	1168
MK	-----	1200
LN	-----CC---C-----CTT-----ATG-----AC---CTGGG--	1175

Bs	CCGGCGACACATT-ATCGCGG-ACCATGAATAAATCGGTTTTAACTGGTT	1193
ROI-1	CCCCCGACACATTTATCGCGGGACCATGAATA---CAA-----	1200
B24	-CGTCGA-TCG-----CTTGGGACAGTATTATAGCCGC-----AGCAG--A	1193
B26	-CGTCGA-GCG-----ATTGGACAGT-----AGTCTC-----ATC-----	1196
MK	-----	1200
LN	-CTAC---ACA-----CGTG-----C---TACAA--T	1193

BS	GGAGGAC	1200
ROI-1	-----	1200
B24	GGCCGAA	1200
B26	---CGCA	1200
MK	-----	1200
LN	GGGCAGA	1200

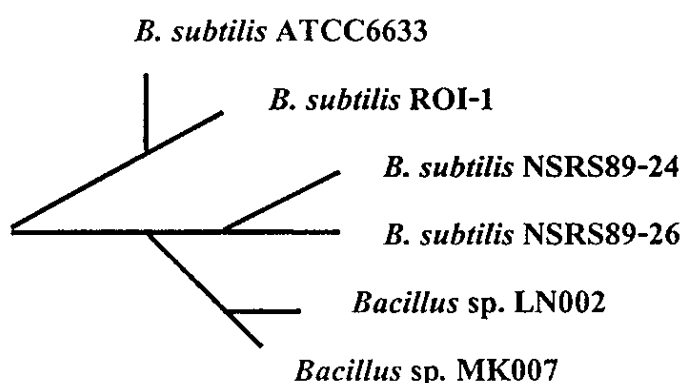
รูปที่ 3. การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus* สายพันธุ์ที่ศึกษาโดยใช้โปรแกรม PC/GENE

หมายเหตุ * หมายถึง บริเวณที่มีลักษณะเป็น highly conserved sequences
 . หมายถึง บริเวณที่มีลักษณะเป็น conserved sequences
 — หมายถึง บริเวณที่มีดีเอ็นเอขาดหายไป

BS, ROI-1, B24, B26, MK และ LN หมายถึง *B. subtilis* ATCC6633, ROI-1, NSRS89-24, NSRS89-26, *Bacillus* sp. MK007 และ LN002 ตามลำดับ

3.4 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มแบคทีเรีย

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่าง *Bacillus* สายพันธุ์ที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอแล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (PC/ GENE) (รูปที่ 4) พบว่า *B. subtilis* NSRS89-24, NSRS89-26, *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 มีวิวัฒนาการของสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมากกว่า *B. subtilis* ATCC6633 และ ROI-1

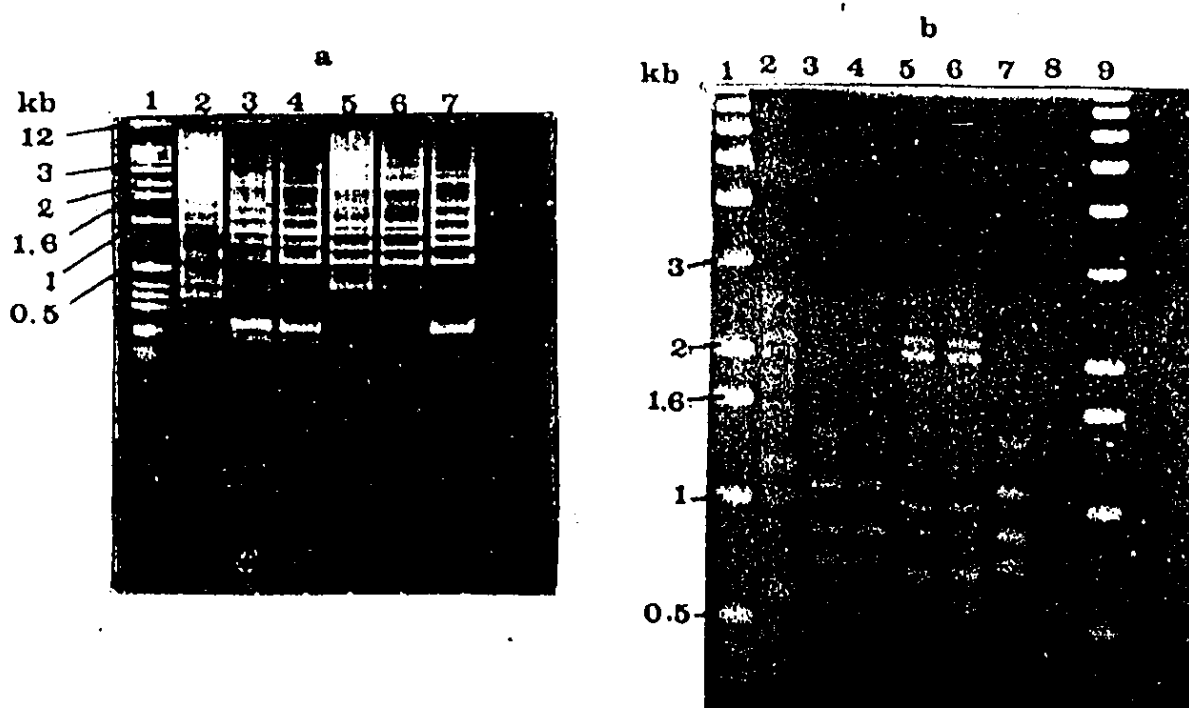


รูปที่ 4 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Bacillus* สายพันธุ์ที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลของความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PC/GENE

การศึกษาความคล้ายคลึงหรือความเป็นไปได้ที่ *Bacillus* สายพันธุ์ที่ศึกษาจะมีข้อมูลทางด้านลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่จัดอยู่ใน *Bacillus* sp. ที่มีฐานข้อมูลอยู่ใน library เช่น GenBank EMBL หรือ DDBJ จึงได้มีการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่อยู่ในสกุล *Bacillus* เช่น *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulan*, *B. polymyxa*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* และ *B. stearothermophilus* ซึ่งลำดับเบสของดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันมากพบว่าลำดับเบสของ *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรียในกลุ่มนี้มากที่สุดกล่าวคือมีความคล้ายคลึงกันประมาณ 90% ในขณะที่ *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26 มีความคล้ายคลึงกับ *B. stearothermophilus* ประมาณ 70% และ 80% ตามลำดับ

3.5 การศึกษาแบบแผนของ Rep DNA ของ *Bacillus* sp. ที่สังเคราะห์โดยวิธี PCR

จากรายงานความก้าวหน้าของโครงการการพัฒนา Antagonist *B. subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าวในส่วนที่ติดตาม *Bacillus* สายพันธุ์ที่เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อโรคข้าว ได้ใช้แบบแผนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์โดยวิธี PCR ใช้ primer ชุด (REP1RI/REP2I) พบว่าแบบแผนของดีเอ็นเอของแบคทีเรียแสดงความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ที่ศึกษา ในรูปที่ 5 แสดงผลการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียที่ศึกษาออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 *B. subtilis* ATCC6633, กลุ่มที่ 2 *B. subtilis* ROI-I, กลุ่มที่ 3 *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS 89-26 และ กลุ่มที่ 4 *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 โดยที่แต่ละกลุ่มมีแบบแผนดีเอ็นเอใกล้เคียงกันมากและจะแตกต่างกันเฉพาะความเข้มของแต่ละแถบเท่านั้น



รูปที่ 5 gcl electropherogram ของแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี Rep PCR โดยใช้ primer ชุด REP1RI/REP2I วิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์นท. 1 ชั่วโมง (a) และใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 16 โวลต์นาน 24 ชั่วโมง (b) แถวที่ 1 และ 9 : 1 kb DNA Ladder, แถวที่ 2-7 : *B. subtilis* ATCC6633, NSRS89-24, NSRS89-26, *Bacillus* sp. LN002, MK007 และ *B. subtilis* ROI-1 ตามลำดับ

อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

1.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

การหาลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยการ subcloning ของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ แล้วศึกษาลำดับเบสของยีนโดยอาศัยวิธีของ Maxam และ Gilbert หรือ Sanger (Rossau *et al.*, 1988, Wilson *et al.*, 1988, DeParasis and Roth, 1990) หรือการหาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated sequencer (Dubilier *et al.*, 1995) แต่ในการศึกษครั้งนี้ได้ทำการหาลำดับเบสจาก 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยการสังเคราะห์ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR แล้วต่อด้วยการทำ nested PCR เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่ใหญ่มากนักเช่นประมาณ 400-500 bp และแต่ละชิ้นของดีเอ็นเอก็มีบริเวณที่เหลื่อมล้ำกัน การศึกษาวิธีนี้ทำได้ง่ายและทำให้ทราบลำดับเบสได้รวดเร็วในขณะที่การหาลำดับเบสโดยวิธี cloning จะใช้เวลามากกว่ากัน การหาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequencer จะให้ผลที่รวดเร็วและมีความแม่นยำและสามารถตรวจสอบได้ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองหลายครั้งเพื่อความแน่ใจว่าลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้ ถูกต้องในแต่ละสายพันธุ์

การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอในแบคทีเรียเพื่อใช้ในการแบ่งแยกชนิดของแบคทีเรียได้ทั้งระดับ genus, species และ isolates นั้นได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายและจากการศึกษาดังกล่าวพบว่าลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอในแบคทีเรียมีความเหมือนและแตกต่างกันในบางส่วน เช่นลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Encephalitozoon cuniculi* จะแตกต่างจาก *Vairiormorpha necatrix* และ *E. coli* (Zho *et al.*, 1993) นอกจากนั้นยังพบว่าในแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกันหรืออยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีลำดับเบสบางบริเวณที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสที่มีความคล้ายคลึงกันมาก (highly conserved sequences) ทำให้สามารถใช้ข้อมูลจากลำดับเบสบริเวณนี้สังเคราะห์เป็น primer สำหรับ PCR เพื่อศึกษาลำดับเบสของแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่นการศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Acholeplasma sciffertii* (Castillo *et al.*, 1993) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม Sulfur-oxidizing bacteria (Distal *et al.*, 1988)

จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอในแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียเป็น 4 กลุ่มคือ (1) *B. subtilis* ATCC6633, (2) *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26, (3) *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 และ (4) *B. subtilis* ROI-1 โดยที่ *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26 มีตำแหน่งและจำนวนเบสที่ตรงกันประมาณ 80.08% *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 มีตำแหน่งและจำนวนเบสที่ตรงกันประมาณ 94.37%

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ *Bacillus* กลุ่มนี้กับ *B. cereus*, *B. coagulan*, *B. fusiformis*, *B. polymyxa*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, และ *B. thuringiensis* พบว่า *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 น่าจะเป็น *B. subtilis* ในขณะที่ *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26 น่าจะเป็น *B. stearothermophilus*

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอเทียบกับค่า % G+C content ของแบคทีเรียพบว่าจะให้แผนภาพของความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแตกต่างกันทั้งนี้เนื่องมาจากการหา % G+C content จะทำการศึกษาในโครโมโซมอลดีเอ็นเอทั้งสายซึ่งจะมีค่าแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียต่างสายพันธุ์กันจะมีการเรียงตัวของเบสแตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อทำการศึกษาลำดับเบสบริเวณใดบริเวณหนึ่งของแบคทีเรียก็ย่อมจะให้ค่าแตกต่างกันและในบางครั้งพบว่าแบคทีเรียที่มีค่า % G+C content ใกล้เคียงกันมีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการหาค่า % G+C content ก็เป็นข้อมูลที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียได้ในเบื้องต้น (Statey *et al.*, 1989)

2. การจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus*

ในการแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* ออกจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในข้าวในเบื้องต้นโดยใช้วิธีทางจุลชีววิทยาและตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเช่น สีและลักษณะของ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ การดิสซัยมแกรม ตำแหน่งของสปอร์เมื่อคว่ำด้วยกล้องจุลทรรศน์ คุณสมบัติการให้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งพลังงาน เป็นต้น (MacFaddin, 1980) แต่ก็ไม่สามารถบ่งชี้ความจำเพาะเจาะจงของสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* เหล่านี้ได้ อนึ่งการจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยใช้วิธีทางจุลชีววิทยาและลักษณะทางชีวเคมีนั้นมีหลายขั้นตอนและใช้เวลานานในการทดสอบจึง จำ

เป็นต้องใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งในขณะนี้สำหรับการจำแนก สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในเวลาที่รวดเร็ว วิธีดังกล่าวได้แก่ การจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RFLP ARDRA (Ampified Ribosomal DNA Restriction Analysis) RAPD (Random Ampified Polymorphic DNA) การทำ DNA fingerprints ในบริเวณต่างๆของ ดีเอ็นเอ เช่น Rep หรือไรโบโซมอลดีเอ็นเอ รวมถึงการจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ถึงแม้ว่าการจำแนกสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอนั้นจะให้ผลที่แน่นอนและแม่นยำ แต่วิธีการทำไม่ถนัดนักและใช้เวลานาน การใช้ความแตกต่างของแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่าง 16S และ 23S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอและการทำ Rep PCR จึงเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องมาจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่าทั้งในแง่ของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการตรวจเช็คผลของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้แต่ต้องศึกษาในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่ใกล้เคียงจำนวนมากเพื่อให้ได้แบบมาตรฐาน แต่การทำ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอจะให้ผลดีสำหรับการยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในสภาพแวดล้อม เช่น ในนาข้าวเมื่อระยะเวลาผ่านไปสามารถติดตามจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* ที่ใช้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมได้อีกวิธีหนึ่ง รวมทั้งยืนยันสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ชัดเจนแน่นอนกว่า Rep DNA ดังเช่น แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ Rep PCR จาก *Bacillus* sp. LN002 จะมีลักษณะเหมือนกับแบบแผนดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. MK007 รวมทั้งข้อมูลในด้านการทดสอบทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีให้ข้อมูลที่คล้ายคลึงกันมากและคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วย แต่เมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอพบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีลำดับเบสแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ Rep DNA ด้วยวิธี PCR ของ *B. subtilis* NSRS89-24 มีความคล้ายคลึงกันกับ *B. subtilis* NSRS89-26 แต่เมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอพบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีลำดับเบสแตกต่างกัน แต่ในกรณีนี้การจำแนกความแตกต่างของ *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26 สามารถสังเกตได้จากลักษณะของโคโลนีบน agar plate จากการให้สีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ motility rate ที่ต่างกัน ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากนั้นไม่สามารถใช้วิธีใดวิธีหนึ่งได้แต่จำเป็นต้องใช้หลายวิธีควบคู่กันเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องมากที่สุด

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ที่ศึกษาสรุปได้ว่า

1. แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธี PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงชนิดเดียวไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียได้เนื่องจากแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่แตกต่างกันยกเว้นใน *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I ในขณะที่เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถตัด 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ศึกษา

2. ข้อมูลด้านความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอสามารถบ่งชี้ถึงความจำเพาะของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ศึกษารวมทั้งแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ได้โดยที่ *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26 จะมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน เช่นเดียวกับ *Bacillus* sp. LN002 และ MK007

3. แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่าง 16S และ 23S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากแบคทีเรียโดยใช้ primer 16-23Sf และ 16-23Sr ไม่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *Bacillus* ที่ศึกษายกเว้นใน *B. subtilis* ATCC6633

4. แบบแผน Rep DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธี PCR จากแบคทีเรียโดยใช้ primer REP1RI และ REP2I จะแตกต่างกันใน *Bacillus* ที่ศึกษาตามแต่ชนิดของแบคทีเรีย ยกเว้น *B. subtilis* NSRS89-24 และ NSRS89-26 และ *Bacillus* sp. LN002 และ MK007 แสดงแบบแผนดีเอ็นเอที่เหมือนกันแต่แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ แต่ลำดับเบสบริเวณ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอแตกต่างกันประมาณ 80% และ 94% ตามลำดับ

การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยการศึกษาแบบแผนของดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ Repetitive DNA ด้วยวิธี PCR ซึ่งทำได้ง่ายและให้ผลรวดเร็วกว่าการหาลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามการหาลำดับเบสของ 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอจะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์สำหรับการติดตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียในธรรมชาติในระยะเวลานึงได้แน่นอนกว่าการทำ Repetitive PCR

เอกสารอ้างอิง

- Castillo, J. N., Laigret, F. and Bove, J. M. 1993. 16S ribosomal DNA sequence analysis of *Acholeplasma seiffertii*, a mollicute from plant surfaces, and its transfer to *Mesoplasma*, a new genus in the spiroplasma phylogenetic group. *Nucleic Acid Res.* 21: 2249-2338.
- DeParasis, J. and Roth, D. A. 1990. Nucleic acid probe for Identification of phytobacteria. Identification of Genus - Specific 16S rRNA sequences. *Phytopathol.* 80 : 618-621.
- Distel, D. L. 1988. Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts analysis of phylogeny and specificity by 16S ribosomal RNA sequences. *J. Bacteriol.* 170 : 2506-2510.
- Dubilier, N., Giere, O., Distel, D. L. and Cavanaugh, C. M. 1995. Characterization of Chemoautotrophic Bacterial in a Gutless Marine Worm (Oligochaeta, Annelida) by Phylogenetic 16S rRNA Sequence Analysis and *In Situ* Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2340-2350.
- MacFaddin, J. E. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Waverly Bess, Inc. USA.
- Rossaul, R., Heyndrickx, L. and Heuverswyn, H. V. 1988. Nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene from *Neisseria gonorrhoeae*. *Nucleic Acid Res.* 16 : 6227.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Staley, J. T., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Johnson, J. L. and Jones, D. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2298 p.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J. and Lupki, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction. *Molecular and Cellular Biology.* 5: 1-16.

- Wilson, K. H., Blitchington, R. B., Hindenach, B. and Greene, R. C. 1988. species - specific oligonucleotide probes for rRNA of *Clostridium difficile* and related species. J. Clin. Microbiol. 26 : 2484-2488.
- Zho, X., Wittner, M., Tanowitz, H. B., Cali, A. and Weiss, L. M. 1993. Nucleotide sequence of small ribosomal RNA of *Encephalitozoon cuniculi*. Nucleic Acid Res. 21: 1315.

หัวข้อย่อยที่ 5.2

การเตรียมสูตรผง BCA และการติดตาม BCA จากต้นข้าว

โดย

ดร.ขวัญจิต อึ้งโพธิ์* ผศ. ดร. ดำรงค์ศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง*
และ ผศ. ดร. วิจิตรา ลีละสุภกุล**

*ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์

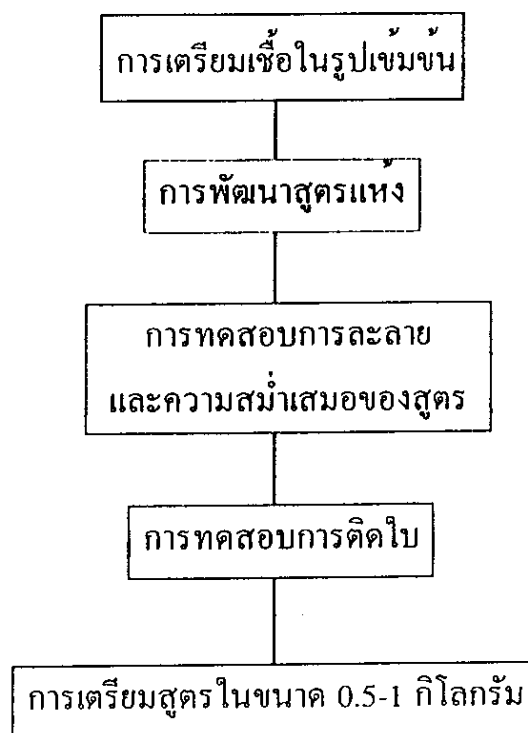
**ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สรุป

1. การเตรียมสูตรผง BCA ในรูปของสปอร์ *Bacillus* พบว่าเก็บได้ระยะเวลานานกว่า 6 เดือน โดยยังคงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราโรคไหม้และโรคกาบใบแห้ง และปริมาณของสปอร์ในสูตรกระจายอย่างสม่ำเสมอ
2. การใส่ crude extract ของเชื้อ *Bacillus* Mk007 ในสูตรที่ผลิตเป็นปริมาณมาก สำหรับการทดสอบในระดับแปลงนาเล็ก ซึ่งต้องทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณสูงมาก ไม่คุ้มค่าแก่การผลิต
3. การติดตามปริมาณ BCA จากต้นข้าว พบว่าปริมาณ BCA ที่เหมาะสมสำหรับใช้ฉีดพ่นควรเป็น 10^7 cfu/ml และระยะเวลาที่ยังคงพบ BCA ในปริมาณที่ยังคงออกฤทธิ์ได้นานไม่ต่ำกว่า 2 สัปดาห์ ข้อมูลเหล่านี้ใช้ประโยชน์สำหรับประกอบการฉีดพ่นในเรื่องปริมาณ BCA และความถี่ของการใช้ BCA
4. ปัญหาของสูตรผง BCA ในเรื่องการละลายพบว่า จะมีตะกอนของแป้งอยู่ในสารละลายก่อนฉีดพ่นเกิดความขุ่น จึงได้แก้ไขโดยเปลี่ยนจากการใช้ pregelatinized starch มาเป็น aguacide (CMC) และเติม glycerol ลงไปสำหรับเก็บรักษาสปอร์ของ *Bacillus* ให้คงรูปไว้ ซึ่งจะได้ทำการทดลองประสิทธิภาพของสูตรในระยะต่อไป และรูปแบบของการใช้จะเปลี่ยนเป็นละลายแล้วใช้ฉีดพ่นได้เลย

(1) การพัฒนาสูตรสำเร็จแบบแห้งของเชื้อ Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับใช้งานในระดับห้องทดลอง

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จแบบแห้งของเชื้อ Antagonist *Bacillus subtilis*
 ในด้านวิธีการ ผลิต ความสม่ำเสมอของสูตร และความคงตัว
 แผนงานวิจัย



รูปที่ 1 แผนการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อในรูปเข้มข้น

การเตรียมเชื้อ MK007 และ B24 ในรูปเข้มข้นสามารถทำได้ดังนี้

- 1.1 วางสารแขวนตะกอนของเชื้อใน beaker ข้ามกั้น
- 1.2 เทส่วนที่เป็นของเหลวใสด้านบน (supernatant liquid) ออกไป
- 1.3 นำส่วนที่นอนก้นหรือตะกอนไปปั่นแยกโดยการแยกแบบหมุนเหวี่ยง

(centrifugation)

เชื้อในรูปเข้มข้นหลังการปั่นแยกจะมีความแรงในช่วง 10^{10} cfu/ g เปียก น้ำหนักของตะกอนแห้งหลังอบแห้งที่ 80°C เป็น 10%

2. การพัฒนาสูตรแห้ง

2.1 วัตถุประสงค์ของการเตรียมสูตรสำเร็จแบบแห้ง

2.1.1 เพื่อสะดวกในการใช้และลดค่าใช้จ่ายในการขนส่ง

2.1.2 เพื่อได้สูตรที่มีคุณสมบัติที่ดีและมีความคงตัว

2.2 คุณสมบัติของสูตรแห้งที่ต้องการ

2.2.1 เตรียมได้ง่าย ใช้เครื่องมือในการเตรียมแบบธรรมดา ไม่ยุ่งยากและซับซ้อน

2.2.2 ละลายน้ำได้ดี มีส่วนประกอบในสูตรเป็นสารที่ละลายน้ำได้

2.2.3 มีความแรงของเชื้อที่เหมาะสมแก่การเจือจางก่อนใช้ ทั้งนี้ขึ้นกับความแรงของเชื้อเข้มข้นตั้งต้น โดยสูตรแห้งจะเป็นการเจือจางเชื้อเข้มข้น (10^{10} cfu/ g เปียก) ลง 10 เท่า และก่อนใช้จะเจือจางด้วยน้ำ 100 เท่า ให้สารละลายมีความแรง 10^7 cfu/ ml

2.2.4 ดัดไปได้ดี โดยใช้สารพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติติดเยื่อเมือก (mucoadhesive polymers) ในที่นี้เลือกใช้เกลือโซเดียมของ carboxymethylcellulose (SCMC) ความหนืดปานกลาง (medium viscosity)

2.2.5 มีความหนืดที่เหมาะสมและไม่อุดตันหัวฉีด ส่วนประกอบในสูตรที่มีคุณสมบัติเป็นสารเพิ่มความหนืด (thickening agents) จะต้องไม่ทำให้สูตรมีความหนืดมากเกินไป โดยเลือกเกรดความหนืดหรือน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสม เช่น medium viscosity ไม่ใช่ high viscosity นอกจากนี้ความเข้มข้นที่ใช้จะต้องเหมาะสม

2.2.6 มีความสม่ำเสมอเท่ากันทุกส่วน

2.2.7 มีความคงตัวดี

2.3 สูตรแห้งที่พัฒนาแล้ว

เชื้อเข้มข้นที่มีความแรง 10^{10} cfu/g เปียก	5	g
Glycerol	0.5	g
Sodium carboxymethylcellulose (medium viscosity)	2.5	g
Sucrose (pulverized)	2.5	g
Lactose	43	g

น้ำหนักรวมโดยประมาณ

50 g

2.4 การเตรียมสูตรแห้ง

2.4.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียม

เครื่องมือที่ใช้จะต้องทำให้เกิดการผสมที่เข้ากันได้ทุกส่วน ในที่นี้ในการเตรียมปริมาณน้อยประมาณ 10-100 กรัมจะใช้โกรंबคยา และในการเตรียมปริมาณมากประมาณ 0.5-1.0 กิโลกรัมจะใช้เครื่องผสมเอนกประสงค์ (multipurpose mixer)

2.4.2 ขั้นตอนในการเตรียมสูตรแห้ง

สูตรแห้งสามารถเตรียมได้โดยการผสมส่วนประกอบต่างๆ ให้เข้ากันแบบ geometric dilution คือผสมส่วนประกอบที่มีปริมาณน้อยที่สุดลงไปก่อน จากนั้นจึงเติมส่วนประกอบอื่นในปริมาณที่เท่ากันลงไป ในที่นี้จะผสมเชื้อเข้มข้นให้เข้ากับ glycerol ก่อน เพื่อเป็นการปกป้องเชื้อ การที่เชื้อเข้มข้นมีของเหลวเป็นส่วนประกอบถึง 90% ทำให้ต้องระมัดระวังการจับกันเป็นก้อนของส่วนประกอบต่างๆ ควรผสม SCMC ลงไปและผสมให้เข้ากันดีก่อนที่จะเติมส่วนประกอบอื่นๆ ลงไป ทั้งนี้เพื่อให้สูตรที่เตรียมได้มีความสม่ำเสมอเท่ากันทุกส่วน และต้องใช้น้ำตาล sucrose ที่บดละเอียด ไม่เช่นนั้นจะทำให้เกิดความไม่สม่ำเสมอของสูตรเนื่องจากของแข็งที่เป็นส่วนประกอบมีขนาดอนุภาคที่แตกต่างกันมาก หลังจากนั้นส่วนผสมจะถูกทำให้แห้งโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C

2.4.3 ความสม่ำเสมอของสูตรแห้ง

จากการตรวจนับจำนวนเชื้อบน nutrient agar พบว่าสูตรแห้งที่เตรียมได้มีความสม่ำเสมอ และมีความแรงของเชื้อในช่วง 10^7 cfu/g สม่ำเสมอเท่ากันทั้งสูตร แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องมือและวิธีเตรียม และความเหมาะสมของส่วนประกอบในสูตรแห้ง

2.4.4 การละลายน้ำของสูตรแห้ง

เมื่อละลายสูตรแห้ง 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร พบว่าสูตรแห้งละลายน้ำได้ดี แต่เนื่องจากสูตรแห้งมี SCMC เป็นส่วนประกอบ จะเกิดการจับเป็นก้อนหากเติมน้ำลงไปอย่างรวดเร็วหมด ข้อเสนอแนะในการละลายคือ ให้ใช้น้ำปริมาณเล็กน้อยผสมกับสูตรแห้งก่อน และคนให้ละลายดีแล้วจึงเติมน้ำส่วนที่เหลือลงไปเรื่อยๆ สารละลายของสูตรแห้ง 1% มี pH ประมาณ 6 และความแรงของเชื้อในช่วง 10^7 cfu/ml ไม่เกิดการอุดตันหัวฉีด

2.5 การติดยา

2.5.1 วิธีการทดสอบ

ทดสอบโดยการนึ่งสารละลายของสูตรแห้ง 1% นึ่งด้วยหัวนึ่ง 30 ครั้งต่อ 1 ตันลงบนต้นข้าว 4 ตัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ นำไปข้าวมาทำให้แห้ง และตรวจนับเชื้อ

2.5.2 ผลการติดใบ

2.5.2.1 เปรียบเทียบกับสูตรแห้งที่ไม่มี SCMC

ตารางที่ 1 ผลของ SCMC ต่อจำนวน *B. Subtilis* บนใบข้าว

สูตรแห้ง	<i>B. Subtilis</i> like	
	ในสารละลาย 1% ก่อน นึ่ง (cfu/ml)	บนใบข้าวหลัง 0.5 ชม. (cfu/g)
สูตร อ. ดำรงค์ศักดิ์ (ไม่มี SCMC)	1.1×10^9	1.8×10^5
RB_C05/01 (มี SCMC 5% ในสูตร แห้ง)	3.8×10^8	1.2×10^6

2.5.2.2 เปรียบเทียบกับสูตรน้ำ

จากตารางที่ 2 และ 3 พบว่าเมื่อใช้สูตรแห้งจำนวนเชื้อที่ติดบนใบข้าวหลังนึ่งจะมากกว่าเมื่อใช้สูตรน้ำ

- A = สูตร RB_C05Y10S05/02
- B = สูตร RB24_C05Y10S05/01
- C = สูตรน้ำ MK007
- D = สูตรน้ำ B24
- E = น้ำกลั่น

ตารางที่ 2 Viable count ของเชื้อสูตรต่างๆ ก่อนฉีด

สูตร	การเจือจาง	MK007		B24	
		colony	cfu/ml	colony	cfu/ml
A	10^{-4}	105	1.1×10^9	-	-
B	10^{-5}	50	5.0×10^7	7	7.0×10^6
C	10^{-3}	73	7.3×10^5	-	-
D	10^{-4}	97	9.7×10^6	21	2.1×10^6

ตารางที่ 3 Viable count ของเชื้อสูตรต่างๆ หลังฉีด

ระยะเวลาหลัง ฉีด	สูตร	จำนวนเชื้อ (cfu/g)		
		MK007 like	B24 like	อื่นๆ
2 ชั่วโมง	A	1.9×10^6	-	8.4×10^6
	B	6.6×10^6	5.0×10^5	7.6×10^6
	C	8.5×10^5	-	5.9×10^6
	D	6.5×10^6	5.4×10^5	7.6×10^6
	E	-	-	2.0×10^7
7 วัน	A	1.4×10^6	-	1.1×10^8
	B	1.8×10^6	2.6×10^5	1.2×10^7
	C	3.9×10^4	-	4.9×10^7
	D	3.7×10^5	6.1×10^4	2.7×10^7
	E	-	-	6.4×10^7

2.6 ความคงตัวของสูตรแห้ง

สูตรแห้งหลังเก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น ลักษณะปรากฏ และการละลาย ความแรงของเชื้อคงอยู่ในช่วง 10^9 cfu/g

2.7 การขยายสูตร

การขยายสูตรเพื่อผลิตสูตรแห่งคราวละ 1 กิโลกรัม ดังตารางที่ 4 สามารถทำได้โดยเตรียมสูตรโดยใช้เครื่องผสมแบบทั่วไป ในที่นี้ใช้เครื่องผสมเอนกประสงค์ สูตรที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นผงแห้งหลังการอบที่อุณหภูมิ 80°C มีความสม่ำเสมอดีและมีความแรงของเชื้ออยู่ในช่วง 10^9 cfu/g

ตารางที่ 4 การขยายสูตร

ส่วนประกอบ	50 g	1000 g
เชื้อเข้มข้นที่มีความแรง 10^{10} cfu/g	5	100
เปือก		
Glycerol	0.5	10
SCMC	2.5	50
Sucrose	2.5	50
Lactose	43	860

2.8 การดัดแปลงสูตรเพื่อเพิ่มความแรงของเชื้อและลดต้นทุนการผลิต

จากการประชุมเสนอความก้าวหน้าเดือนเมษายน 2541 สกว.ให้คำแนะนำที่น่าสนใจ

2 ประการคือ

2.8.1 เพิ่มความแรงของสูตร โดยเจือจางเชื่อน้อยที่สุด

2.8.2 ลดปริมาณ lactose โดยใช้ sucrose ทดแทน

การดัดแปลงสูตรได้ตามคำแนะนำของ สกว. แสดงในตารางที่ 6.5 และ 6.6

ตารางที่ 6.5 การดัดแปลงสูตรเพื่อเพิ่มความแรงของเชื้อและลดต้นทุนการผลิต

ส่วนประกอบ	สูตร A	สูตร B	สูตร C	สูตร D	สูตร E	สูตร F
เชื้อเข้มข้น	10	20	20	10	10	20
Glycerol	1	1	2	1	1	2
SCMC	5	5	5	5	5	5
Sucrose	5	5	73	36.5	20	20
Lactose	79	69	-	47.5	72	63.5
รวม	100	100	100	100	100	100

ตารางที่ 6.5 ลักษณะของสูตร

สูตร	ลักษณะ
A	เป็นผงร่วนและแห้ง
B	ประกอบด้วยเชื้อมากกว่าสูตร A 1 เท่า ของผสมมีความชื้นมาก แต่สามารถผ่านแรงได้ เมื่ออบแห้งจะเป็นผงร่วน
C	มี sucrose เป็นสารเจือจางสูตรแทน lactose ของผสมมีลักษณะเหลวมาก ไม่สามารถเตรียมเป็นสูตรแห้งได้
D	มี sucrose ในปริมาณสูง ของผสมมีลักษณะเหลว ไม่สามารถผ่านแรงได้
E	ลดปริมาณ sucrose จากสูตร D จะได้ของผสมที่เป็นผงร่วนและแห้ง
F	เพิ่มปริมาณเชื้อจากสูตร E เท่าตัว จะได้ของผสมที่เป็นผงร่วนและแห้ง

จะเห็นว่าในสูตร F เราสามารถเพิ่มความแรงของเชื้อได้ 1 เท่า โดยที่ของผสมยังคงมีลักษณะเป็นผงแห้ง

3. สรุปผลการวิจัย

สูตรแห้งที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีครีมอ่อน ไม่จับเป็นก้อนแข็ง ละลายน้ำได้ดี และมีความคงตัวดี มีประสิทธิภาพดีกว่าสูตรน้ำ ข้อจำกัดในการเตรียมสูตรแห้งคือ ความแรงของเชื้อตั้งต้น ทำให้การเจือจางเชื้อตั้งต้นทำได้ไม่มาก และได้สูตรแห้งที่มีความแรงของเชื้อเพียง 10^9 cfu/g และทำให้ต้องใช้สูตรแห้งปริมาณมากเพื่อเจือจางก่อนฉีดให้มีความแรงของเชื้อในช่วง 10^7 cfu/g สูตรแห้งนี้สามารถขยายสูตรเพื่อขยายปริมาณผลิตได้ดี โดยมีความสม่ำเสมอของสูตรดี ในการลดต้นทุนการผลิตและการเพิ่มความแรงของเชื้อสามารถปรับปรุงต่อไปได้จากสูตร F

(2) ผลการติดตาม BCA จากต้นข้าว

การติดตาม Antagonist *B. subtilis* โดยวิธี PCR และ DNA sequencing โดยใช้ข้อมูล

1. ลำดับเบสของ 16S ribosomal DNA ของสายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์
2. แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้ Repetitive DNA primer ด้วยวิธี PCR ของสายพันธุ์แบคทีเรีย

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษา 16S ribosomal DNA สำหรับบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์

การใช้ 16S ribosomal DNA สำหรับบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรีย ในระดับหาลำดับเบสก็จะให้ผลที่แน่นอน ชัดเจนและจำเพาะ มีประโยชน์สำหรับตรวจยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในภาคสนามช่วงระยะเวลาหนึ่ง แต่วิธีการนี้ไม่เหมาะสมที่จะจำแนกแบคทีเรียและติดตามปริมาณของแบคทีเรียที่ใช้ฉีดพ่นในต้นข้าวที่ทำเป็นงานประจำ

2. การใช้วิธี Repetitive DNA PCR สำหรับติดตามแบคทีเรียที่ทดลองในต้นข้าว

สามารถใช้ Repetitive DNA fingerprints สำหรับติดตามสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ทดลองในภาคสนามได้ เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว โดยทำจากเซลล์ของแบคทีเรียโดยตรงและให้ผลคงที่สม่ำเสมอ

3. การตรวจเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดลองของแผนงานต่างๆ

การติดตามเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่พ่นต้นข้าวในระดับเรือนทดลองกระจก สามารถพบเชื้อแบคทีเรียกระจายอยู่ตามส่วนต่างๆของต้นข้าวได้นานถึง 45 วัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 10^7 และ 10^8 cfu/ml สามารถทำเป็น quality control ของเชื้อที่ใช้เพื่อยืนยัน

ความแน่นอนของสายพันธุ์ที่ใช้

(2.1) การใช้ Repetitive DNA fingerprints ในการติดตามแบคทีเรียปฏิบั

เชื้อ Antagonist คือ *B. subtilis* NSRS89-26 (B.26) ความเข้มข้น 10^7 และ 10^8 cfu/ml

เชื้อราที่ใช้ *R. solani*

ตัวอย่างต้นข้าวที่ใช้สำหรับ 4 กรรมวิธีคือ ข้าวพันธุ์ กข 23 อายุ 3 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 1 ต้นข้าว (ได้ควบคุมและปลอดโรค)

กรรมวิธีที่ 2 ต้นข้าวที่พ่นเชื้อ B.26

กรรมวิธีที่ 3 ต้นข้าวที่พ่นเชื้อ B.26 และติดเชื้อ *R. solani*

แบ่งเป็น 2 ชุดคือ ข้าวที่ปลูกจากเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนผิวก่อนปลูกจะทดลองในกรงทดลอง ส่วนข้าวที่ปลูกจากเมล็ดที่ไม่ฆ่าเชื้อก่อนจะวางในที่โล่ง

การเก็บตัวอย่างต้นข้าว แบ่งเป็น 4 ส่วนคือ ส่วนน้ำล้อมรอบต้นข้าว, ราก, ใบและหน่อ

หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี bacterial plate count เลือกโคโลนีที่มีแนวโน้มว่าจะเป็น B.26 โดยอาศัยข้อมูลการให้สีบน PDA plate ลักษณะโคโลนี การย้อมสีแกรมและ antifungal activity มาศึกษาแบบแผนของดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และใช้ primer Rep/II เปรียบเทียบกับแบบแผนมาตรฐานของสายพันธุ์แบคทีเรียนี้

ผลการทดลอง

สามารถติดตามจำนวนและชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากแบคทีเรียทั้งหมดที่มีในตัวอย่างต้นข้าวที่ทดสอบได้ตั้งแต่วะเริ่มพ่นเชื้อแบคทีเรียจนกระทั่งถึงในระยะราว 1.5 เดือน พบจำนวนของแบคทีเรียปฏิบัที่ยังคงใช้อยู่ในระดับสูงพอที่จะแสดงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราได้ถึงแม้ว่าจะลดความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้เริ่มแรกเป็น 10^7 cfu/ml แต่สำหรับในส่วนของน้ำล้อมรอบต้นข้าวให้ผลที่ไม่แน่นอนเปลี่ยนแปลงตามระดับน้ำที่ขังอยู่ สัดส่วนของการกระจายตัวของแบคทีเรียปฏิบัตามส่วนต่างๆของต้นข้าวพบว่าไม่แตกต่างกันนัก

(2.1.1). สูตรผง BCA สำหรับการทดลองที่กรมวิชาการเกษตร บางเขน และศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

1. สูตร 9721 และสูตร 9722

สูตร 9721 คือ สารผสมของเชื้อ MK007 และ B.24 อย่างละ $(4.6-8.9) \times 10^9$ cfu/g ที่อยู่ในรูปสูตรผงที่ผสมกับ pregelatinized starch, lactose และอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตร 9722 คือ ส่วนผสมเหมือนสูตร 9721 ยกเว้นเชื้อผสม คือ B.24 และ B.26

วิธีใช้ ละลายสูตรจำนวน 8 g ในน้ำต้มสุกอุ่น 500 ml ทิ้งไว้ค้างคืนก่อนฉีดพ่นจะได้เชื้อ MK007 และ B.24 โดยประมาณอย่างละ 10^7 cfu/ml

จำนวนที่ใช้ สำหรับควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในเรือนทดลอง จำนวนสูตรละ 3 ลิตร สำหรับฉีดพ่น 3 ครั้งของ 4 replication

วิธีการทดลอง ทำการฉีดพ่นต้นข้าวที่ปลูกในกระถาง ณ กรมวิชาการเกษตร บางเขน และศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

ผลการติดตามสูตร BCA 9721 และ 9722 จากต้นข้าว

การติดตาม BCA สูตร 9721 และ 9722 ที่ฉีดพ่นต้นข้าวที่ปลูกอยู่ในกระถาง (กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ) ทั้งสองสูตรสามารถติดตาม BCA ทั้ง 2 เชื้อในแต่ละสูตรในจำนวน 10^5 - 10^6 cfu/g plant dry weight ได้ในเวลา 14-18 วัน (รูปที่ 1) และระยะ 50 วัน ก็ยังสามารถพบเฉพาะ B.24 ได้แต่มีจำนวนน้อยลง ขณะที่แบคทีเรียชนิดอื่นๆ พบได้ในปริมาณ คงที่คือ 10^7 - 10^8 cfu/g ตลอด 50 วัน (รูปที่ 2)

การติดตาม BCA ในสูตร 9721 (รูปที่ 3) และ 9722 (รูปที่ 4) จากข้าวที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ตัวอย่างต้นข้าวที่ส่งมาให้ตรวจสอบมาเป็น 4 ชนิดคือ Tx9, 10, 11 และ 12 ได้ข้อมูลที่แสดงว่าระยะ 16 วันหลังพ่นก็ยังคงมีเชื้อ BCA ในปริมาณ 10^5 - 10^6 cfu/g plant dry weight ขณะที่แบคทีเรียอื่นๆ พบได้ในปริมาณคงที่ 10^7 - 10^8 cfu/g

2. สูตรผง 9761 และ 9762

สำหรับทดสอบโรคกาบใบแห้งในแปลงนาเล็ก ณ ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

เตรียมสูตรผง 9761 = B.24 + B.26 + อาหารเลี้ยงเชื้อ

9762 = B.24 + MK007 + อาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีใช้และวิธีเตรียม เช่นเดียวกับสูตร 9721

สำหรับผสมน้ำ จำนวน 40 ลิตร ฉีดพ่น 3 ครั้ง

ไม่ได้ติดตาม BCA จากตัวอย่างต้นข้าว

3. สูตรผง BCA 9771-3 และ 9781-9783

- สูตรผง 9771, 9772 และ 9773 สำหรับการทดลองที่กรมวิชาการเกษตร บางเขน
- สูตรผง 9781, 9782 และ 9783 สำหรับการทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

การเตรียมปริมาณเชื้อและวิธีการใช้สูตร เช่นเดียวกับ 9721

ชนิดของสปอร์เชื้อ BCA ผสม = MK007 + BS 24

สูตร 9771 และ 9781 = เชื้อ BCA ผสม crude extract (100 x MIC)

9772 และ 9782 = crude extract (100 x MIC)

9773 และ 9783 = เชื้อ BCA ผสม

ผลการติดตามเชื้อ BCA สูตรต่างๆ จากต้นข้าว

ในส่วนการทดลองที่กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ การติดตามจากสูตร 9773 (รูปที่ 5) พบว่า ปริมาณ *Bacillus* MK007 ที่พบในต้นข้าวที่ฉีดพ่นนั้นอยู่ในระดับที่สูงตลอดการวัดผล คือ ประมาณ 10^8 - 10^{10} cfu/gm plant dry weight จนกระทั่งในการวัดผลครั้งสุดท้ายระยะเวลา 40 วันหลังฉีดพ่นครั้งแรกก็ยังคงพบ MK007 ในประมาณ 10^7 cfu/g ขณะที่ B.24 มีระดับลดลงในบางช่วงและเพิ่มขึ้นในระยะต่อมา และลดลงจนหายไปในการวัดผลครั้งสุดท้าย

ในสูตร 9783 จากต้นข้าวที่ได้จากการทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง (รูปที่ 5) พบว่า MK007 มีปริมาณสูงเช่นเดียวกันกับที่กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ ในขณะที่ B.24 พบได้น้อยและหายไปเป็นช่วงๆ

4. ผลการติดตามเชื้อ BCA จากสูตรผง 701 และ 805

จากต้นข้าวที่ปลูกในแปลงนาเล็ก จ.ปทุมธานี

ในการตรวจตัวอย่างที่ส่งมาทั้ง 4 ระยะ (19 พฤษภาคม - 6 มิถุนายน 2540) ไม่สามารถตรวจพบ BCA ได้เลย แต่พบแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เป็นจำนวนมาก (10^7 - 10^{10} cfu/g) ทั้งนี้เมื่อตรวจปริมาณเชื้อ BCA ในสูตรที่ผลิตพบว่า มีปริมาณ BCA 10^4 cfu/ml

ดังนั้น เมื่อฉีดพ่นแล้วจึงไม่สามารถตรวจพบ BCA แสดงว่าปริมาณ BCA ใช้ฉีดพ่นไม่ควรมากกว่า 10^7 cfu/ml

5. สูตร 1001 ในแปลงนาเล็ก

การติดตาม BCA ในสูตร 1001 จากต้นข้าวที่ทดลองโดยกรมวิชาการเกษตรบางเขน (รูปที่ 6) มีตัวอย่างต้นข้าวที่ส่งมาให้เฉพาะเมื่อหลังการฉีดพ่นเชื้อ BCA นาน 2 ชั่วโมง จำนวน 4 ครั้งเท่านั้น เมื่อตรวจหาไม่พบเชื้อ B24 พบเฉพาะ MK007 และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังรูปที่ 7 ซึ่งได้ข้อมูลตรงกันเมื่อนำสูตร 1001 มาวิเคราะห์ว่ามี BCA สายพันธุ์ B24 ในปริมาณที่น้อยกว่าที่ควรเป็น โดยปกติทางกรมวิชาการเกษตรควรจะส่งตัวอย่างของต้นข้าว เมื่อเชื้อมาการของโรคมานี้ให้ตรวจด้วย ดังนั้นจึงทำให้ขาดข้อมูลระยะที่สามารถติดตามเชื้อ BCA จากต้นข้าวสำหรับการทดลองครั้งนี้

6. สูตร 207A, 207C, 208 และ 209 ในเรือนทดลอง

จากการติดตาม BCA จากสูตร 207A, 207C, 208 และ 209 ซึ่งเป็นสูตรที่พัฒนา โดย อ.ขวัญจิตและเตรียมโดย อ.อรรณู และฉีดพ่นต้นข้าวในเรือนทดลอง ณ.กรมวิชาการเกษตร (รช.40-มิก.41) ดังรูปที่ 8 พบว่ามีปริมาณ B24 และMK007 ก่อนฉีดพ่น เมื่อทำการวิเคราะห์ ปริมาณแบคทีเรียในสูตรพบว่ามีจำนวนดังนี้

สูตร	อัตราการใช้	MK007	B24
207A (ผง)	1:100	10^9 cfu/g	-
207C (ผง)	1:100	3.5×10^8 cfu/g	3.5×10^8 cfu/g
208 (เหลว)	1:100	1.2×10^9 cfu/ml	-
209 (เหลว)	1:100	2.5×10^8 cfu/ml	2.5×10^8 cfu/ml

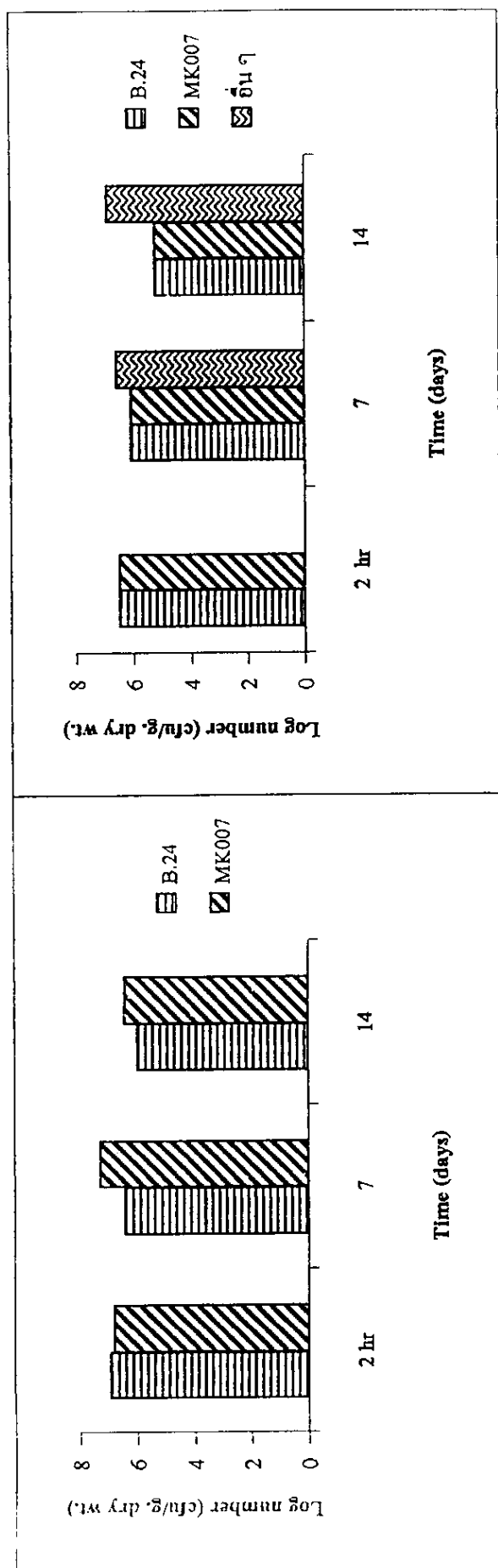
ทำการติดตามในตัวอย่างต้นข้าวหลังการฉีดพ่นครั้งที่ 1 จนกระทั่งตรวจผลครั้งที่ 3 พบว่ามี MK007 และ B24 ในปริมาณที่สามารถออกฤทธิ์ได้ในทุกระยะ

7. สูตร 9841 ในเรื่อนทดลองและแปลงนาเล็ก

เมื่อวิเคราะห์สูตรพบว่าปริมาณ BCA ในสูตรต่างๆมีดังนี้

สูตร	อัตราการใช้	MK007	B24
9841 (ผง)	2 g/L	2.4×10^9 cfu/g	1.2×10^9 cfu/g
9842 (ผง)	1 g/L	2.4×10^9 cfu/g	1.2×10^9 cfu/g
9843 (เหลว)	2 ml/L	2.0×10^8 cfu/ml	2.0×10^9 cfu/ml
9844 (เหลว)	1 ml/L	8.1×10^9 cfu/ml	2.65×10^9 cfu/ml

เมื่อตรวจตัวอย่างต้นข้าวที่ฉีดพ่นด้วยสูตร 9841 ในเรื่อนทดลองครั้งที่ 4 และในแปลงนาเล็ก ดังรูปที่ 11 ตรวจตัวอย่าง 9 ครั้ง ตั้งแต่ก่อนฉีดพ่น หลังฉีดพ่น 2 ชั่วโมง การตรวจแปลครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 3 ดังในรูปที่ 12 ผลจากการตรวจต้นข้าวในเรื่อนทดลองพบว่ามีปริมาณของ BCA อยู่ในระดับสูงตามปกติในระยะสัปดาห์แรก และมีระดับลดต่ำลงในสัปดาห์ที่สองและจะมีปริมาณเพิ่มเมื่อฉีดพ่นอีกครั้งหนึ่ง และไม่พบเมื่อถึงระยะ 2 สัปดาห์ก่อนที่จะฉีดพ่นครั้งต่อไป ส่วนรูปที่ 13 จากการตรวจต้นข้าวในแปลงนาเล็กนั้นพบปริมาณ BCA ได้ค่อนข้างน้อยกว่าต้นข้าวในเรื่อนทดลองมาก ตั้งแต่ในระยะหลังฉีดพ่น BCA นาน 2 ชั่วโมงทุกครั้ง



A

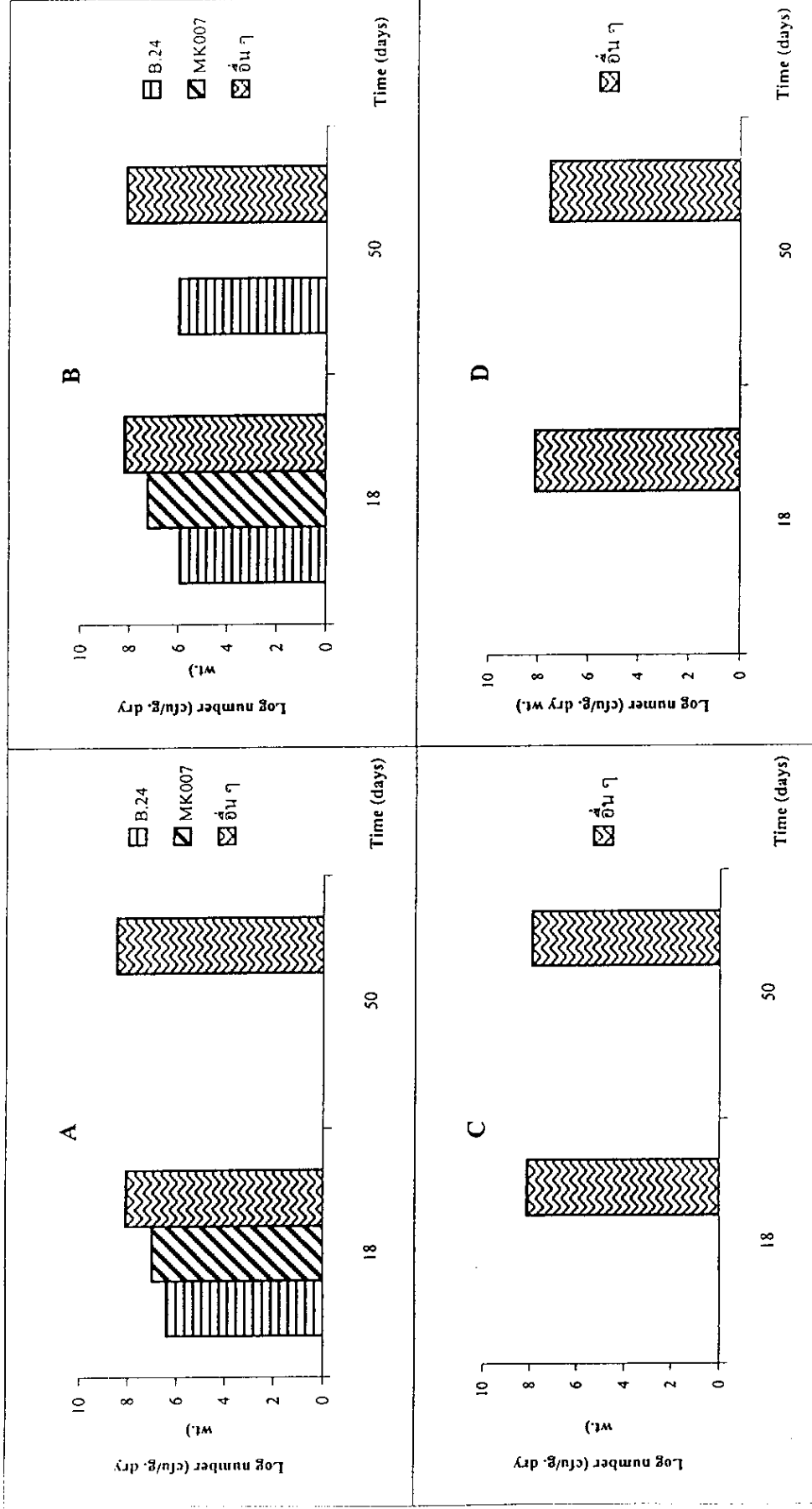
B

รูปที่ 1 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียที่เป็นสูตร 9721 และ 9722 เก็บจากต้นข้าวหลังฉีดพ่นในกระถางในเรือนทดลองจากกรมวิชาการเกษตร

A : สูตร 9721, B : สูตร 9722

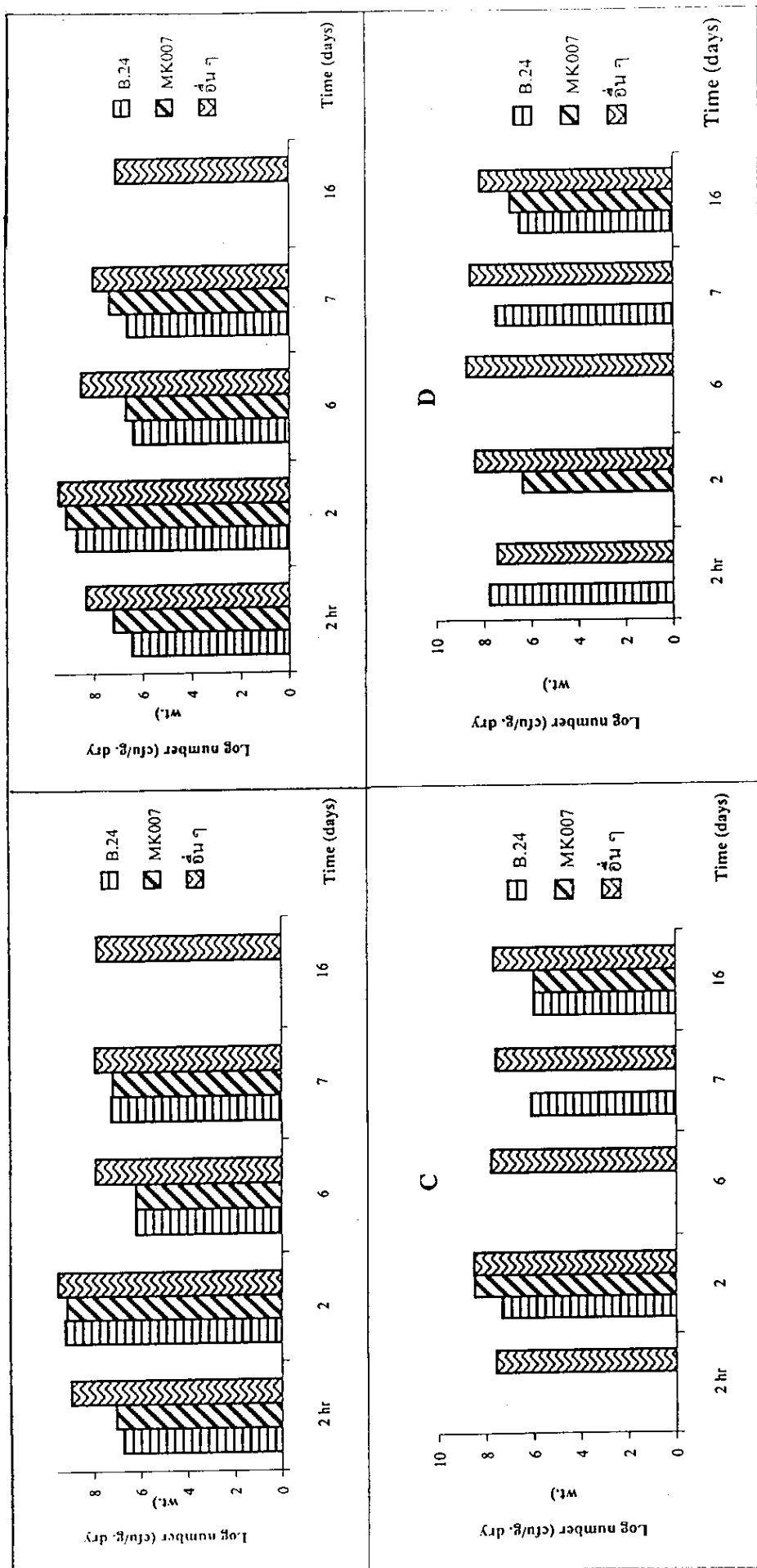
สูตร 9721 ปริมาณเชื้อก่อนฉีดพ่น : B.24 และ MK007 = 1.3×10^7 และ 2.3×10^7 cfu/ml ตามลำดับ

สูตร 9722 ปริมาณเชื้อก่อนฉีดพ่น : B.24 และ MK007 = 1.8×10^7 และ 6.2×10^7 cfu/ml ตามลำดับ

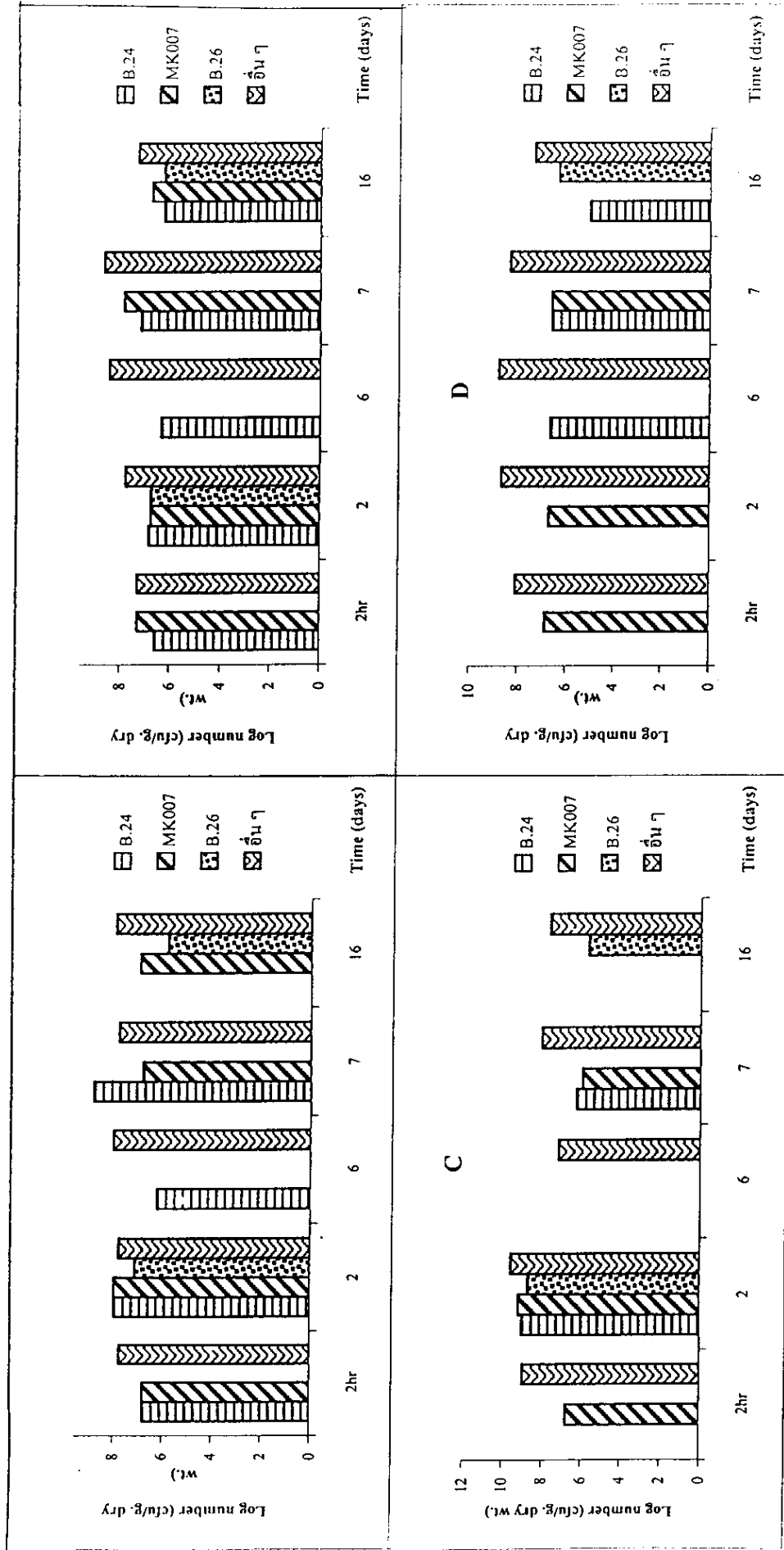


รูปที่ 2 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียที่เป็นสูตร 9721 และ 9722 เก็บจากต้นข้าวหาลังฉีดยา ในกระถางในเรือนทดลอง ส่งมาจากกรมวิชาการเกษตร

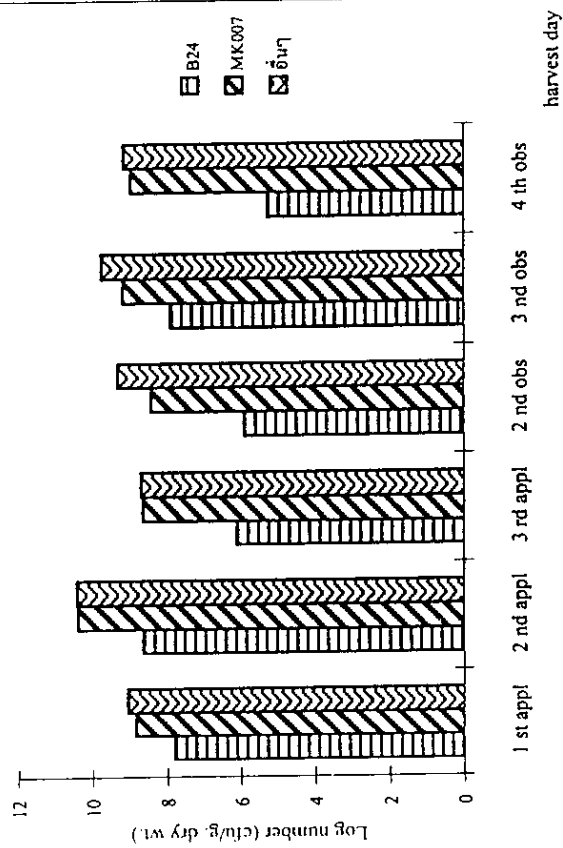
A :สูตร 9721 (ใบ+ต้น), B :สูตร 9721 (ราก), C :สูตร 9722 (ใบ+ต้น), D :สูตร 9722 (ราก) (1) :ลักษณะโคโคโคนีหมื่น B.24 , (2) :ลักษณะโคโคโคนีหมื่น MK007



รูปที่ 3 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียที่เป็นสูตร 9721 เก็บจากต้นข้าวหลังฉีดพ่นในเรือนทดลองที่ส่งมาจากพัทลุง
 A :สูตร 9721 (ใบ+ต้น) Tx10, B :สูตร 9721 (ราก) Tx10, C :สูตร 9721 (ใบ+ต้น) Tx 12, D :สูตร 9721 (ราก) Tx12



รูปที่ 4 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียที่เป็นสูตร 9722 เก็บจากต้นข้าวหลังฉีดพ่นในแปลงนาขนาดเล็กส่งมาจากพัทลุง
A :สูตร 9722 (ใบ+ต้น) Tx9, B :สูตร 9722 (ราก) Tx9, C :สูตร 9722 (ใบ+ต้น) Tx 11, D :สูตร 9722 (ราก) Tx11



A

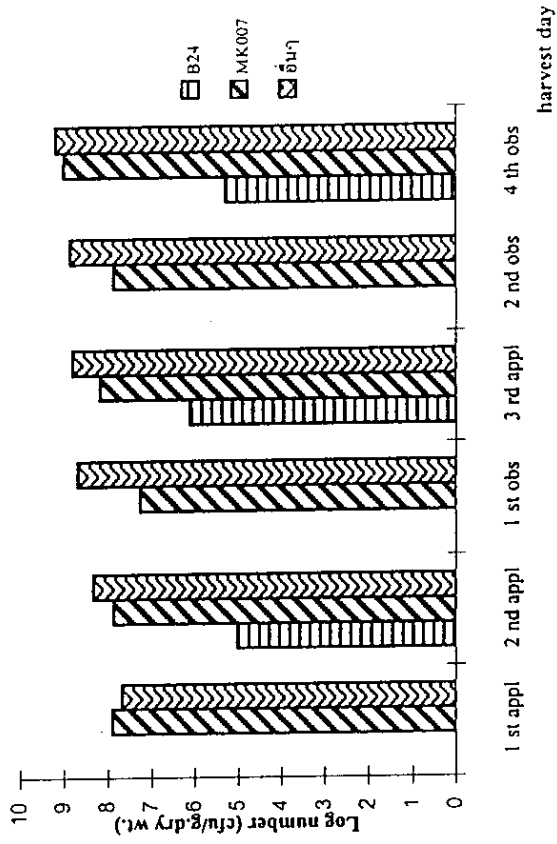
รูปที่ 5 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียที่เก็บมาจากต้นข้าว

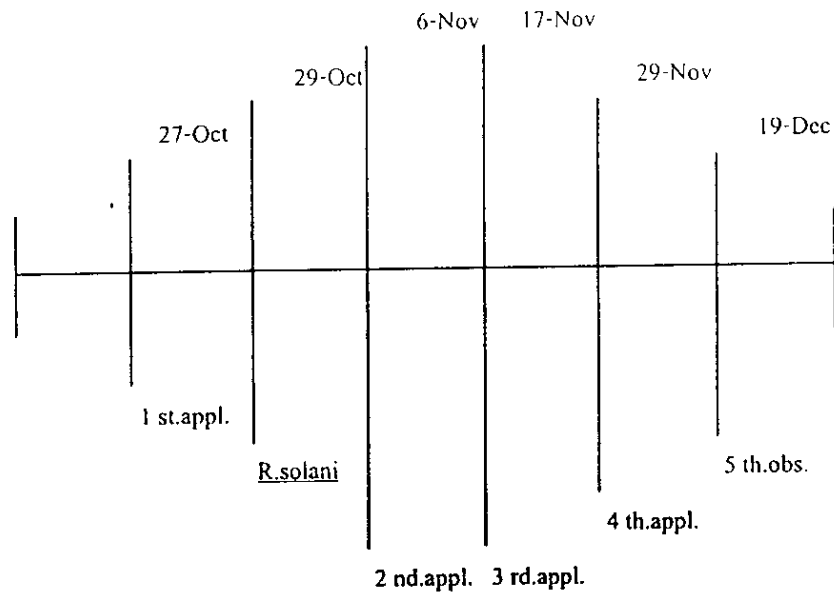
A สูตร 9773 จาก green house กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

(ปริมาณเชื้อก่อนฉีดพ่น : B.24 และ MK007 = 1.59×10^7 และ 7.8×10^7 cfu/ml ตามลำดับ)

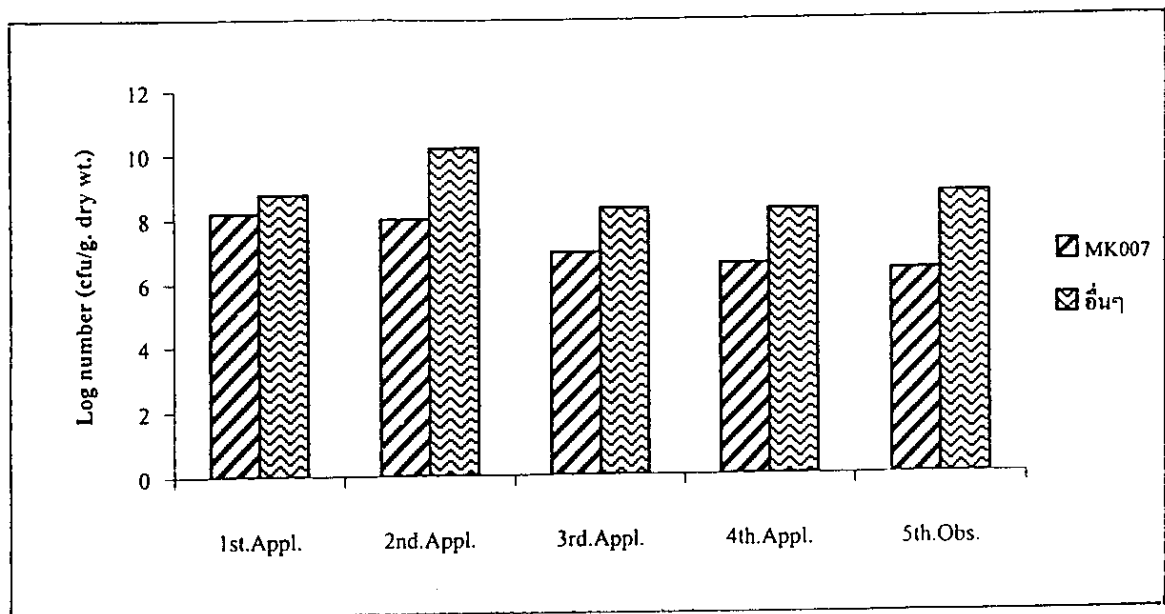
B สูตร 9783 จากพัทลุง (ปริมาณเชื้อก่อนฉีดพ่น : B.24 และ MK007 = 4.72×10^7 และ 4.41×10^7 cfu/ml ตามลำดับ)

B

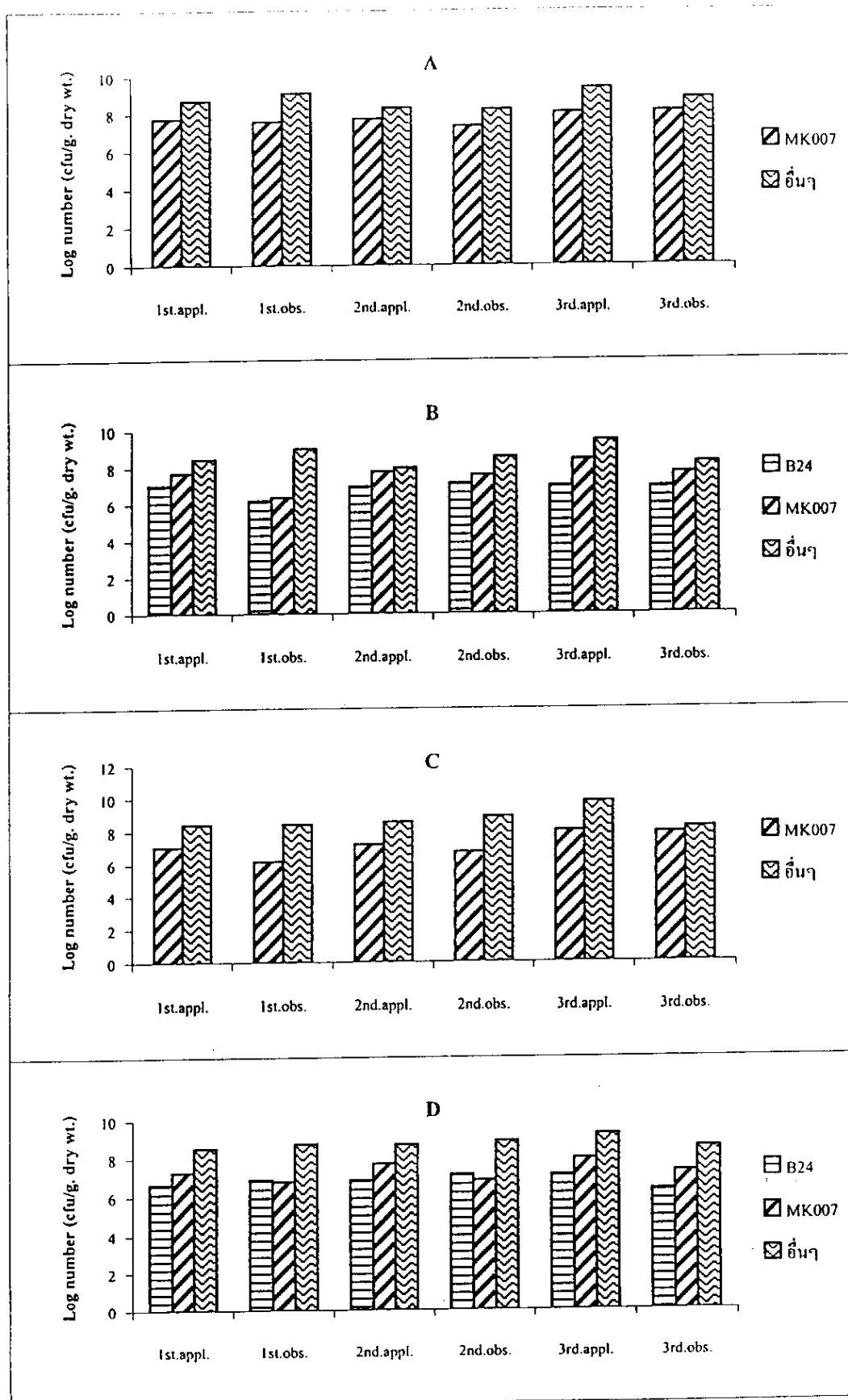




รูปที่ 6 การทดสอบสูตร 1001 ต่อโรคกาบใบแห้งในแปลงนาเล็ก
Oct - Dec 97 กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

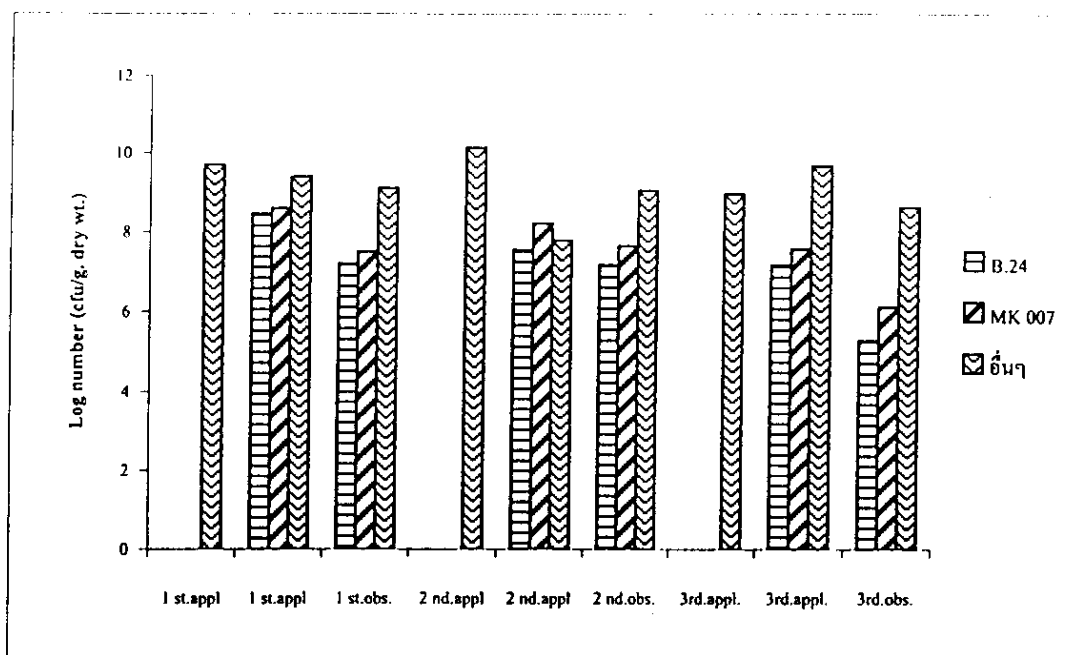


รูปที่ 7 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียที่เป็นสูตร 1001 เก็บจากต้นข้าวในแปลงนาเล็ก
จากกรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

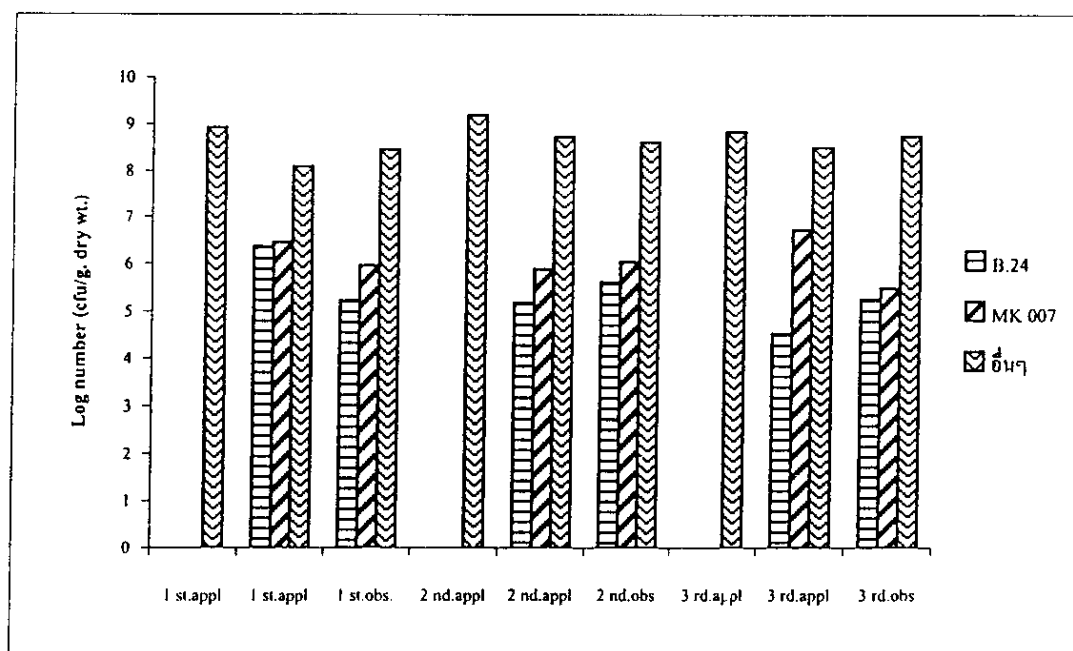


รูปที่ 8 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียที่เก็บจากต้นข้าวในเรือนทดลอง

จากกรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ, A-D : สูตร 207A, 207C, 208 และ 209



รูปที่ 9 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียสูตร 9841 เก็บจากต้นข้าวในเรือนทดลอง
จากกรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ



รูปที่ 10 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียสูตร 9841 เก็บจากต้นข้าวในแปลงนาเด็ก
จากกรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

หัวข้อย่อยที่ 6
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ antagonist *Bacillus* spp.
ในระดับขวดเย้าและถังหมัก

โดย

ผศ.ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกุล* และ น.ส. วาสนา มุสา**

*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดเช่น *Bacillus licheniformis* ใช้ในการผลิต Bacitracin (Haavik, 1974 a) *Bacillus subtilis* NCIB 8872 ผลิต Bacilomycin-L (Chevanet, 1986) *Bacillus subtilis* ผลิต Iturin A (Besson *et al.*, 1983) และ Surfactin (Ohno, *et al.*, 1995 a) *Bacillus brevis* ผลิต Tyrocidine *Bacillus polymyxa* ผลิต Colistin

โดยในการผลิตสารปฏิชีวนะมีปัจจัยที่สำคัญที่จะต้องคำนึงถึงก็คือ

1. ส่วนประกอบของอาหาร
2. สภาพของการเพาะเลี้ยง

1. ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

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) ที่พบว่าใน

การเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NCIB 8872 เพื่อผลิต Bacilomycin-L เชื้อสามารถผลิต Bacilomycin-L ได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสที่มีความเข้มข้น 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 แหล่งคาร์บอนคือกลูโคส ร้อยละ 2.0

นอกจากกลูโคสแล้วยังมีการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น การผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* ใช้แมนนิทอล ฟรุกโตสและซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิต Iturin A ได้มากกว่าใช้กลูโคสที่มีความเข้มข้นเดียวกัน (Besson *et al.*, 1987) การผลิต Surfactin ร่วมกับการผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* ATCC 21332 ใช้ ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี (Sandrin *et al.*, 1990) การผลิต Aurantinine จาก *B. aurantinus* ที่ใช้กลีเซอรอลและแบ่งร่วมกันเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจุลินทรีย์มีการใช้กลีเซอรอลในการเจริญและใช้แบ่งในการผลิต Aurantinine โดยจะผลิต Aurantinine เมื่อกลีเซอรอลเกือบหมดแล้วและเริ่มใช้แบ่งเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นกลีเซอรอลจึงเป็น carbon catabolite เช่นกัน (Nishikiori *et al.*, 1978 อ้างโดย สุชาดา คุชชีสิทธิ์, 2535) แสดงว่ายังมีแหล่งคาร์บอนอื่นที่ทำให้เกิด carbon catabolite ได้นอกจากนี้ในการทดลองของ อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรัตน์ (2532 ก) พบว่า *Bacillus* KUBA 8601.2 สามารถใช้แบ่งมันสำปะหลัง แบ่งข้าวโพดหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารปฏิชีวนะที่ผลิตและพบว่าน้ำตาลชนิดที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างช้าๆจะให้ผลผลิตของสารปฏิชีวนะสูง (Hu and Demain, 1979)

1.2 แหล่งไนโตรเจน การผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่พบว่าอะมิโนไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด และทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีด้วย อะมิโนไนโตรเจนที่ใช้กันมาก ได้แก่ L-asparagine glycine arginine และ aspartic acid (Aharonowitz and Demain, 1979; Byrne and Greenstein, 1986) การเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะมีการควบคุมโดย nitrogen metabolite ซึ่งการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะสามารถถูกกดการสร้าง

ได้โดยแอมโมเนีย (ammonia) และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้ได้เร็ว (Aharonowitz, 1980)

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

Besson (1987) พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ Iturin แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตคือ L-glutamic acid L และ D-aspartic 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 คุชชัยสิทธิ์ (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 เอี่ยมพรรค์, 2532) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่แล้วไม่ค่อยพบว่าการผลิตสารปฏิชีวนะ (Pusey and Wilson, 1984)

ตารางที่ 2 การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

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

ที่มา : Pusey (1989)

1.3 ฟอสเฟตอินทรีย์ การที่มีฟอสเฟตอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะเร่งการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและกระบวนการหายใจทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดี แต่จะมีการผลิตสารปฏิชีวนะต่ำ (Weinberg, 1973; Kleinkauf and Dohren, 1985) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น ฟอสเฟตอินทรีย์ 10 มิลลิโมล เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (Martin and Demain, 1980) กล่าวคือการผลิต Candicidin จาก *Streptomyces niveus* Oxytetracycline จาก *Streptomyces rimusius* และ Bacitracin จาก *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

1.4 เกลืออินทรีย์อื่นๆ ที่นิยมใช้เพิ่มผลผลิตสารปฏิชีวนะคือ โซเดียมคลอไรด์ เช่น การผลิต Streptomycin จากเชื้อ *Streptomyces griseus* ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ผลผลิตจะเพิ่มขึ้น แต่ถ้ามากเกินไปจะยับยั้งการผลิต (ควงพร กันธิโชติ, 2530) และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่า ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อเจริญได้ดี (ธีรโชติ มณีโชติ, 2537)

1.5 โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย 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) ก็ได้รายงานว่ *B. brevis* ATCC 818 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สองชนิดคือ Tyrocidine และ Gramicidine ในระยะแรกของ stationary phase จากนั้นจะสร้างสปอร์โดยที่ Mn^{2+} มีความสำคัญในการชักนำให้แบคทีเรียสร้างสปอร์และผลิตสารปฏิชีวนะ 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 โดยความต้องการสำหรับกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะจะมากกว่าความต้องการสำหรับการเจริญ 10 ถึง 100 เท่า (Iwai and Omura, 1982)

2. สภาพการเลี้ยงเชื้อ

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

2.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะเพราะพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิหนึ่งก่อนข้างคงที่ แต่มักไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (ควงพร คันธ โชติ, 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

2.3 ปริมาณออกซิเจน การผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำนั้นมีปริมาณต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศในอาหารเหลวที่ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะ (Tufile and Pinto, 1970) ปริมาณอากาศที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น เช่น การผลิต Colistin จาก *B. polymyxa* ต้องการออกซิเจนมาก โดยพบว่าการกวนในอัตรา 600-700 รอบต่อนาที ทำให้ผลผลิตสูงขึ้น (Kuratsu 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 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ

การป้องกันราโดยสารชีวภาพจากจุลินทรีย์นี้ พบว่าน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพการป้องกันการเจริญของราทดสอบสูงกว่าอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NB 22 เพื่อผลิต Iturin พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่ออัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 0.3 VVM แต่อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการผลิต iturin คือ 0.1 VVM (Phae and Shoda, 1991)

2.4 ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ความดัน oxidation-reduction potential เช่น การผลิต Bicyclomycin จาก *Streptococcus sapronensis* สามารถทนต่อสภาพรีดิวซ์ในการผลิตได้ โดยเพิ่มการกวนร่วมกับการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ไม่สร้าง aerial mycelium เพื่อป้องกันการสูญหายของพลาสมิดเมื่อเซลล์ถูกทำลายเนื่องจากการกวน (Miyoshi *et al.*, 1980) ส่วนสารกำจัดฟอง (antifoam) ที่ดีควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้ (สมใจ ศิริโชค, 2537) คือ กระจายตัวได้ดี และทำลายฟองได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ความเข้มข้นต่ำ ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ มนุษย์และสัตว์ ไม่ทำให้เกิดปัญหาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ไม่มีผลต่อการส่งผ่านออกซิเจน ทนความร้อนที่ใช้ในการทำให้ปราศจากเชื้อได้และราคาถูก

วัสดุและวิธีการ

1.1 จุลินทรีย์

Bacillus LN 007 เป็นแบคทีเรียโดยอาจารย์มานะ 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

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

2.2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Dobois et al., 1956)

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อราของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Mckeen et al., 1986)

2.3.1 การเตรียมสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

เมื่อครบกำหนดเวลาการเพาะเลี้ยง นำน้ำหมักไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์สารปฏิชีวนะต่อเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *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 เจาะบริเวณขอบๆ โคลนีนี นำวุ้นที่เจาะได้ไปวาง
กลางจานอาหาร PDA จานใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (33 °C) 4 วัน จนได้โคลนีนีขนาดเส้น
ผ่านศูนย์กลางประมาณ 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 ใน
อัตราส่วน 1:1 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทใส่จานอาหารที่
ปราศจากเชื้อ จานควบคุมใส่น้ำกลั่นแทนส่วนใส

2.3.3.2 เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้วให้นำเชื้อราจากข้อ 5.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
6 มิลลิเมตร มาวางลงตรงกลางจานอาหาร

2.3.3.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วสังเกตการเจริญของเชื้อรา โดยเชื้อรา *P. oryzae* จะ
ใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน ส่วนเชื้อรา *R. solani* ใช้เวลาประมาณ 2 วัน วัดขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ
ราจากสูตร (Gamliel และคณะ, 1989)

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

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

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

วิธีการทดลอง

ก. การผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราจาก *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 รูป ลงในฟลasks ขนาด 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 โดยเลี้ยงเชื้อในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้น เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0 6 12 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้งจะเก็บ ตัวอย่างละ 3 ฟลasks นำแต่ละตัวอย่างทำการวัดความขุ่นของเซลล์ ที่ OD 660 นาโนเมตร วัดพีเอช และนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์สารปฏิชีวนะต่อเชื้อราคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราได้มากที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา และใช้สภาพการเลี้ยงตามข้อ 1 ทดลองครั้งละ 3 ฟลasks ทำ 2 ข้าง โดยที่เมื่อครบเวลา ก็จะเก็บตัวอย่างไปวัดการเจริญเติบโต วัดพีเอช และทดสอบฤทธิ์สารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่เวลา 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

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 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

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราตามข้อ 2.2 แล้วเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace elements) ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

2.4 ผลของพีเอชเริ่มต้น

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

2.5 ผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราตามข้อ 2.4 นำไปแยกที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

2.6 ผลของการให้อากาศ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราและที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 2.5 นำไปแยกให้อากาศที่มีอัตราส่วนของอากาศต่อขนาดของฟลาสก์ เป็น 50/250 100/250 และ 150/250

2.7 ผลของสารกำจัดฟอง

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

3. ศึกษาชนิดของ complex medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

สารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือ โมลาส และที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนคือน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ โดยทำการทดลองดังนี้

3.1 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 2 แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นโมลาส โดยให้ความเข้มข้นของโมลาสเป็น 1.0 2.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมจากข้อ 2 แต่เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็นน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ที่มีความเข้มข้น 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข. การศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราจาก Bacillus โดยการเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ในการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา จะทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยเลี้ยง Bacillus ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที 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 วัดพีเอชและทดสอบฤทธิ์สารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตได้ โดยทำการศึกษาดังนี้

1. ผลของการควบคุมพีเอชเริ่มต้น

เปรียบเทียบการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราเมื่อมีการควบคุมพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 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. ศึกษาจนพบศาสตร์ในถังหมักของเชื้อ *Bacillus* 2 สายพันธุ์

เลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3 แล้วทำการ ศึกษาหาหน้าหนัก เซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

5. การผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราจาก *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 องศาเซลเซียส แล้วติดตามการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

5.2 การผลิตในถังหมัก 100 ลิตร

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

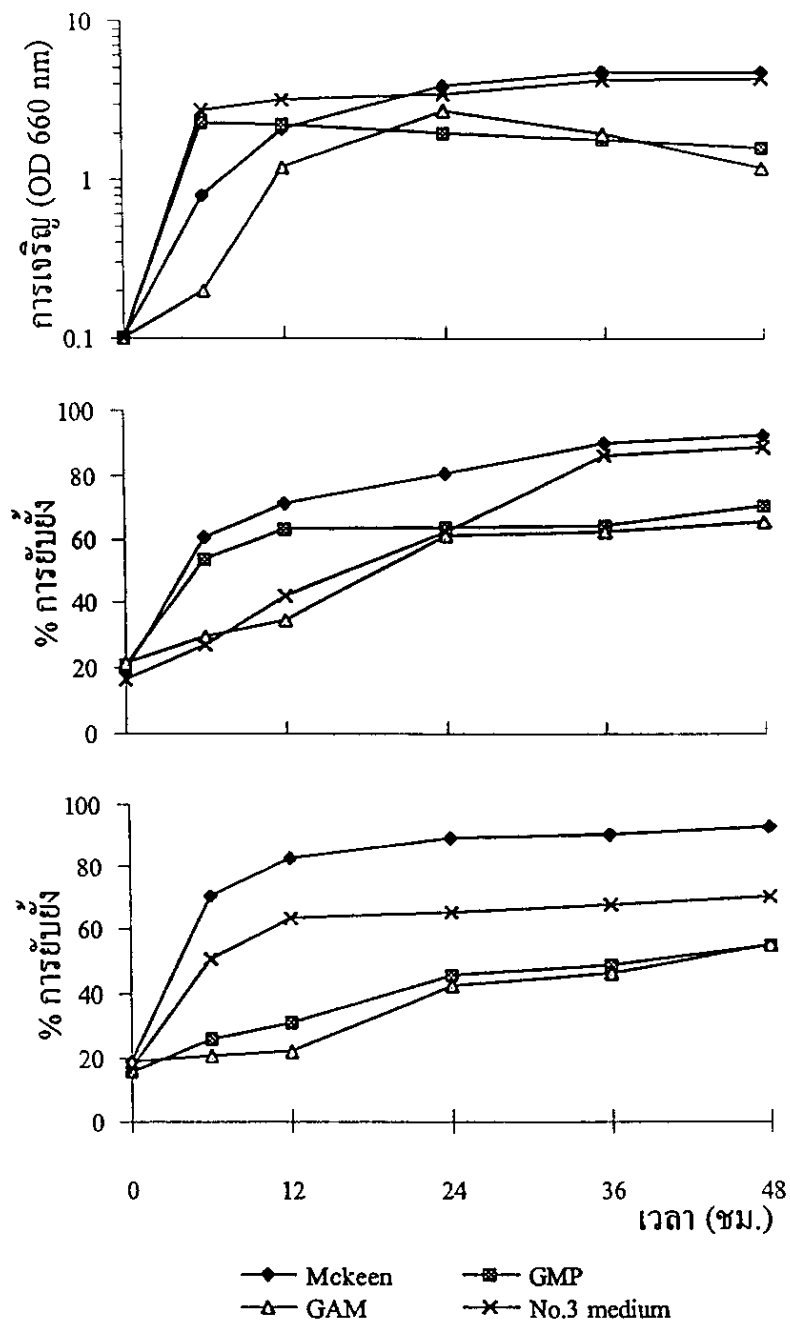
ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* MK 007 ในอาหารที่มีโมลาส 3% เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 10% เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีการเติมแร่ธาตุตามอื่นๆ ตามอาหารสูตร Mckeen โดยใช้สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับ 5.1 ติดตามการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

ผลและวิจารณ์

ก. การผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราจาก *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 สูตรแสดงดังภาพผนวก ก วัดพีเอช วัดการเจริญของเชื้อโดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ต่อเชื้อรา *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 ส่วนผลการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าว นั้น 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 48 หลังจากนั้นการยับยั้งค่อนข้างคงที่หรือลดลงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหารเหลวสูตร Mckeen เป็นอาหารที่ช่วยส่งเสริมหรือชักนำให้ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีการผลิตสารปฏิชีวนะมากที่สุด รองลงมาคือ No.3 medium, GMP และ GAM ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mckeen และคณะ (1986) ที่ผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราจาก *B. subtilis* B-3 โดยมีผลยับยั้งเชื้อรา *Monilinia fructicola* (Wint.) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าในผลไม้ที่มีเมล็ดแข็ง (stone fruit) อาหารที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา คืออาหารสูตร Mckeen เช่นเดียวกัน จากรายงานของ Rytter และคณะ (1989) กล่าวว่าอาหารจะมีผลต่อกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยได้ผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *B. subtilis* ที่มีผลยับยั้งเชื้อรา *Puccinia pelargonii-zonalis*



ภาพที่ 4 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ
B. subtilis NSRS 89-24

สาเหตุโรคราสนิมในถั่วและพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในอาหารเหลว Eugon ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Puccinia pelargonii-zonalis* จะมีมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth เช่นเดียวกับ Iwai และ Omura (1982) ที่กล่าวว่าการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวนั้นขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสถานะของการเลี้ยงเชื้อ 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 แต่การสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทั้ง 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* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าในแอปเปิลและโรคราสีเทาในองุ่น พบว่าเชื้อสร้างสารยับยั้งได้มากที่สุดในช่วงชั่วโมงที่ 60 แต่ในทางตรงกันข้าม Haavik (1973) ก็กล่าวว่าการที่มีการผลิตสารปฏิชีวนะพวกเปปไทด์ในช่วงหลังจากที่มีการเจริญแล้วนั้นไม่เป็นความจริงเสมอไป ถ้าอาหารนั้นมีสถานะที่เหมาะสม 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

ผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen อยู่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง และการทดลองต่อไปจะใช้อาหารเหลวสูตร Mckeen เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวบนเครื่องเขย่า

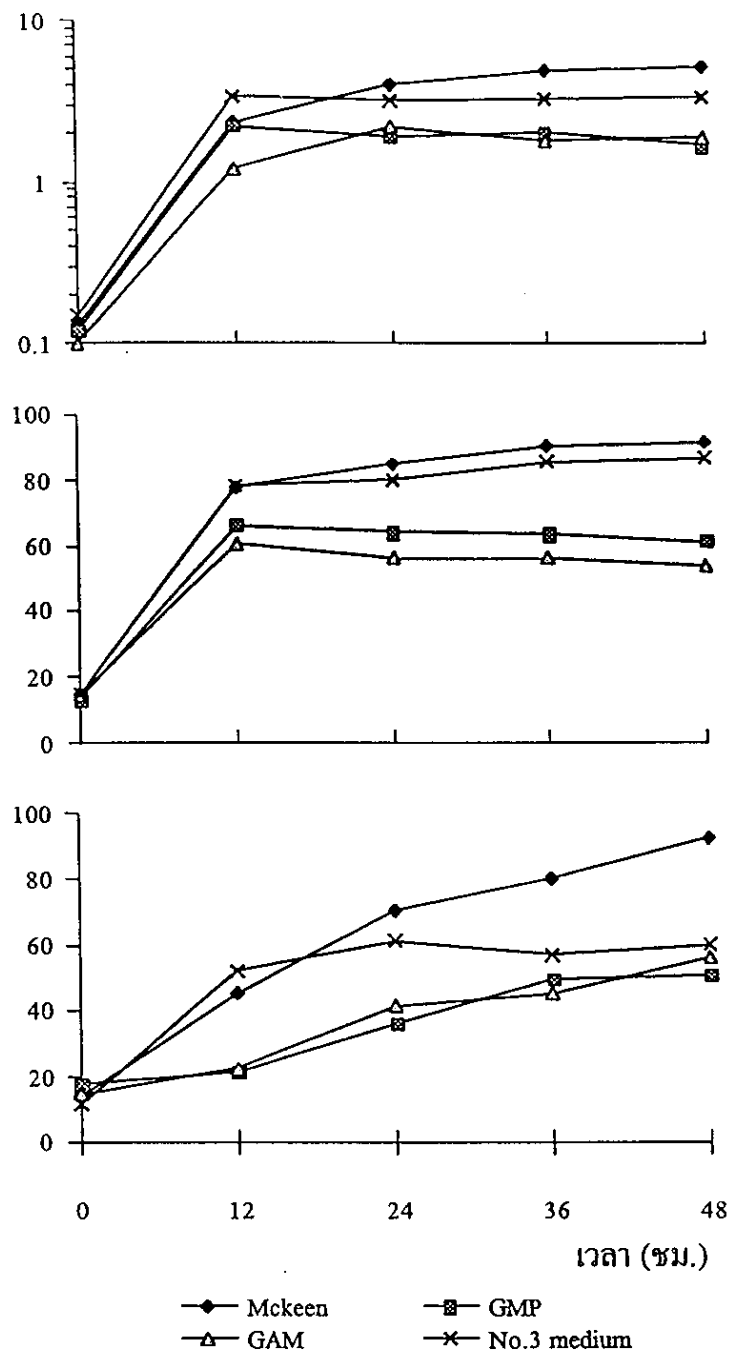
จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรต่างๆพบว่าอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 คือ อาหารเหลวสูตร Mckeen จึงศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารและสภาพที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

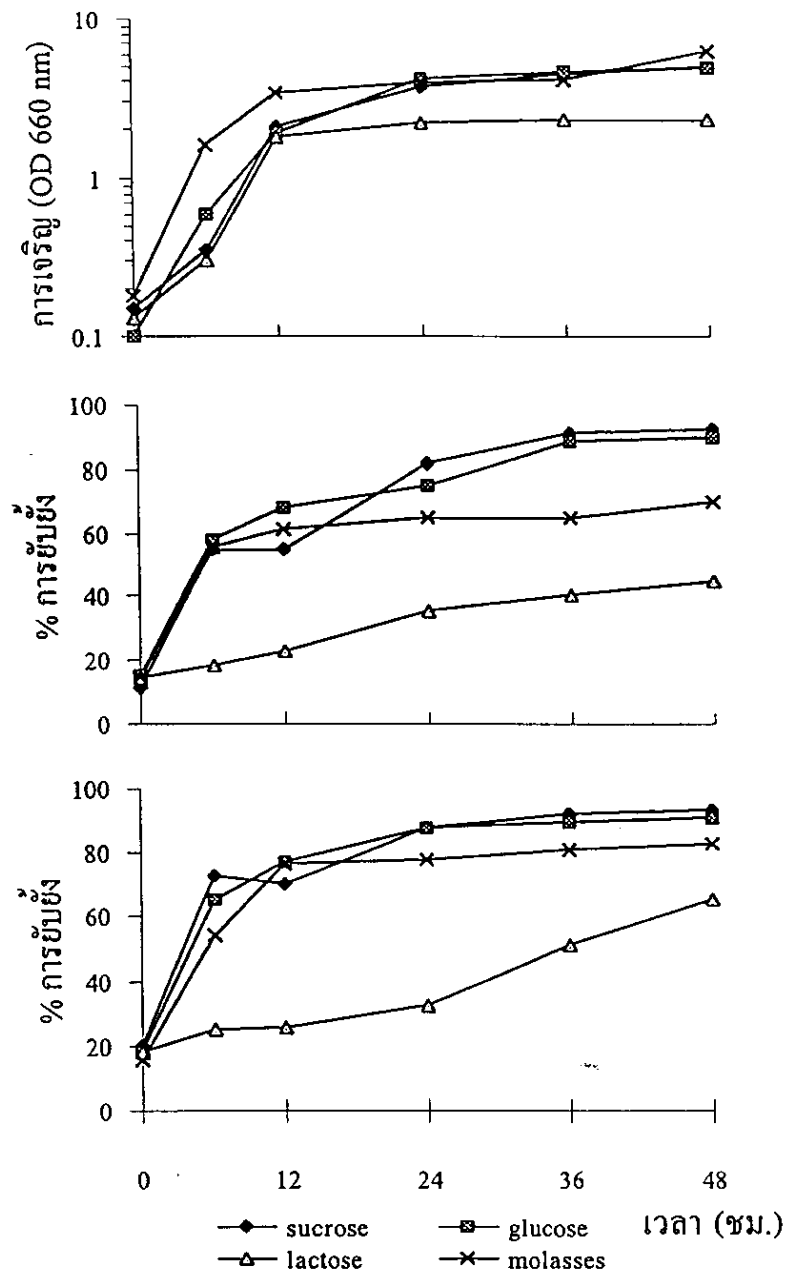
ในการศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen ที่เปลี่ยนแปลงชนิดของน้ำตาลจากกลูโคสเป็นซูโครส แลคโตส และโมลาส ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 6) และ *Bacillus*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

สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เมื่อเจริญในอาหารสูตร Mckeen ที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุด และให้ผลที่แตกต่างกันมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 5, 6, 7 และ 8) เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น โดยสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตได้จาก *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

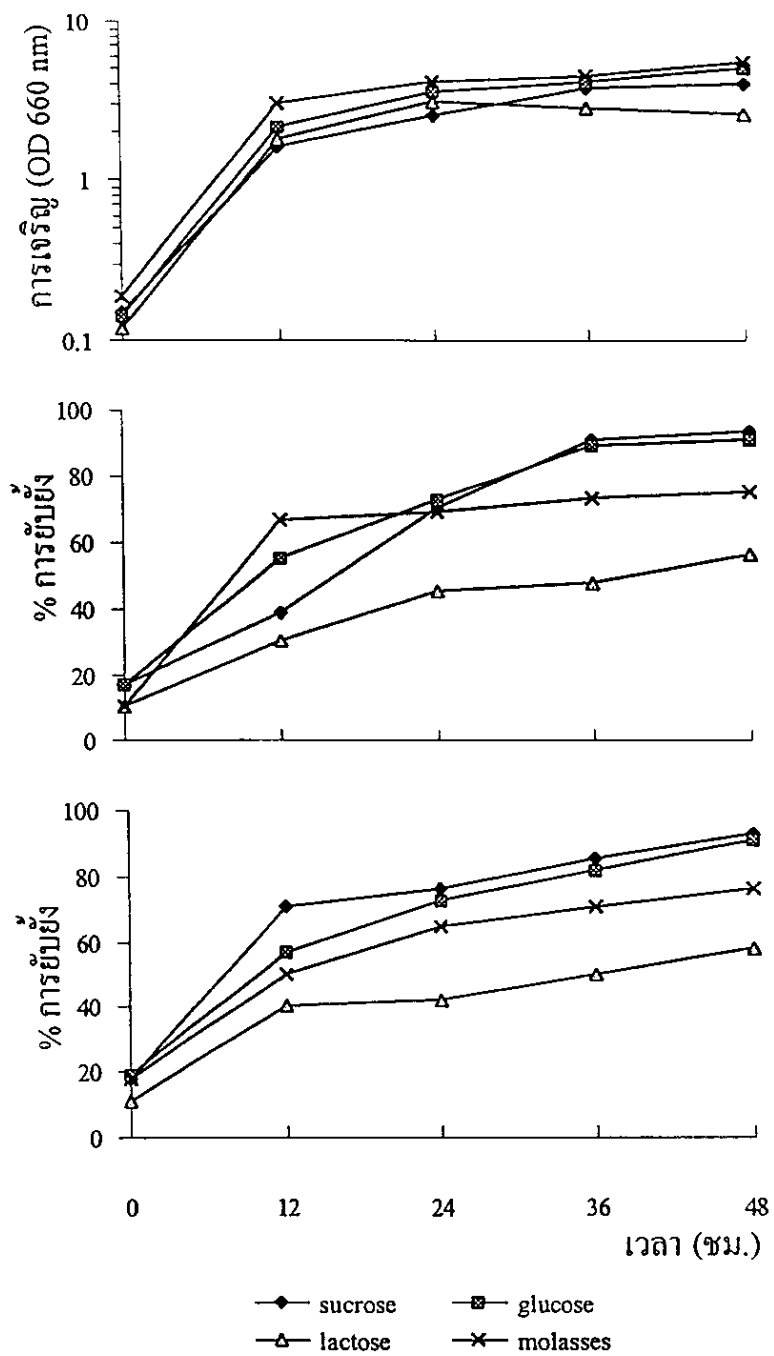
สมใจ เอี่ยมพรรัตน์ (2531) พบว่าในการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* KUBA 8601.2 และ *Bacillus* 8612 นั้นสามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด หรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้



ภาพที่ 5 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ
Bacillus sp. LN 007



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



ภาพที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อการเจริญและการสร้างสาร
ปฏิชีวนะของ *Bacillus* sp. LN 007

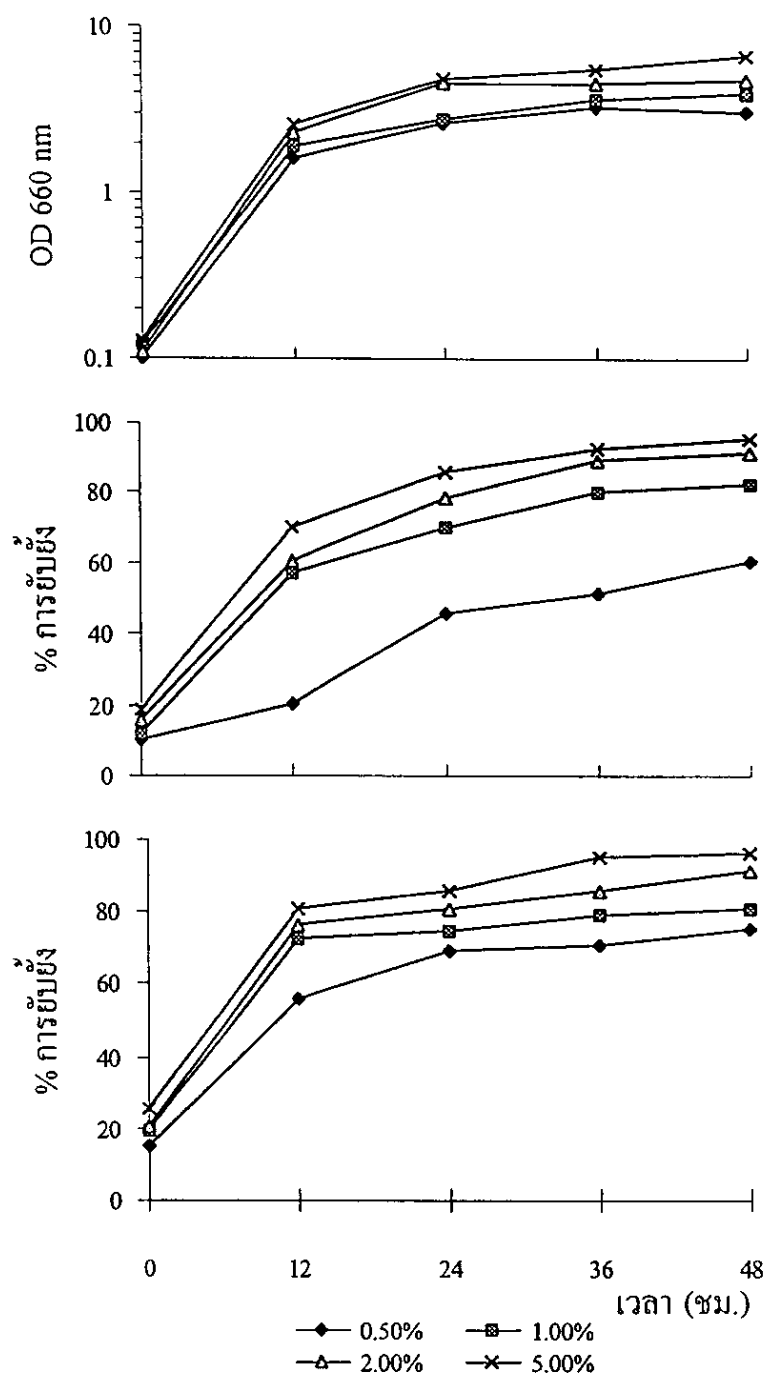
ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกชูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วจึงทำการศึกษาถึงปริมาณของชูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 8) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 9) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของชูโครสร้อยละ 5.0 เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและสามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้สูงกว่าชูโครสร้อยละ 2.0, 1.0 และ 0.5 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 9, 10, 11 และ 12) โดยสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ร้อยละ 95.4 และ 96.5 ตามลำดับ ส่วนสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *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 นั้นจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นชูโครส ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5.0 เพราะว่าสารที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้ดีที่สุด ซึ่งจะเห็นวาระดับความเข้มข้นของชูโครสที่ใช้นั้นค่อนข้างสูง

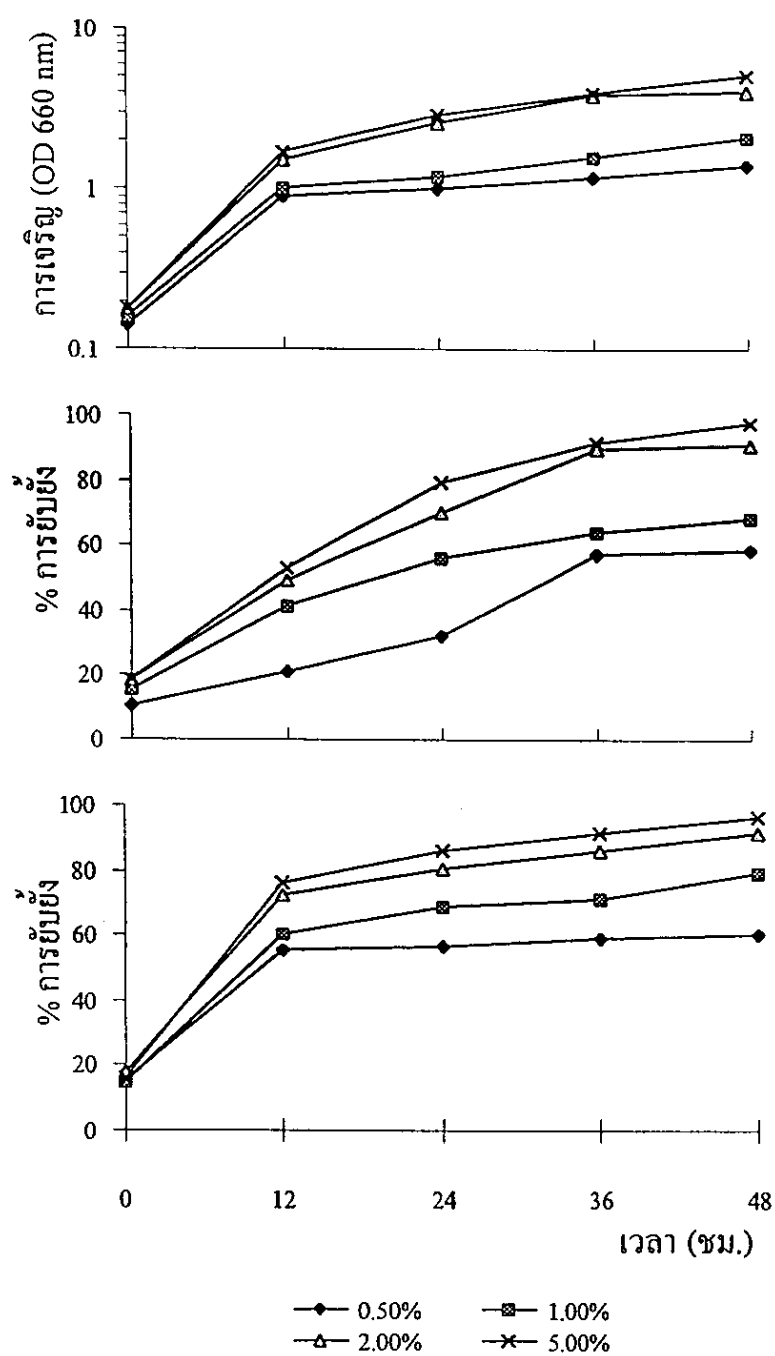
2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษานิคของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ผลแสดงดังภาพที่ 10 และ 11 ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและสามารถสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีกว่าการใช้ glutamic acid, urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4NO_3 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 13, 14, 15 และ 16) โดยสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *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

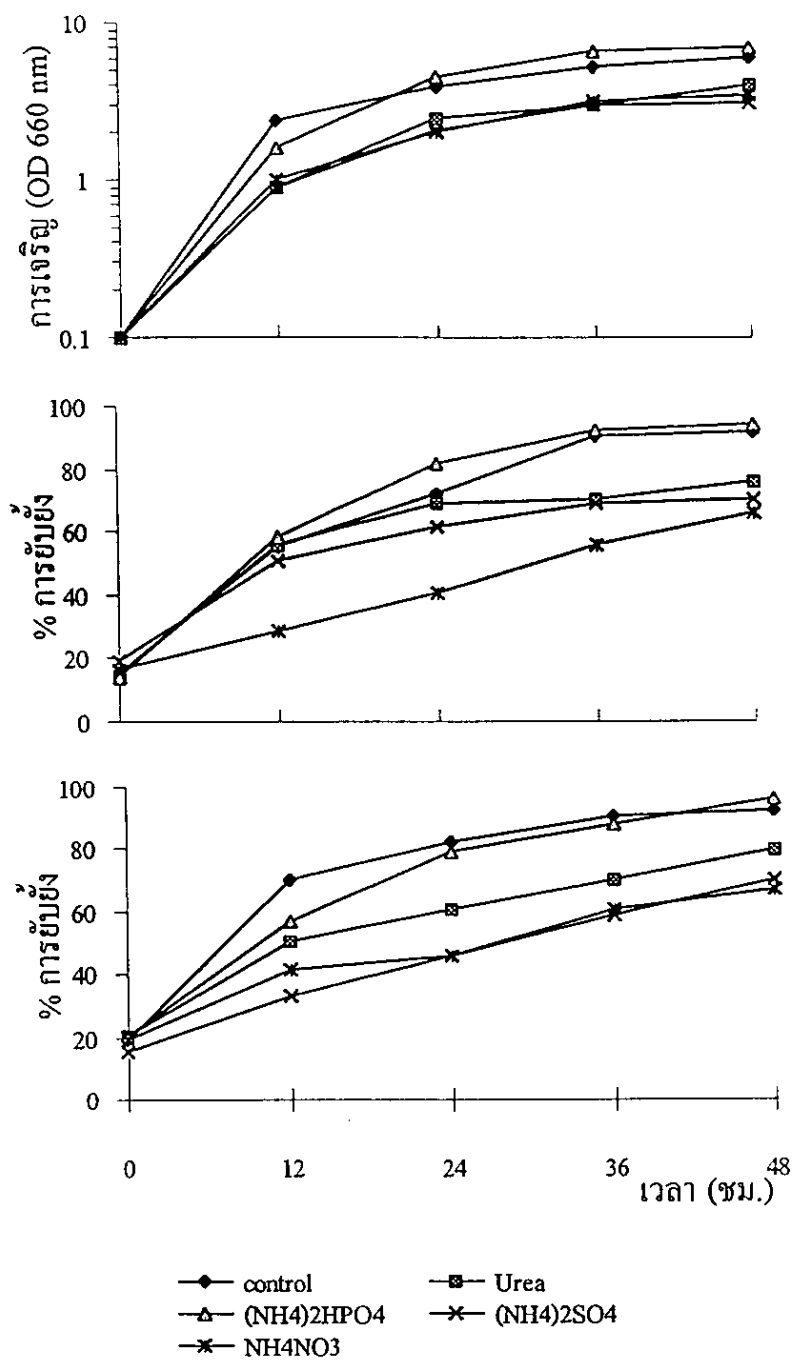
ดังนั้นจึงเลือกใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการทดลองขั้นต่อไป Sandrin และคณะ (1990) รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบนั้น ไนโตรเจนต้องอยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้ง่ายในกระบวนการเมตาโบลิซึม การทดลองนี้ พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารปฏิชีวนะได้มากในอาหารเหลวสูตร Mckeen ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ แต่จากการทดลองของ Sumino และคณะ (1993) ผลิต purine nucleoside จาก *B. subtilis* AB-471 พบว่า



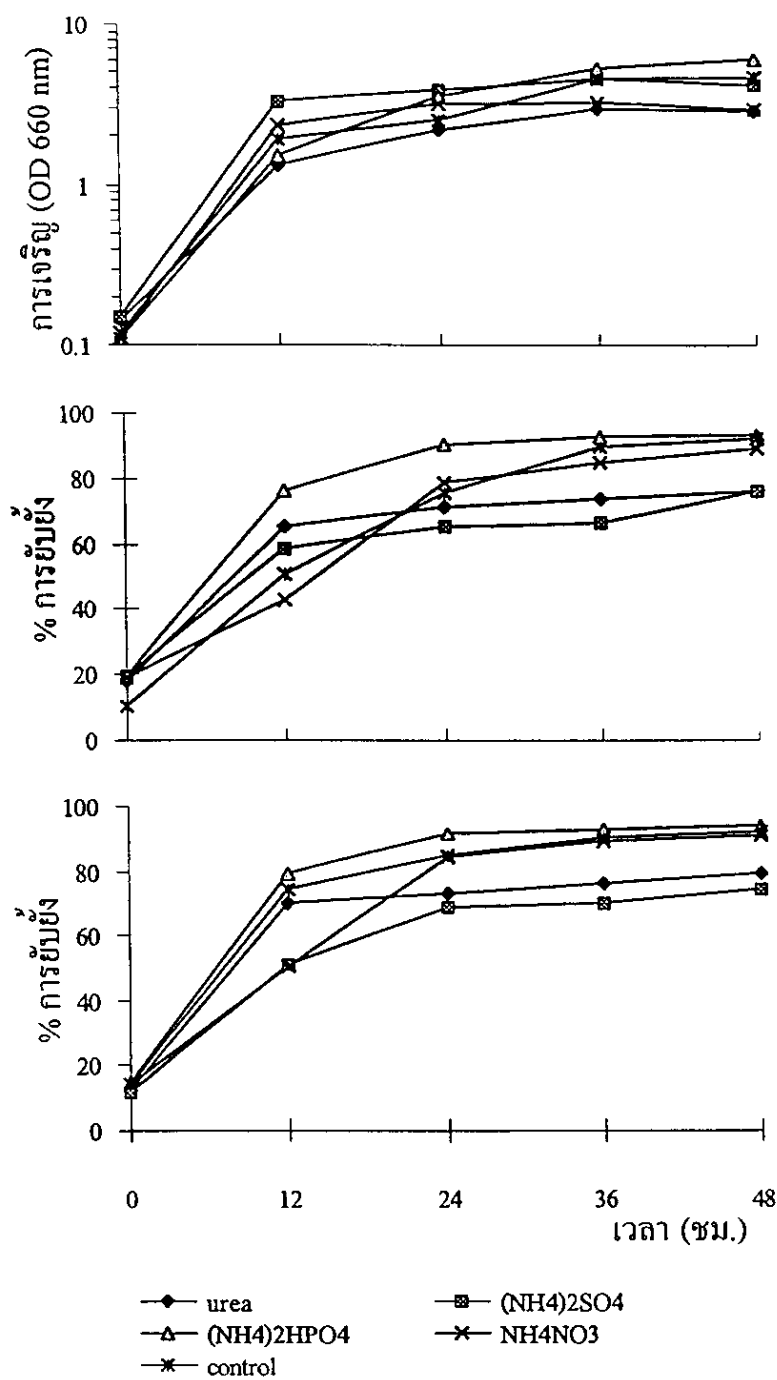
ภาพที่ 8 ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ
B. subtilis NSRS 89-24



ภาพที่ 9 ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ
Bacillus sp. LN 007



ภาพที่ 10 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ
B. subtilis NSRS 89-24



ภาพที่ 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ

Bacillus sp. LN 007

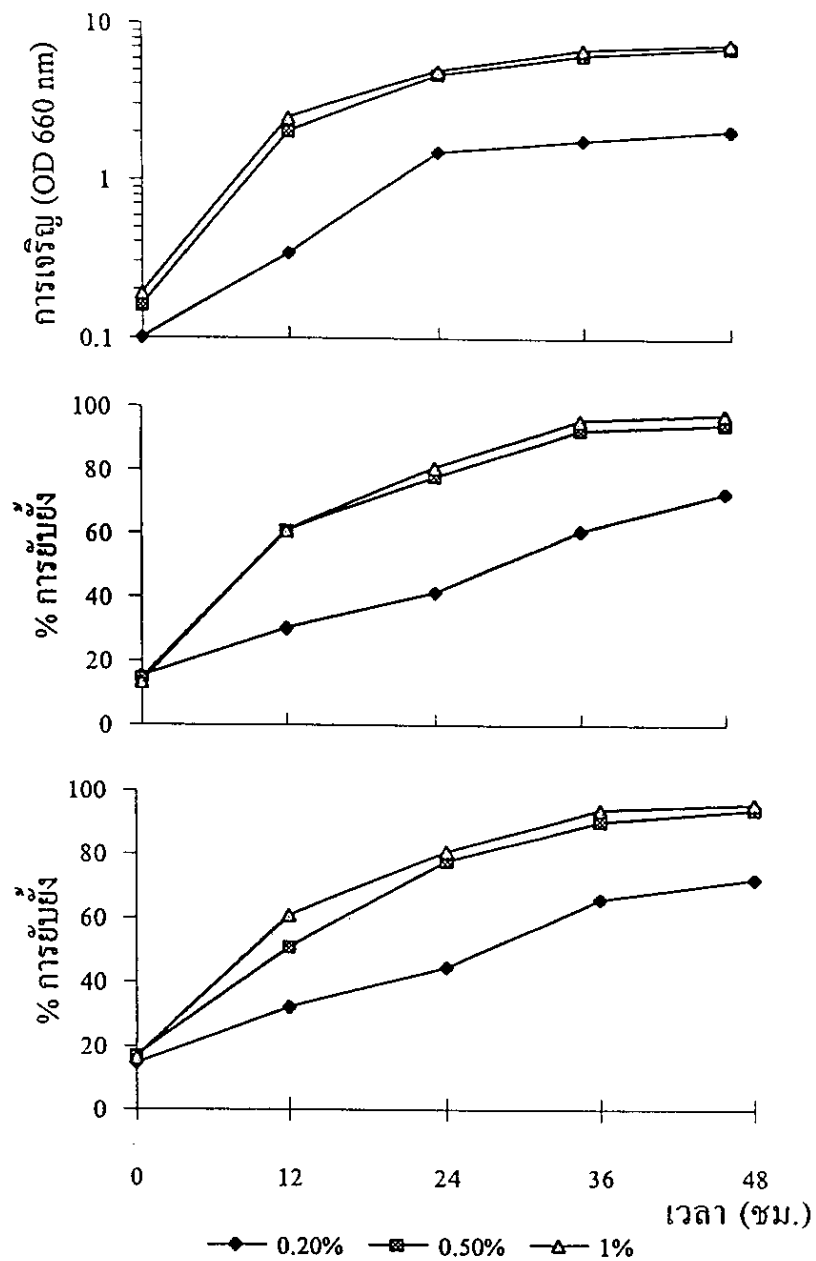
แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตก็คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ urea ส่วน Aharonowitz และ Demain (1979) พบว่าเมื่อใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน หรือร่วมกับ asparagine จะมีผลไปลดการสร้างสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *B. subtilis*

นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนจะมีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวแล้วปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมก็มีความสำคัญเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบถึงปริมาณของ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 12) และจาก *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 13) จากผลดังกล่าว พบว่า $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ให้การเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ *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 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุดร้อยละ 96.1 และ 97.1 ตามลำดับ ดังนั้นจึงใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่ระดับร้อยละ 1.0 ในการทดลองขั้นต่อไป

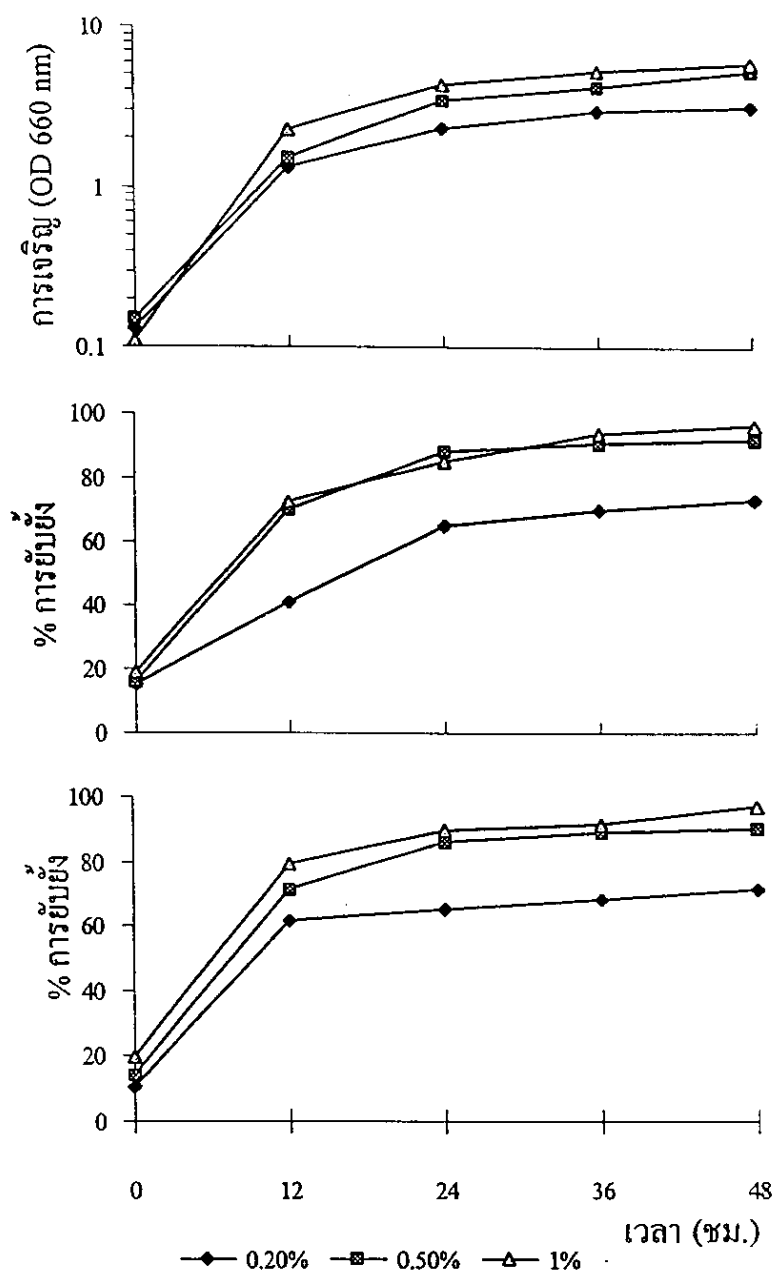
Rytter และคณะ (1989) กล่าวว่าอาหารจะมีผลต่อกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะและเช่น Pusey และ Wilson (1984) พบว่า Yeast extract ที่ผสมกับอาหาร NB จะเป็นการส่งเสริมให้ *B. subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร NB อย่างเดียว และจะไม่ค่อยพบการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ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

2.3 ผลของการเติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย

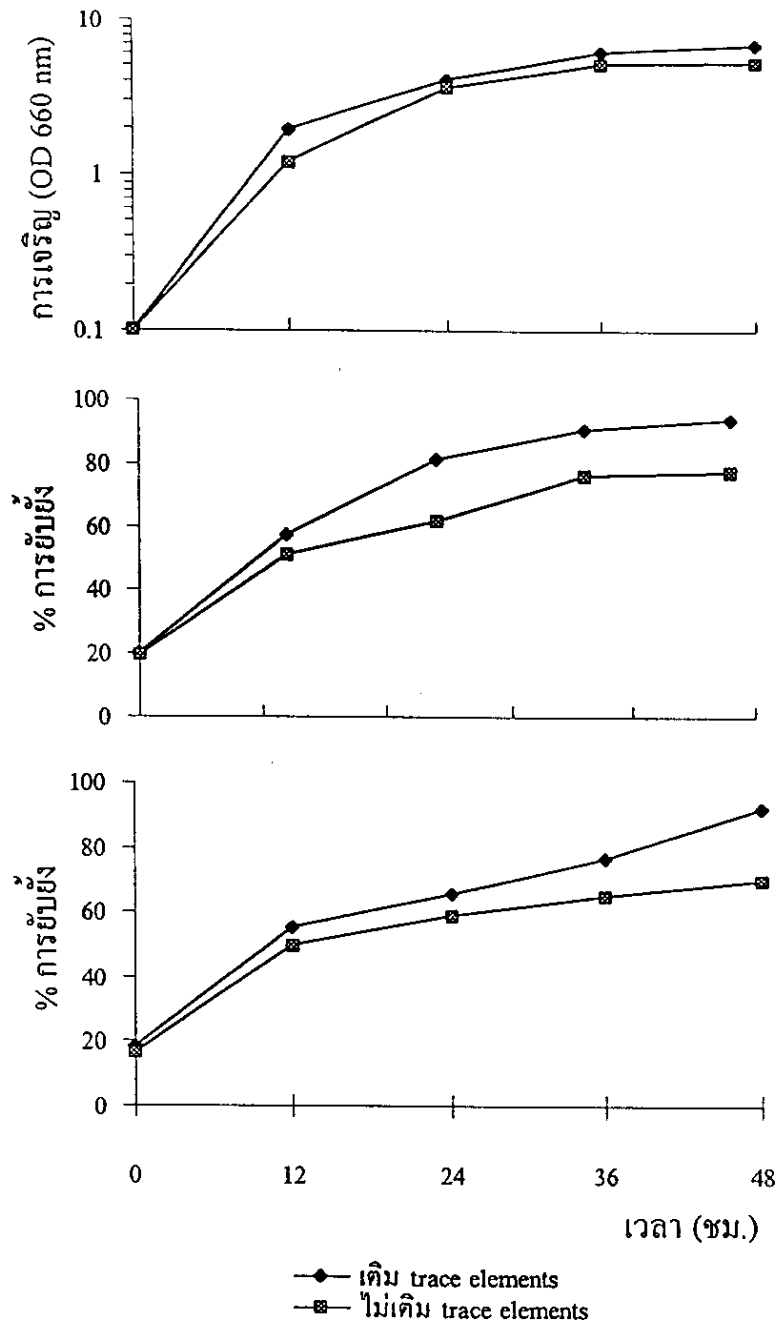
การเปรียบเทียบผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย ในอาหารสูตร Mckeen ซึ่งประกอบด้วย $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ กับอาหารสูตร Mokeen ที่ไม่เติมโลหะเหล่านี้ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 14) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 15) พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร Mokeen ที่ประกอบด้วยโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย เชื้อ *B. subtilis* NSRS



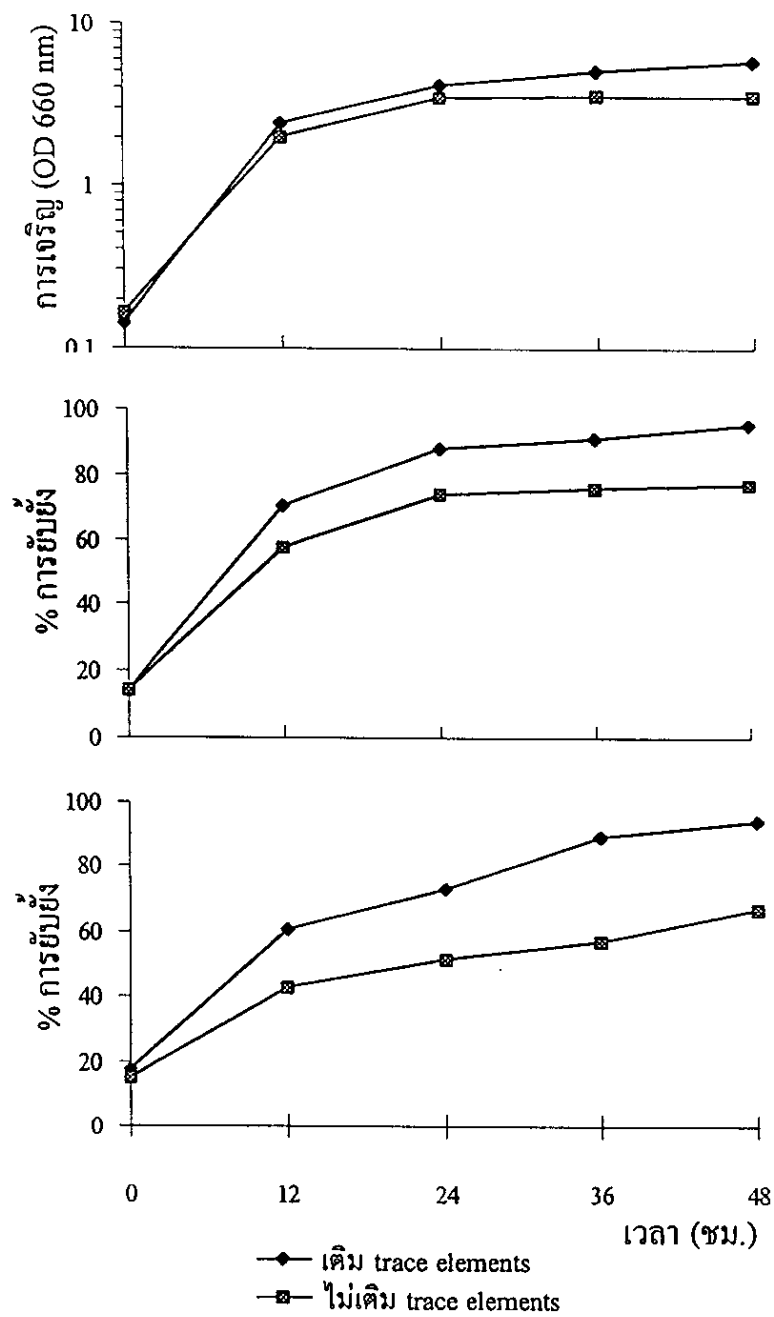
ภาพที่ 12 ผลของ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 13 ผลของ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ
Bacillus sp. LN 007



ภาพที่ 14 ผลของโลหะที่ความต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะ
ต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 15 ผลของโลหะที่เติมในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. LN 007

89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เจริญและสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราเห็ดโรคข้าวได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร 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 สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 93.5 และ 92.3 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 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 เอนกพลิน (2535) ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีท โดยเลี้ยงในอาหาร GMP broth พบว่า $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ซึ่งเป็นโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีท ในทำนองเดียวกัน Bemheimer และ Avigad (1970) ศึกษาการผลิต Subtilysin ซึ่งเป็นสารพวก Subfactin จาก *B. subtilis* พบว่า Mg^{2+} ซึ่งเป็นโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย จะมีผลไปเพิ่มอัตราการออกฤทธิ์ของ Subtilysin และมีรายงานของ Brana และคณะ (1985) กล่าวว่าไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส และโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย จะมีผลอย่างมากในการผลิตสารปฏิชีวนะ

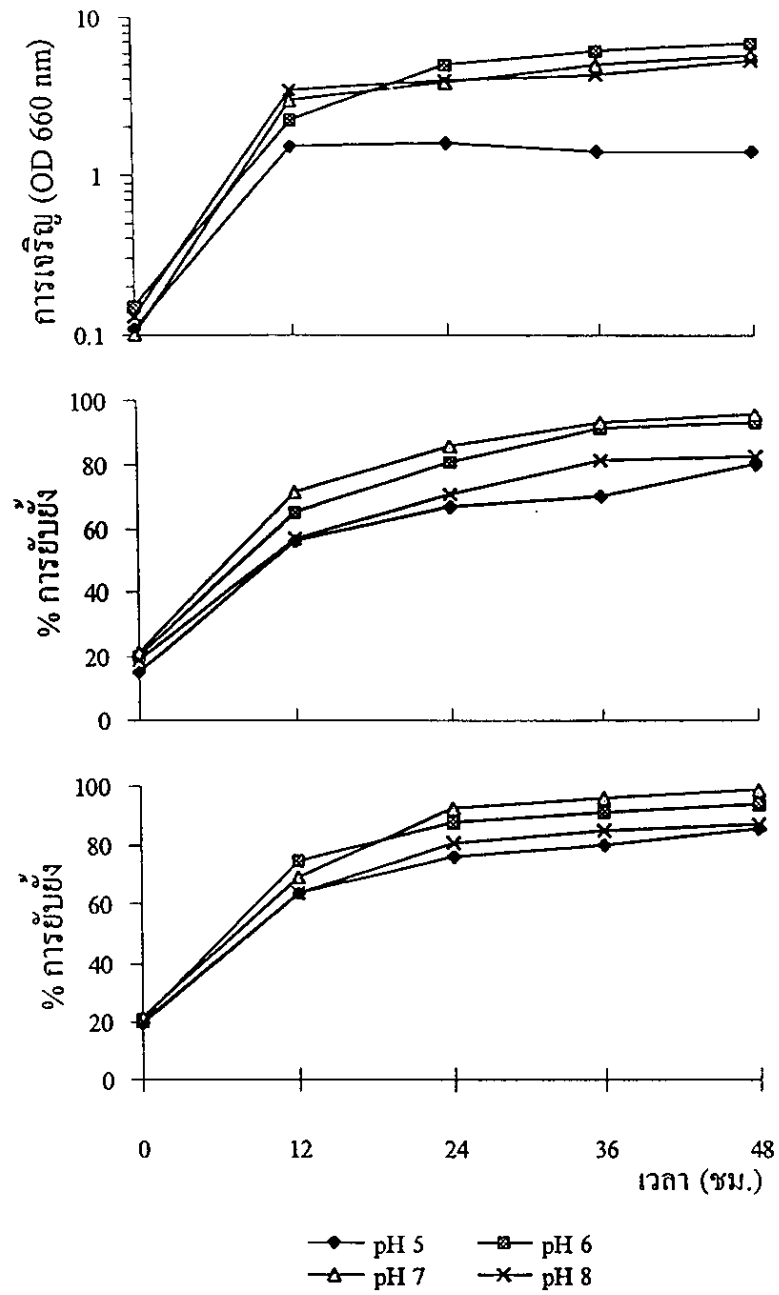
สุชาดา กุชยสิทธิ์ (2535) เลี้ยงเชื้อ *subtilis* B31 ในอาหารเหลวที่ขาดแร่ธาตุ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2SO_4 และ NaCl ผลปรากฏว่าถ้าขาดเกลือซัลเฟตของแมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และโปแตสเซียม มีผลให้ไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะหรือผลิตได้ในปริมาณที่น้อยหรือทำให้ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเปลี่ยนแปลงไปโดยทำให้มีการผลิตสารปฏิชีวนะได้น้อยกว่าชุดควบคุมที่มีแร่ธาตุต่างๆครบถ้วนและเมื่อเพิ่มเติมแร่ธาตุบางชนิดเช่น $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 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

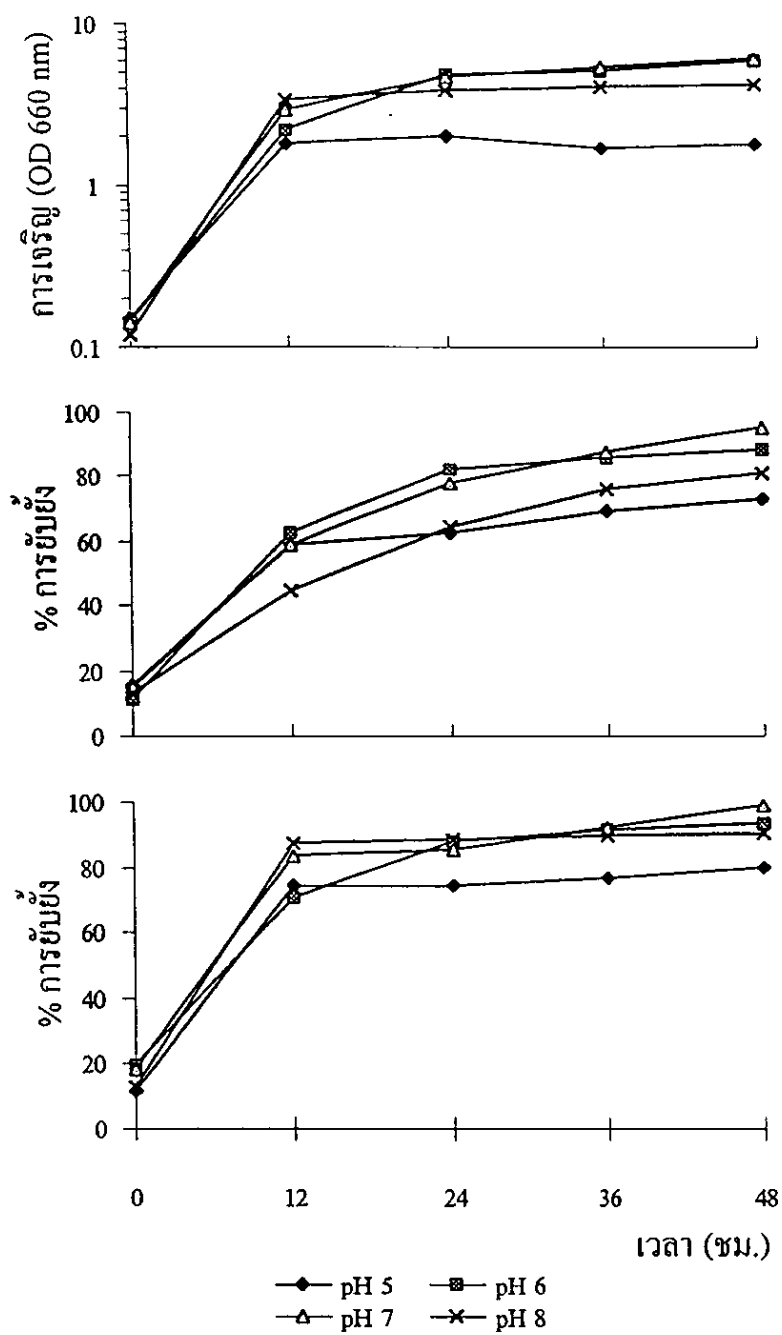
สมใจ ศิริโชค (2537) กล่าวว่าโดยทั่วไปมักจะพบโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยเจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด และฟาร์มาซีเดีย (ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองได้จากเอมบริโอของเมล็ดฝ้ายที่บดละเอียด) ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ที่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการอาหารโดยตรง แร่ธาตุต่างๆ ที่เติมลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ตามปกตินิยมใช้ในรูปแบบสารอนินทรีย์

2.4 ผลของพีเอชเริ่มต้น

นอกจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีพีเอชต่าง ๆ กัน 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 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (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 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา
ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



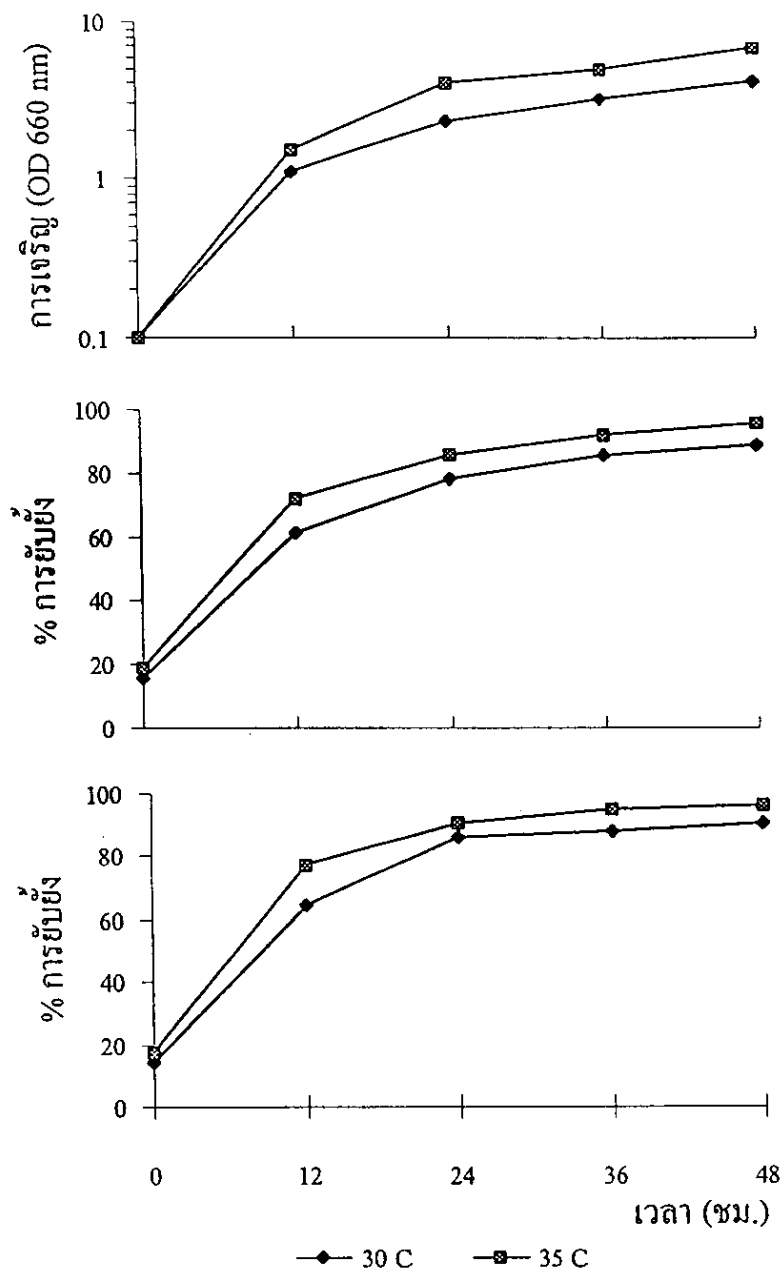
ภาพที่ 17 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา
ของ *Bacillus* sp. LN 007

2.5 ผลของอุณหภูมิ

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

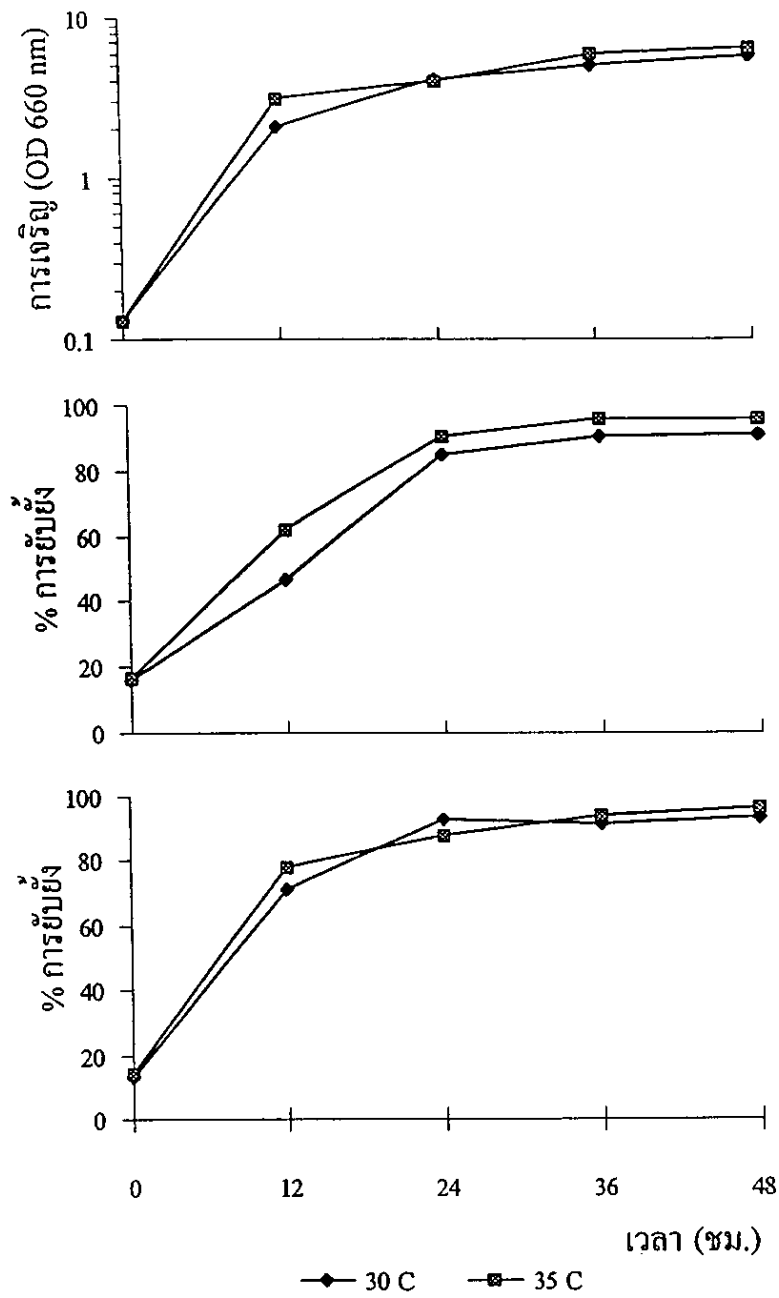
2.6 ผลของการให้อากาศ

ผลจากการศึกษาถึงการให้อากาศในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 20) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 21) เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยการเปลี่ยนปริมาตรของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ แต่ไม่เปลี่ยนขนาดของฟลาสก์ และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ 50 100 และ 150 มิลลิลิตร ต่อฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าปริมาตรของอาหารที่แตกต่างกันในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว กล่าวคือ เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ เจริญและสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในฟลาสก์ขนาด 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

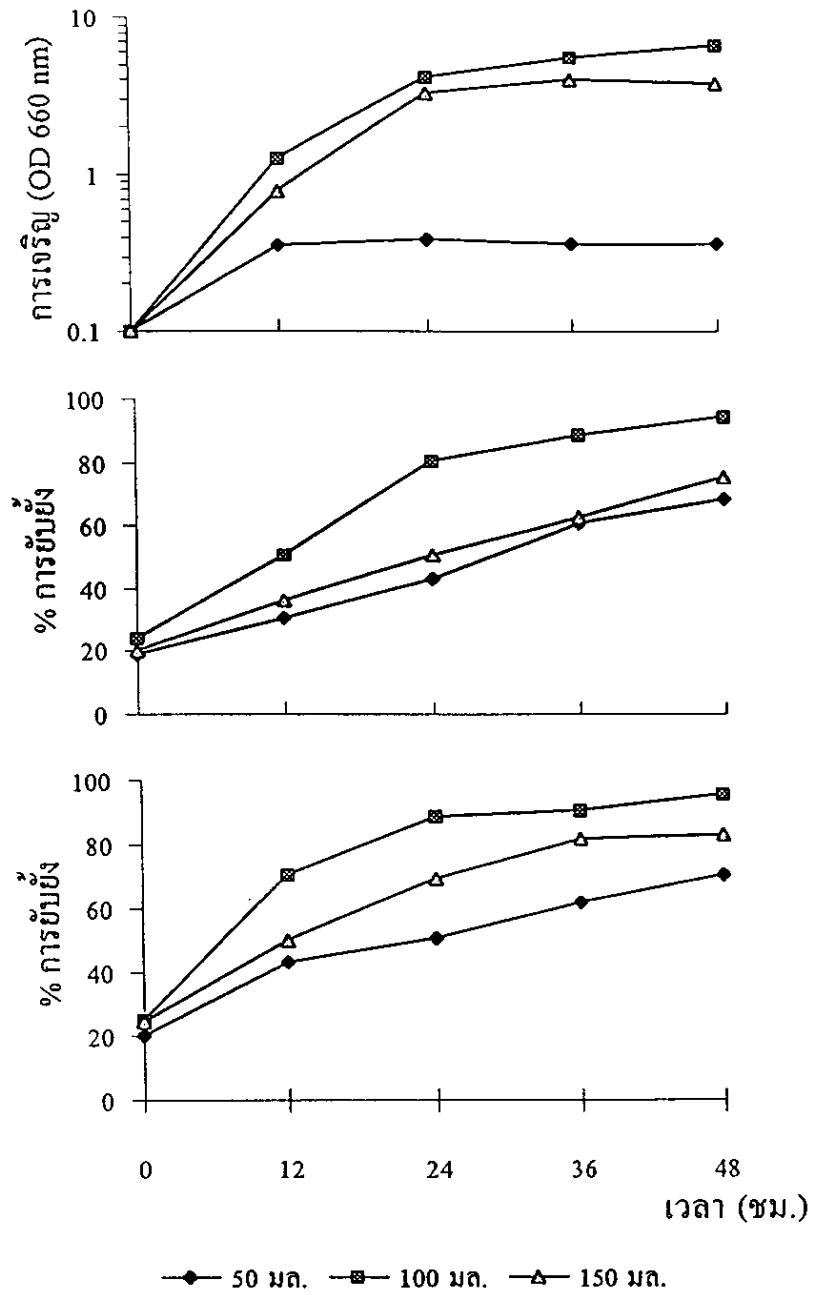


ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ

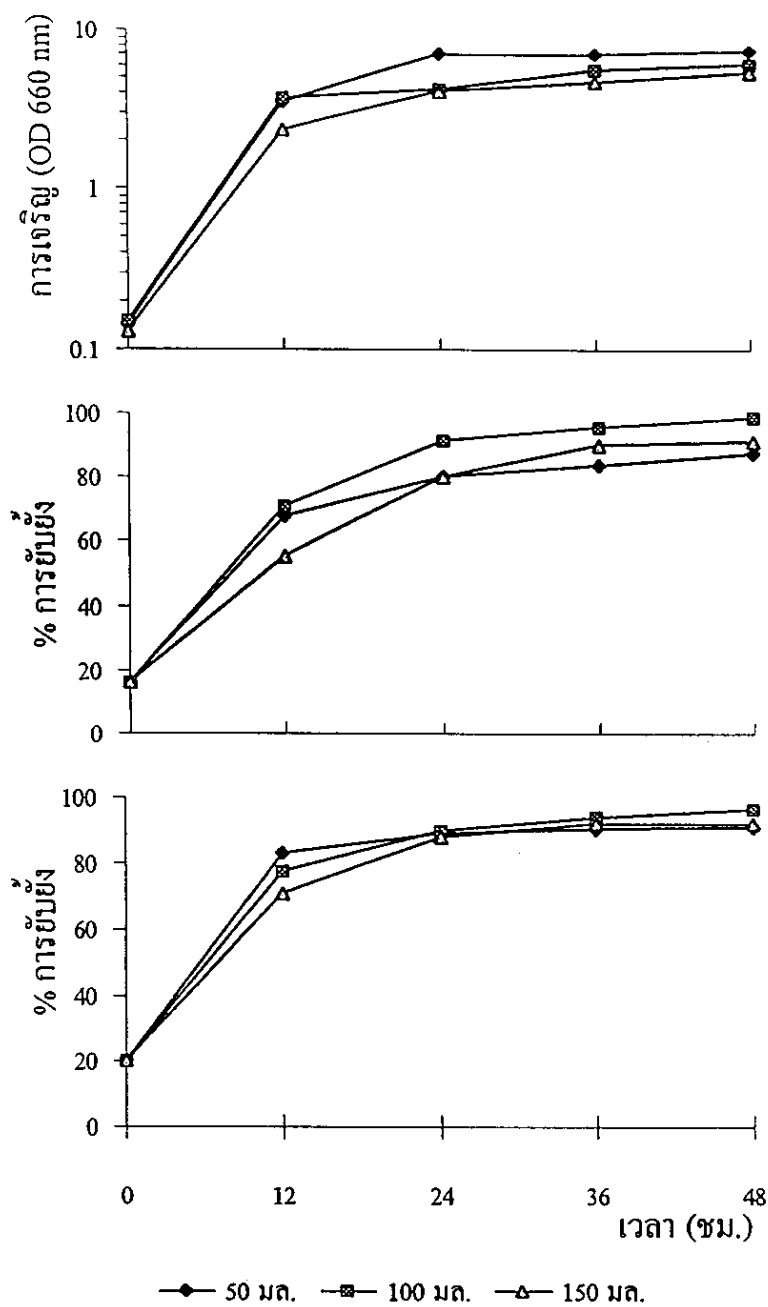
B. subtilis NSRS 89-24



ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ
Bacillus sp. LN 007



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



ภาพที่ 21 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ
Bacillus sp. LN 007

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

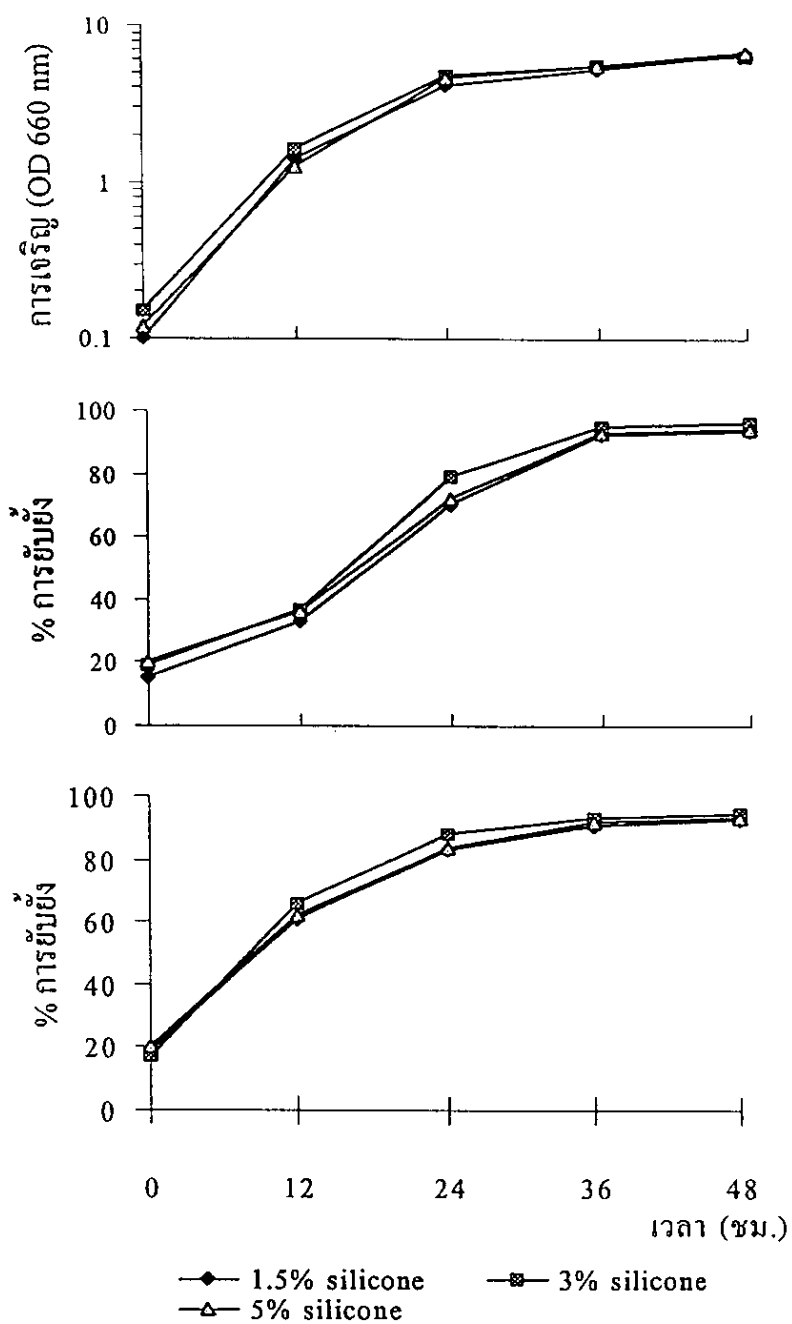
2.7 สารกำจัดฟอง

การผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวจาก *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 silicone ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (ภาพที่ 22 และ 23) และ polypropylene glycol (PG-2000) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (ภาพที่ 24 และ 25) ต่อการเจริญและออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตได้ โดยเติมสารกำจัดฟองลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 1.5 3.0 และ 5.0 พบว่าสารกำจัดฟองทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลยับยั้งการเจริญและการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตได้ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 37,38,39,40,41,42,43 และ 44) แสดงว่าสารกำจัดฟองทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ หรือไม่ไปรบกวนการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว แต่จากการศึกษาผลของสารกำจัดฟอง 3 ชนิด คือ silicone antispumin และ PG-2000 ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* B31 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ของ สุชาดา คุชชัยสิทธิ์ (2535) พบว่า สารกำจัดฟองทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการกำจัดฟองแตกต่างกัน โดยที่แต่ละชนิดมีความสามารถในการกำจัดฟองได้ดีตามลำดับคือ silicone > antispumin > PG-2000 และการใช้ silicone เชื้อจะยังคงผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี ส่วนการใช้ antispumin จะทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะลดต่ำลง ในขณะที่การใช้ PG-2000 จะทำให้เชื้อไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะ

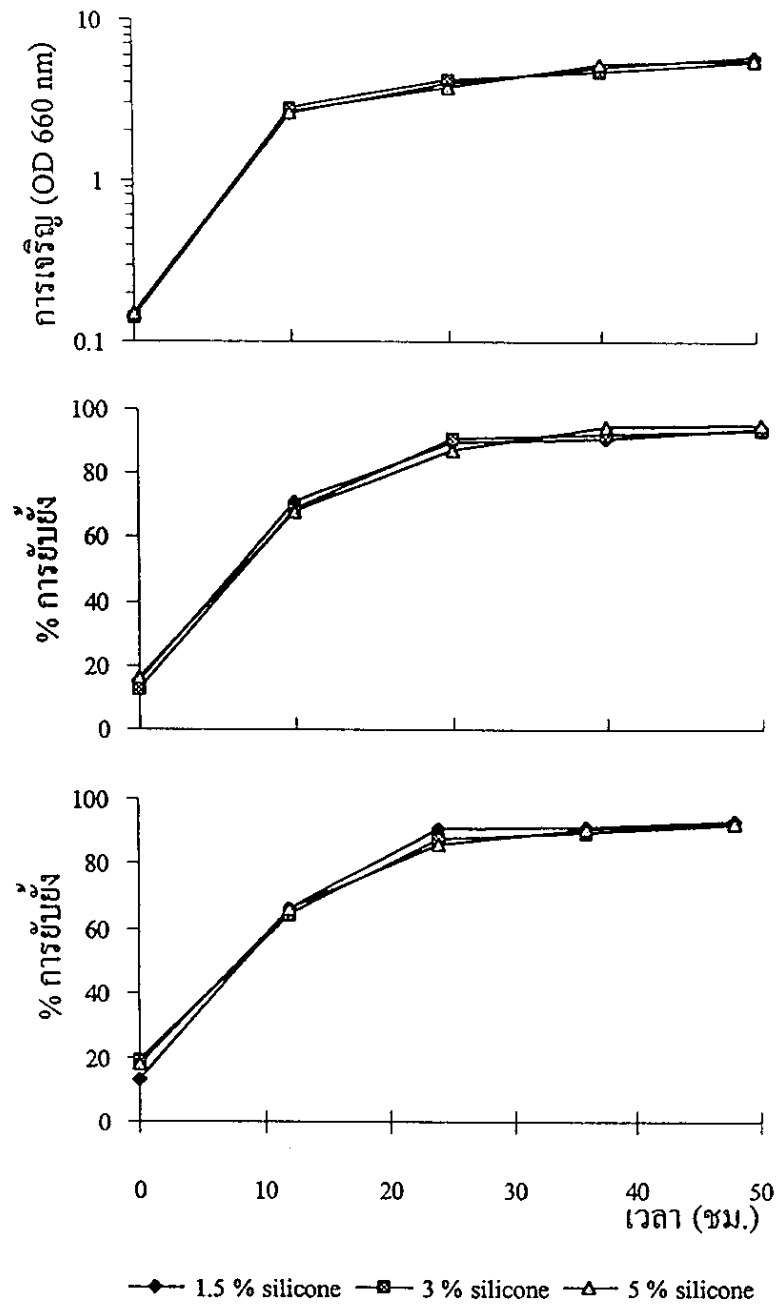
3. ชนิดของ complex medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

3.1 การใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน

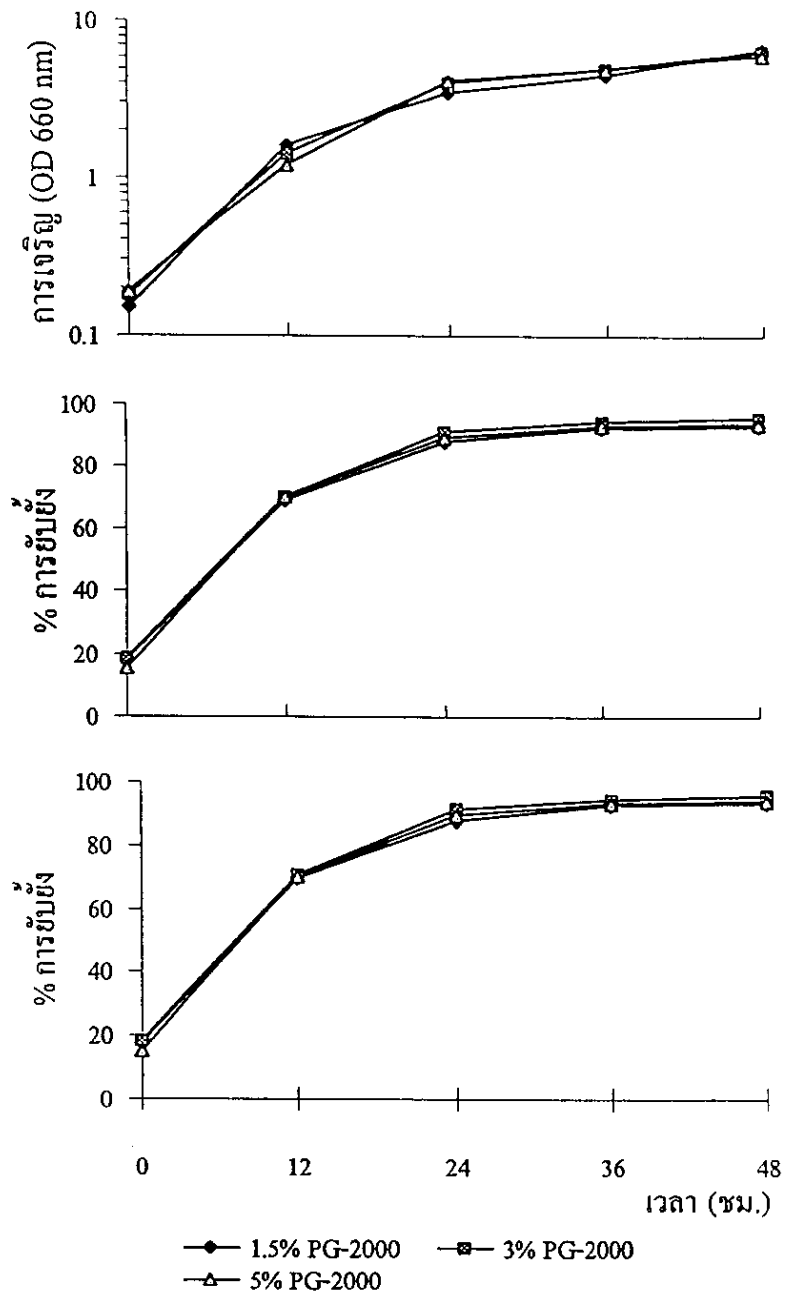
โมลาสเป็นวัสดุเศษเหลือของอุตสาหกรรมน้ำตาล เหตุผลสำคัญในการใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนก็คือราคาต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุ สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และวิตามิน องค์ประกอบทางเคมีของโมลาสที่วิเคราะห์ได้แสดงดังตารางที่ 3 โดยโมลาสมีน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 58 เมื่อใช้โมลาสนี้ร้อยละ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



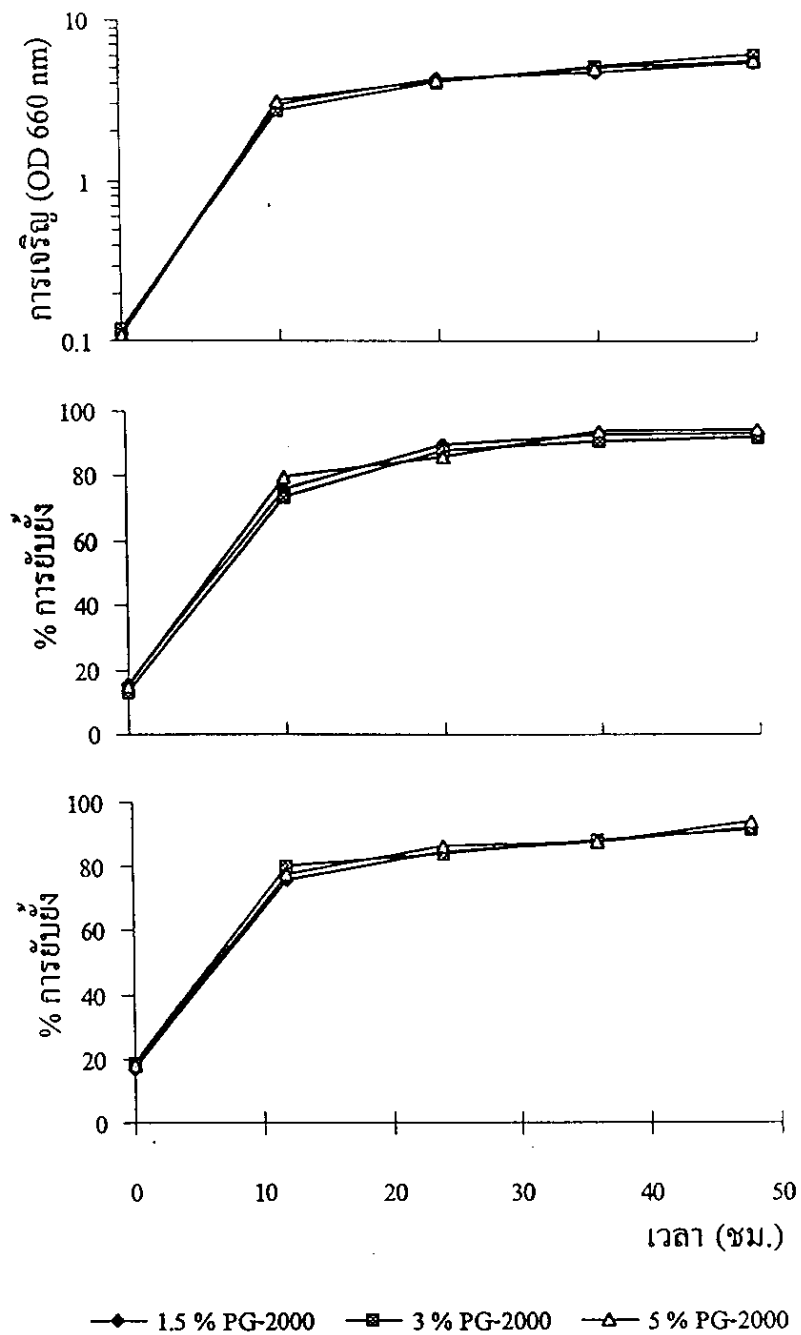
ภาพที่ 22 ผลของ silicone ต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



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



ภาพที่ 24 ผลของ PG-2000 ต่อการเจริญและการสร้างสารพหิพียูคัยต่อเชื้อราของ
B. subtilis NSRS 89-24



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

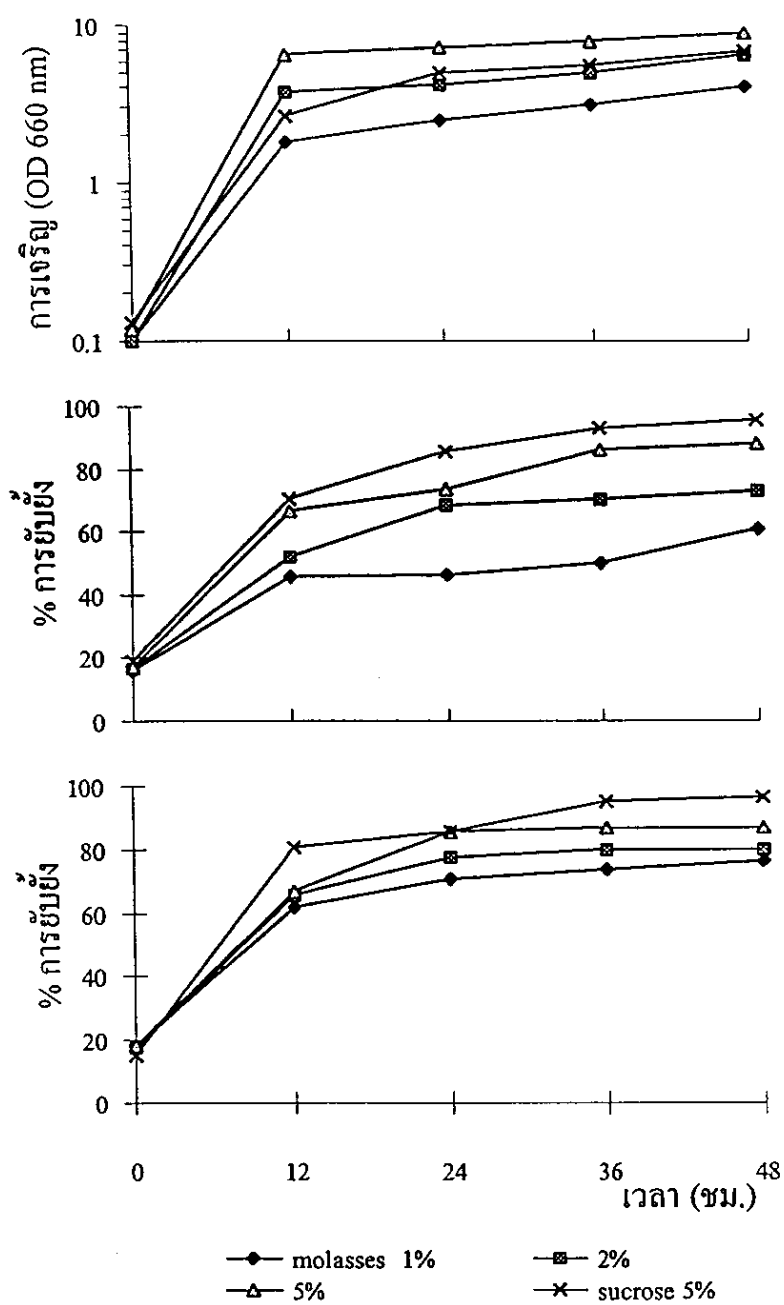
การทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 (ภาพที่ 26) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 27) เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีที่สุดเมื่อใช้โมลาสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนซูโครส โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 45, 46, 47 และ 48) และสารที่ผลิตได้จาก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

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของโมลาส

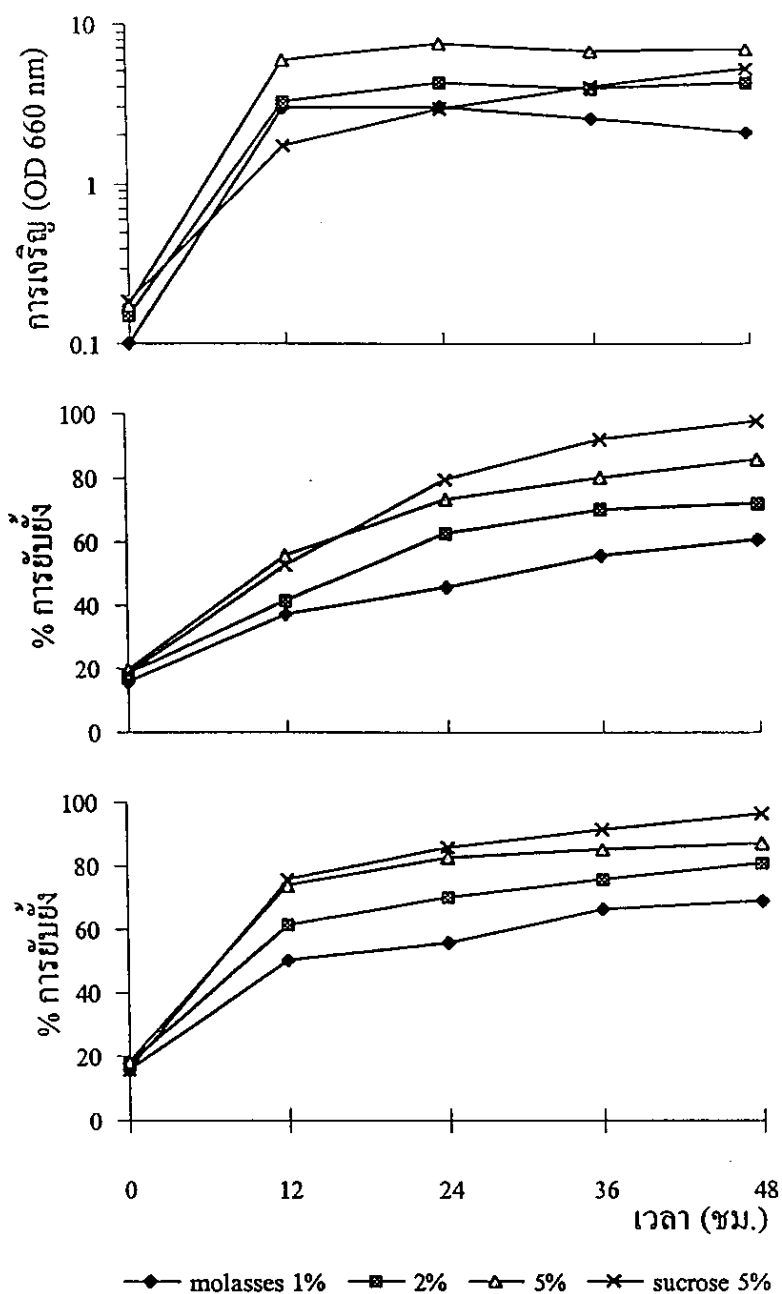
น้ำตาลทั้งหมด	58 %
สารที่ละลายได้ทั้งหมด	83 %
แมกนีเซียม	300.916 (มก./ล)
แมงกานีส	4.581 (มก./ล)
เหล็ก	29.494 (มก./ล)

3.2 การใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้เป็นแหล่งไนโตรเจน

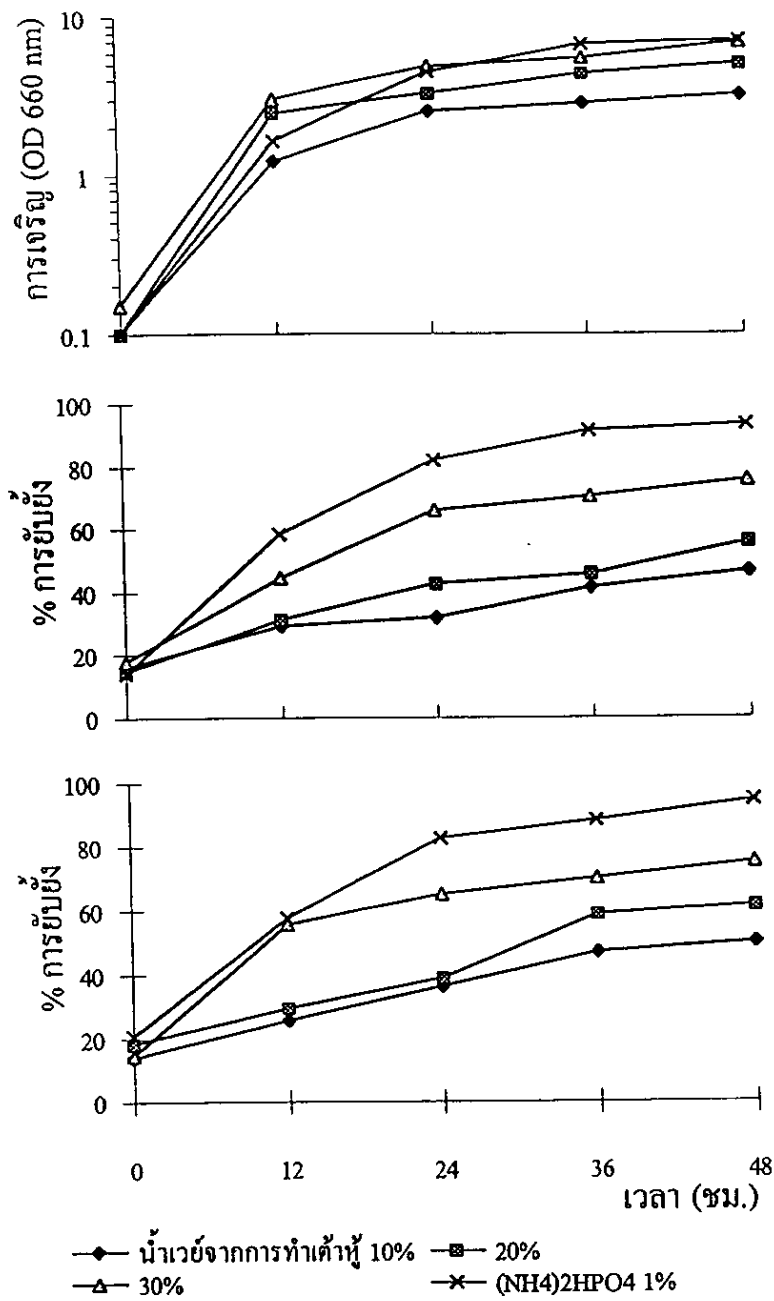
การทดลองใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้แทน $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ร้อยละ 1.0 ในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุงที่มีซูโครสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ (ไนโตรเจน 0.074 % และ โปรตีน 0.42%) ร้อยละ 10 20 และ 30 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 28) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 29) เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีเมื่อน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 49, 50, 51 และ 52) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24



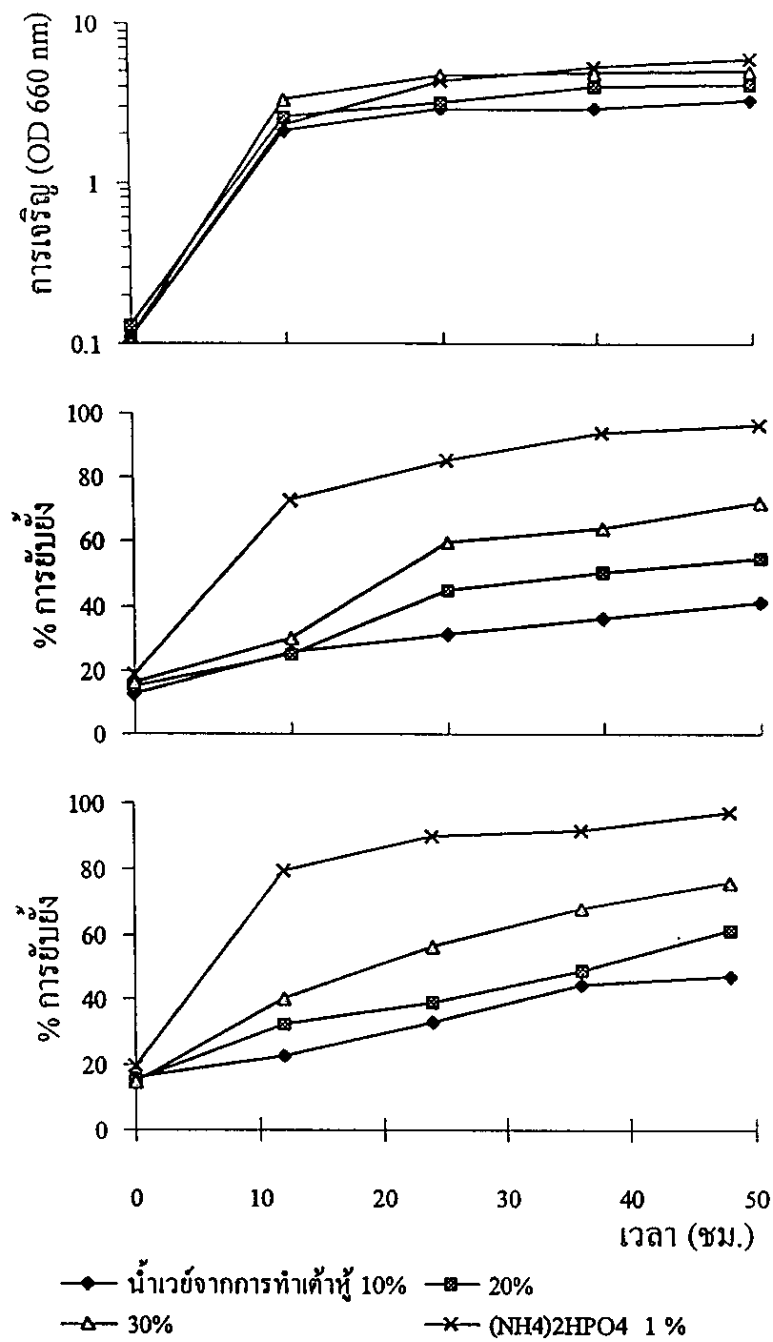
ภาพที่ 26 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา
ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 27 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา
ของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 28 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ (NH₄)₂HPO₄ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 29 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ *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 พิเศษก็มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก จะเห็นว่าเมื่อใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30 แทน $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ร้อยละ 1 การเจริญของเชื้อจะไม่แตกต่างกัน แต่ประสิทธิภาพของสารที่ผลิตได้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวจะแตกต่างกัน พบว่าการใช้น้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ร้อยละ 30 ประสิทธิภาพของสารที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้น้อยกว่าการใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ร้อยละ 1 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 49, 50, 51 และ 52)

จากการศึกษาของ สมใจ เอี่ยมพรรณ์ (2531) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* KUBA 8612 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะนั้นจะขาดกลูโคสและ L-asparagine ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนไม่ได้ แต่สามารถใช้กากถั่วเขียวเป็นแหล่งไนโตรเจนแทน L-asparagine

จากสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวน์ต่อเชื้อราที่ได้นี้จะเห็นว่า *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้โมลาส และน้ำเวย์จากการทำเต้าหู้ในการผลิตสารปฏิชีวน์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว แม้ว่าสารปฏิชีวน์ต่อเชื้อราที่ผลิตได้จะมีฤทธิ์น้อยกว่าการใช้ซูโครส และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ แต่หากมีการศึกษาโดยละเอียดก็จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตสารปฏิชีวน์ต่อเชื้อราได้ในระดับอุตสาหกรรม

ข. การผลิตสารปฏิชีวน์ต่อเชื้อราจาก *Bacillus* โดยการเลี้ยงในถังหมักขนาด 3 ลิตร

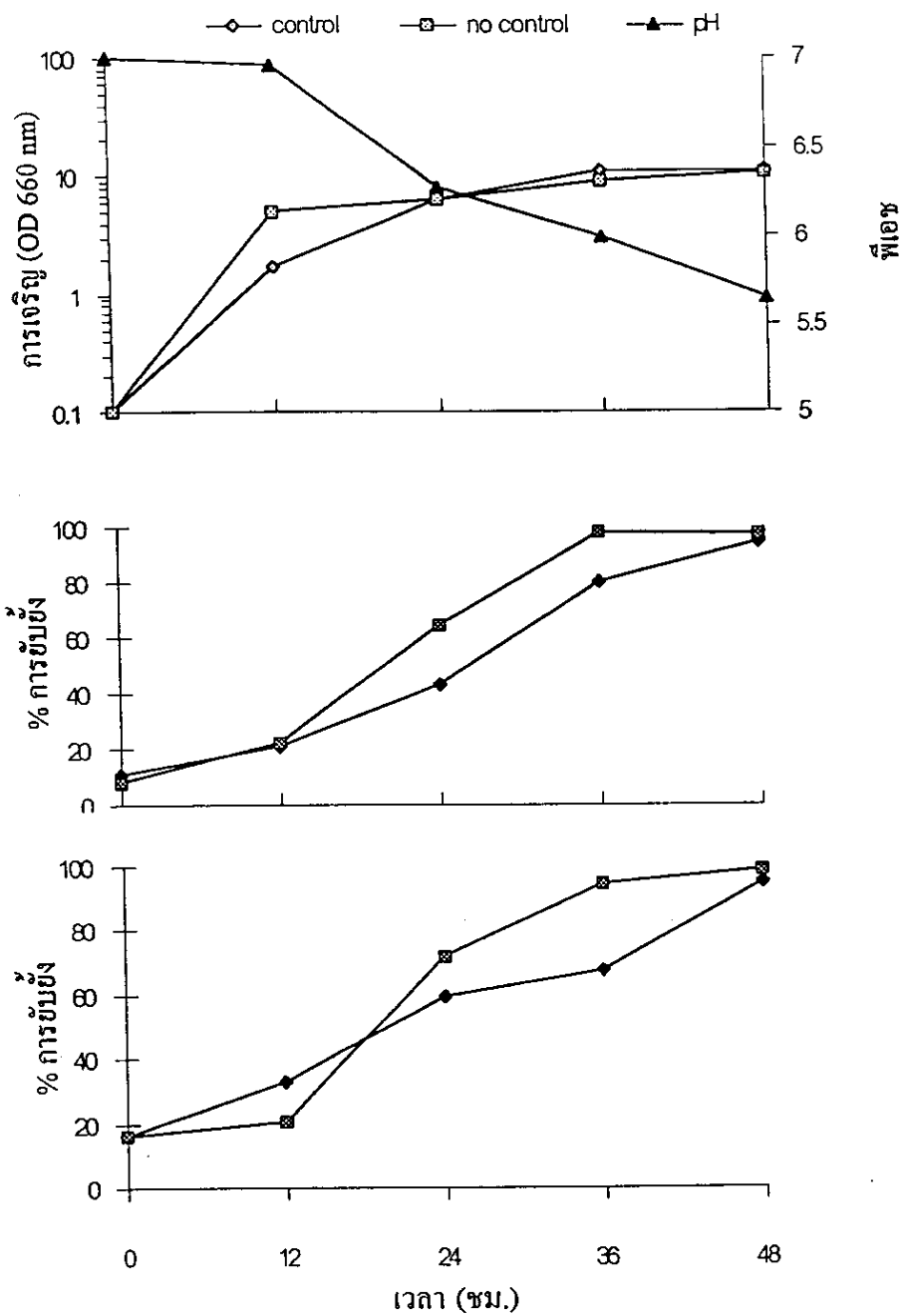
ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชเริ่มต้น และความสัมพันธ์ของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ รวมทั้งจลนพลศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* สองสายพันธุ์ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเหลว (ซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาบนเครื่องเขย่า) ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง ประกอบด้วย sucrose 50.0 ก/ล, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10.0 ก/ล, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.02 ก/ล, K_2HPO_4 1.0 ก/ล, KCl 0.5 ก/ล, และ trace elements 1.0 มล/ล ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16 กรัม, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

1. ผลของการควบคุมฟิเอชเริ่มต้น

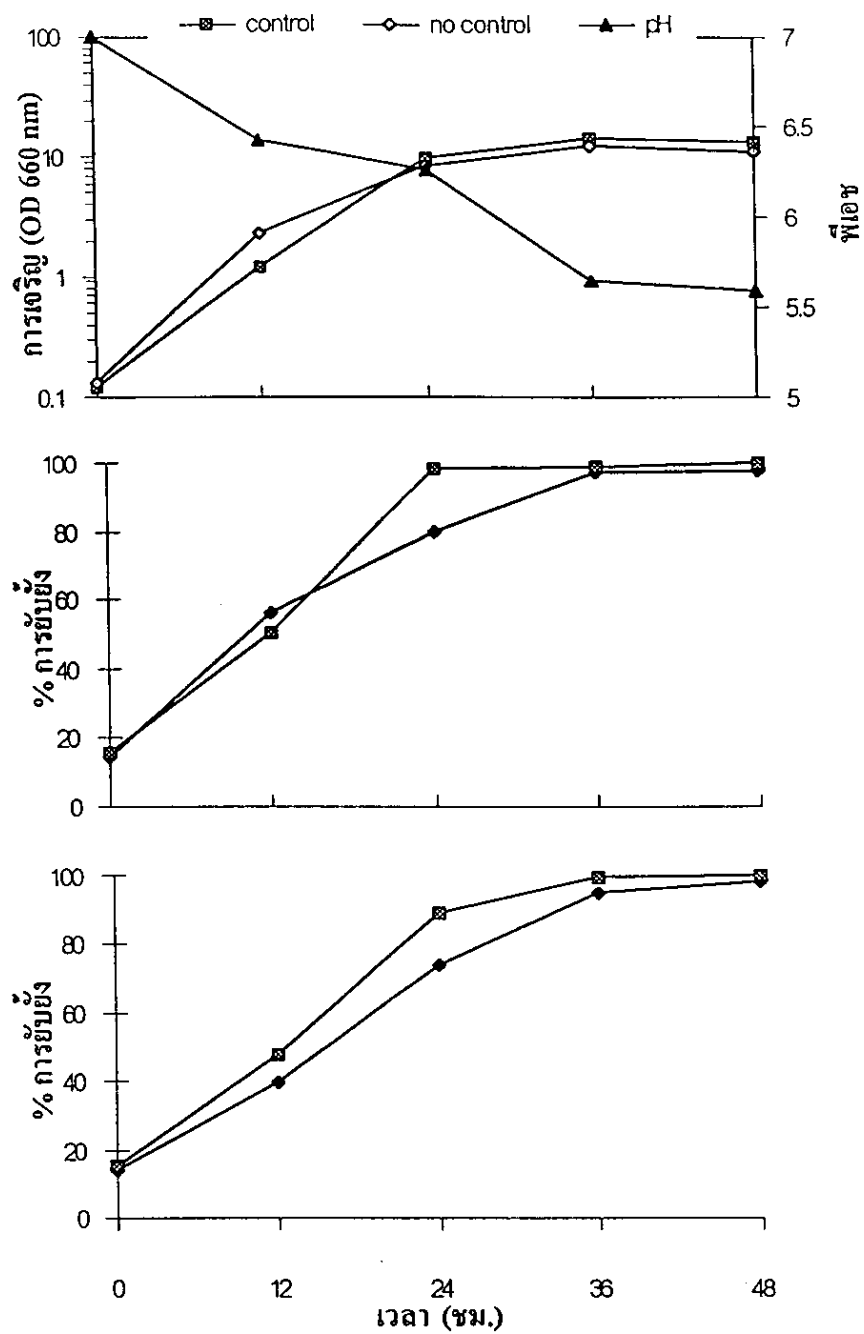
เปรียบเทียบผลการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตได้ จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 30) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 31) เมื่อมีการควบคุมและไม่ควบคุมฟิเอชเริ่มต้น โดยใช้อาหารที่มีฟิเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1.0 VVM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อไม่มีการควบคุมฟิเอช เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีรวมทั้งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราได้ดีกว่าเมื่อควบคุมฟิเอชและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (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 ส่วนฟิเอชจะลดลงเล็กน้อย ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในถังหมักจึงไม่มีการควบคุมฟิเอช ซึ่งตรงกันข้ามกับการทดลองของ Suphantharika และคณะ (1994) ที่ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะพวก Difficidin และอนุพันธ์คือ Oxydifficidin จากเชื้อ *B. subtilis* ATCC 39374 ในถังหมัก พบว่า Difficidin และอนุพันธ์คือ Oxydifficidin เป็นสารที่ไม่มีความคงตัวในสถานะเป็นค่าที่ฟิเอช 6.8 มีอัตราการสูญเสียร้อยละ 10 ภายในเวลา 8-10 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการควบคุมฟิเอช และ Dissolved Oxygen Tension (DOT) ในถังหมักฟิเอชจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 6.8 ถึง 8.8 ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมฟิเอชให้คงที่ที่ 6.8 ในการเลี้ยงเชื้อจะใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.33 VVM

2. ผลของอัตราการกวน

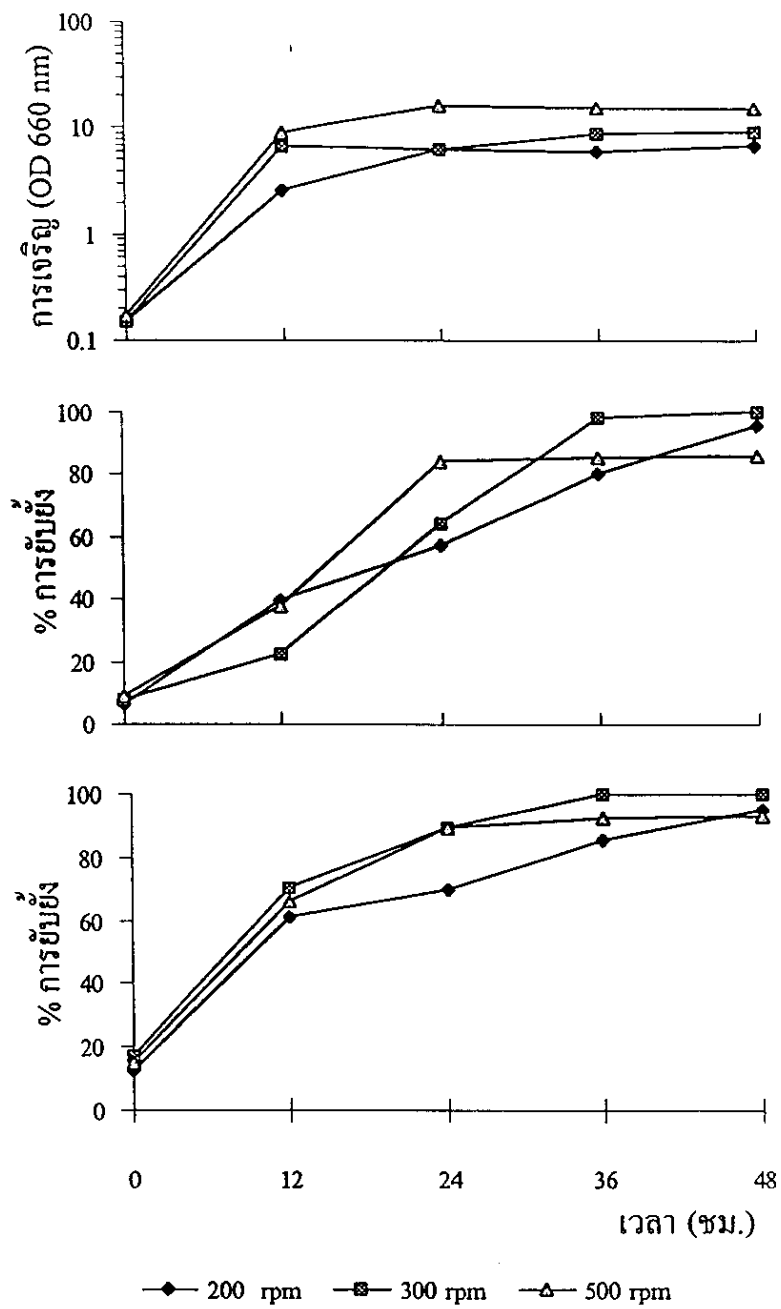
การเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนที่ 200 300 และ 500 รอบต่อนาที โดยควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 VVM และไม่มีการควบคุมฟิเอชเริ่มต้น พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดี และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (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 และส่วนสารที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 33) สามารถยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 100.0 และ 98.8 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนฟิเอชลดลงเล็กน้อย จะเห็นว่าการใช้อัตราการกวนที่มากหรือน้อยเกินไปจะมีผลให้การผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราลดลงได้



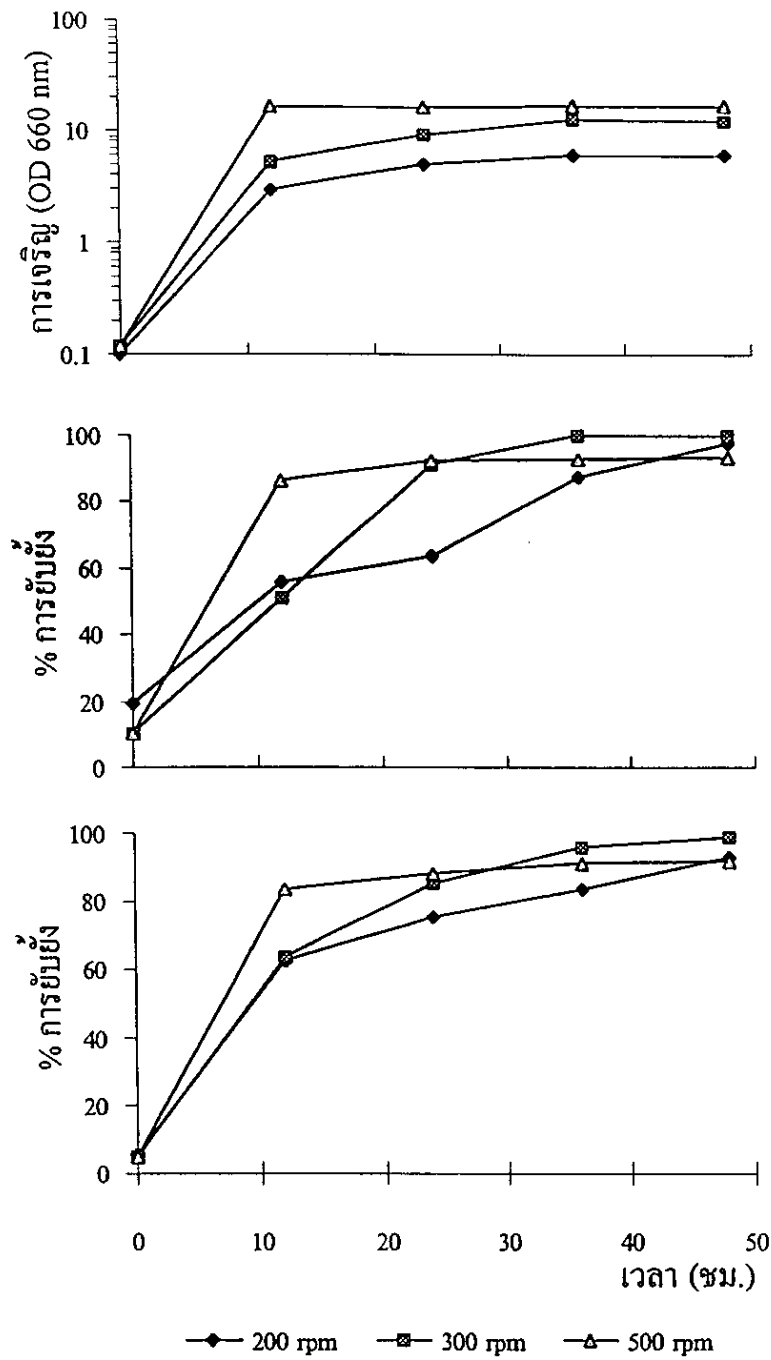
ภาพที่ 30 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 31 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



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



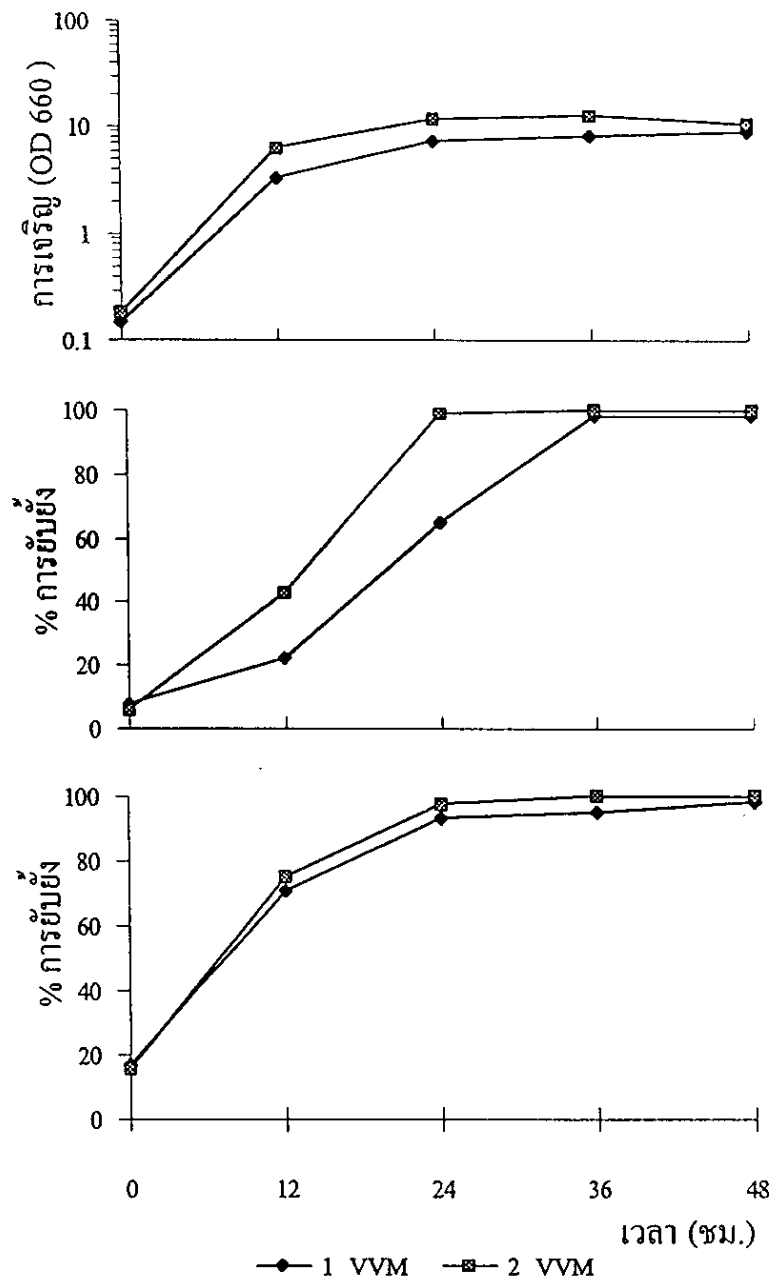
ภาพที่ 33 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา
ของ *Bacillus* sp. LN 007

3. ผลของอัตราการให้อากาศ

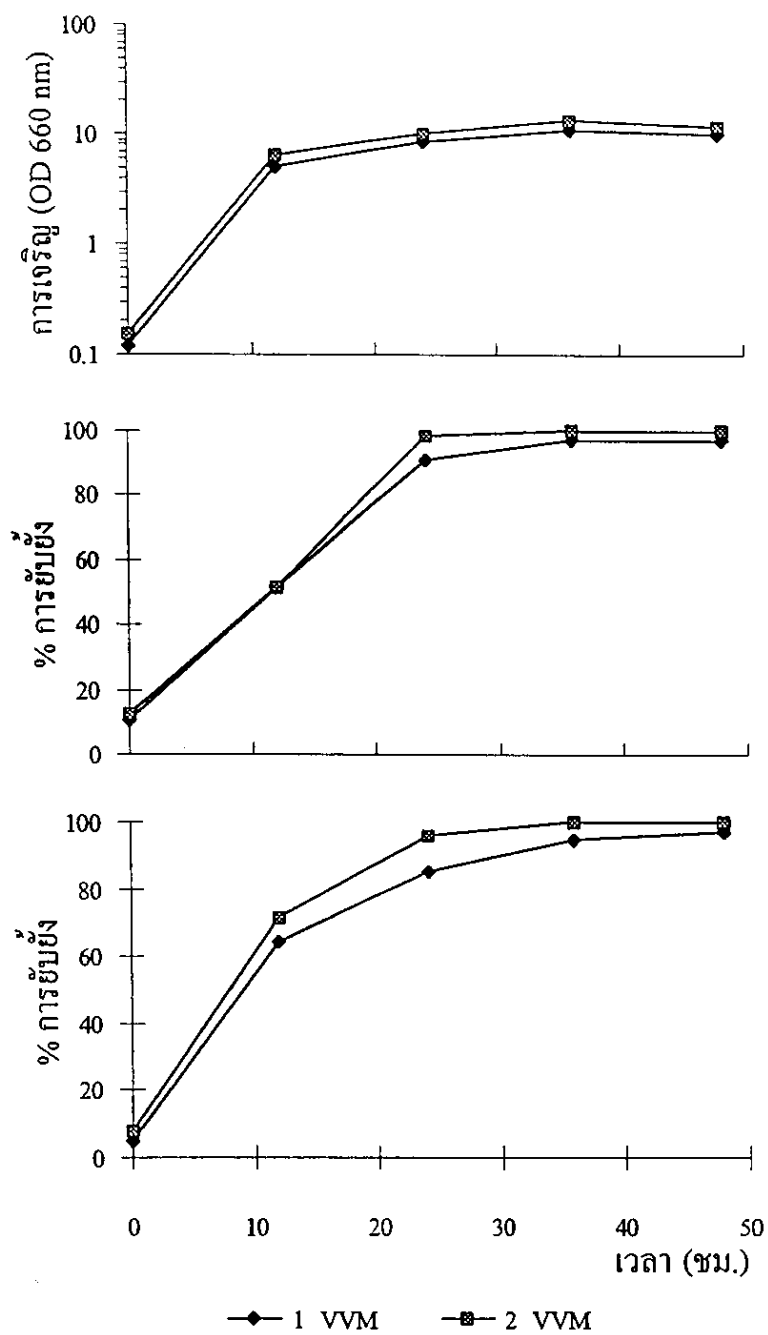
การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในถังหมักที่มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอช เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบอัตราการให้อากาศระหว่าง 1 และ 2 VVM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการให้อากาศ 2 VVM เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราได้ดี 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

ดังนั้นการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 VVM โดยไม่มีการควบคุมพีเอช เป็นสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

สุชาดา อุชัยสิทธิ์ (2535) ผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* B31 พบว่าสถานะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ 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 พบว่าสถานะที่เหมาะสมในการผลิต Surfactin คือ อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียสใช้อัตราการกวน 140 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.75 VVM



ภาพที่ 34 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* NSRS 89-24

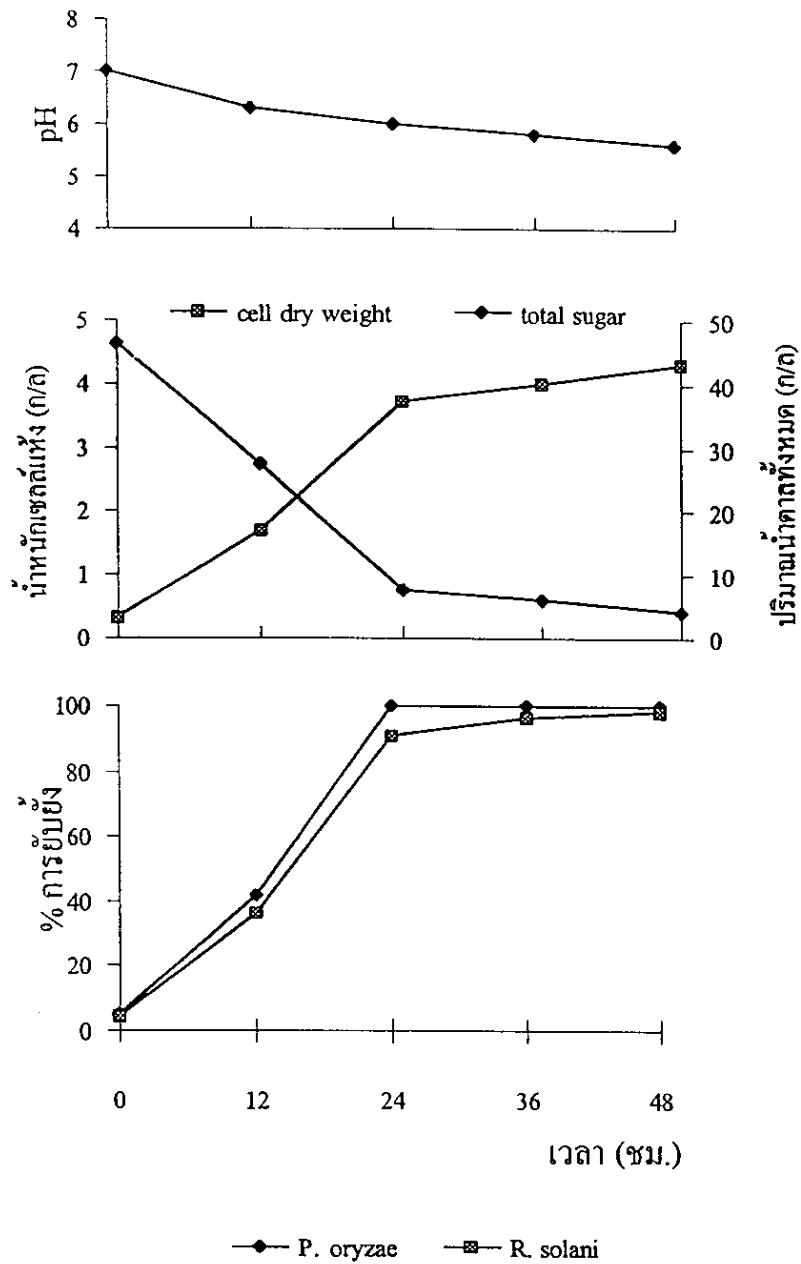


ภาพที่ 35 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. LN 007

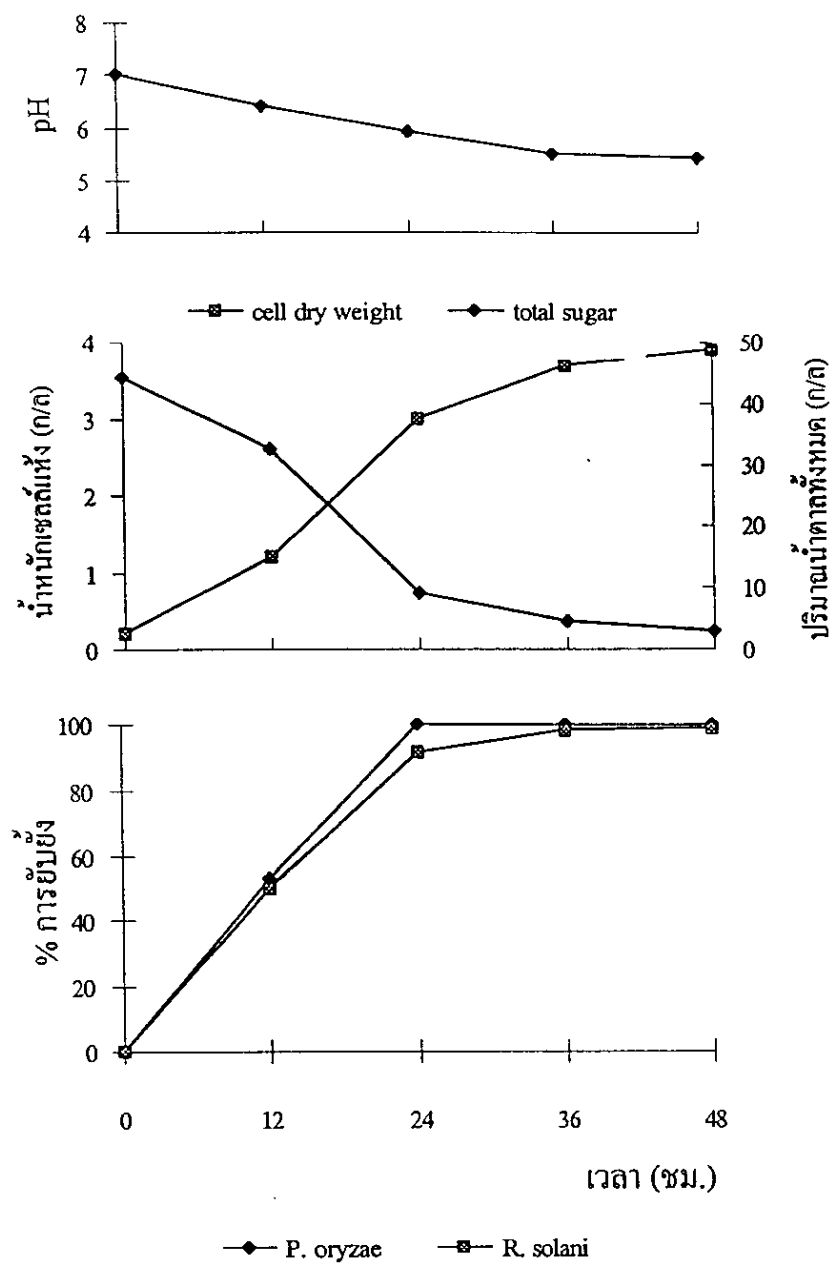
4. จลนพลศาสตร์ของการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ *Bacillus* สองสายพันธุ์

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, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10.0 ก/ล, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.02 ก/ล, K_2HPO_4 1.0 ก/ล, KCl 0.5 ก/ล, และ trace elements 1.0 มล/ล ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16 กรัม, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล) และมีสภาวะที่เหมาะสมจากการเลี้ยงเชื้อในฟลาสกบนเครื่องเขย่า (อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, เลี้ยงเชื่อนาน 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 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวบนเครื่องเขย่า สำหรับสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตจากเชื้อ *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 และการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง



ภาพที่ 37 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง ฟีเอช และการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007 ระหว่างการเจริญในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง

5. การผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราจาก *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 35⁰ซ 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 solani* ได้ 94.12 % และยับยั้ง *Pyricularia grisea* ได้ 88.66 % เมื่อใช้น้ำหมักของเชื้ออายุ 36 ชั่วโมงขึ้นไป (ภาพที่ 38 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ *Bacillus* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในอาหารที่มีโมลาส 5 % และแอมโมเนียมซัลเฟต 1%)

การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในการผลิตอัสยอุตสาหกรรม สามารถใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยที่ไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุอย่างอื่นอีก 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 โดยที่มีย่านตาลเหลืออยู่ 35 กรัมต่อลิตร สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบว่ายับยั้งได้ 60-63 % เมื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

- ดวงพร คันทิชโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์ โอเคียนสโตร. กรุงเทพมหานคร.
- ธีรโชติ มณีโชติ. 2537. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของหัวเชื้อ *Bacillus subtilis*. ปัญหาพิเศษ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประไพศรี สมใจ. 2538. การผลิตสารชีวภาพมีฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคพืชจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร.
- สมใจ เอี่ยมพรรณ์. 2531. ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่แยกได้และผลของสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพมหานคร.
- สายสนม เอนกผลิน. 2535. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุชล แก้วพรหม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุชาดา กุชัยสิทธิ์. 2535. การผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Bacillus subtilis*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรณ์. 2532 ก. การผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในอาหารสัตว์และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นโรคในสัตว์เศรษฐกิจ : การควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยสารอาหารคาร์บอน. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 22 (1) : 1-18.
- อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรณ์. 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.
- 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.
- Brana, A.F., Wolfe, S. and Demain, A.L. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 31 : 736-743.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. Microbiol. 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.
- 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.
- 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.
- 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. 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 fermentant. *J. Ferment. Bioeng.* 80 : 517-519.
- Okamura, K., Kaki, A., Mutoh, Y., Snimauchi, Y. and Ishikura, T. 1977. Fermentative production of deltamycin and deacyltamycin. *J. Ferment. Technol.* 55: 347-355.
- 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. 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. Coproductionh 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.

รายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัย ABS

การผลิตเชื้อ *Bacillus* และการเตรียมสูตรสำเร็จ

1. การผลิตเชื้อ *Bacillus*

1.1 *Bacillus* NSRS -89-24

1.1.1 การเจริญในระดับขวดเขย่า ได้เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร Molasses 5% + (NH₄)₂HPO₄ 1% โดยเติมและไม่เติมแร่ธาตุตามสูตร McKeen ผลการทดลองดังแสดง

ในรูปที่ 1 *Bacillus* NSRS -89-24 สามารถเจริญในอาหารทั้ง 2 ชนิดได้ดี โดยการเจริญในอาหารที่ไม่เติมแร่ธาตุจะดีกว่าเมื่อเติมแร่ธาตุเล็กน้อยมี OD₆₆₀ สูงสุดเป็น 7.47 เมื่อเลี้ยงได้ 36 ชม.

สำหรับการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวพบว่าเมื่อ *Bacillus* NSRS -89-24 เจริญได้ 36 ชม. ในอาหารที่มีแร่ธาตุจะยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้ 81.30 % แต่อาหารที่ไม่เติมแร่ธาตุยับยั้งได้ 70.78 % และให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Pyricularia grisea* ได้ เท่ากันเป็น 100 %

1.1.2 การเจริญในถังหมักขนาด 30 ลิตรได้ทดลองเลี้ยง *Bacillus* NSRS -89-24 ให้มีปริมาตร 10 ลิตรในอาหาร ที่มี Molasses 5 % และมี (NH₄)₂SO₄ 1.0 % ให้อากาศ 1 VVM ที่อุณหภูมิ 35 °C ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่า *Bacillus* NSRS 89-24 เจริญได้สูงสุดที่ 36 ชม. โดยมีค่า OD₆₆₀ เป็น 9.50 และสามารถยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้ 94.12% และยับยั้ง *Pyricularia grisea* ได้ 88.66%

1.1.3 การเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตรใช้สูตรอาหารที่มี Molasses 10 % และสภาวะเริ่มต้นในการเลี้ยง ตาม 1.1.2 ผลการทดลองดังรูปที่ 3 พบว่าการเจริญสูงสุดมี OD₆₆₀ เป็น 9.81 ที่เวลา 24 ชม. เมื่อตรวจเช็คการปนเปื้อนพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 48 ชม. ก็มีการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียอื่น อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำหมักที่มีอายุ 24 ชม. มาทดสอบการยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้ 63 % และน้ำหมักที่มีอายุ 48 ชม. ยับยั้งได้ 60 %

1.2 *Bacillus* MK 007

1.2.1 การเจริญในระดับขวดเขย่าผลการเลี้ยง *Bacillus* MK 007 ในอาหารที่มี molasses 2% และ soy bean meal

Soy bean meal(%)	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0
Count at 24 h (CFU/ml) X(10 ⁹)	2.60	2.88	4.47	1.10	1.36

1.2.2 การเจริญในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อาหารที่มี molasses และ ammonium dihydrogen phosphate 0.1 % และแร่ธาตุตามสูตรอาหาร Mckeen ได้ผลการทดลองดังนี้

%total sugar	1%	2%	3%
Count at maximum growth($\times 10^9$)	2.6(34h)		3.32(32h)
	4.05(15h)		
Specific growth rate	0.842	0.988	0.804

1.2.3 การเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตร ใช้สูตร Molasses 3 % และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1% และแร่ธาตุอาหารตามสูตร Mckeen ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 ให้อากาศชั้นแรก 1 VVM อุณหภูมิ 35 °C ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 พบว่ามีการเจริญสูงสุดที่ 12 ชม. โดยมี OD_{600} เป็น 4.62 เมื่อตรวจเช็คการปนเปื้อนพบว่าการปนเปื้อนเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 48 ชม.เช่นกัน เมื่อนำน้ำหมักมาทดสอบการยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้สูงสุดเป็น 56 % (ที่ 18 ชม.)

2.การเตรียมสูตรเชื้อ

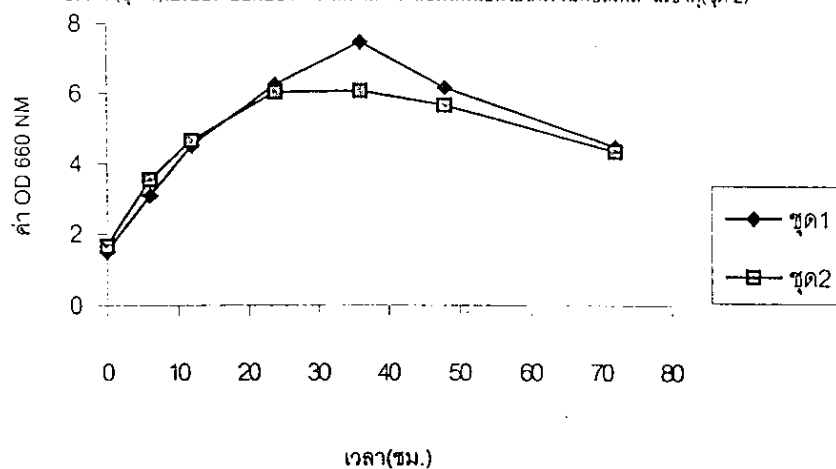
2.1 สูตรแห้งและสูตรน้ำ

ได้ทดสอบสูตรแห้งที่เตรียมโดยมี CMC 5% และ 10% (ของอาจารย์ขวัญจิต 1 และ 2) ในการเกาะติดใบเปรียบเทียบกับสูตรน้ำ (CMC 1%) โดยตรวจหาเชื้อที่เวลา 30 นาทีและ 7 วันหลังการฉีดต้นข้าวผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าในสูตรแห้งความสามารถในการเกาะติดไม่แตกต่างกัน แต่ในสูตรน้ำที่มีการเติม CMC 5% มีการเกาะติดใบดีกว่าเมื่อใช้ CMC 1 %

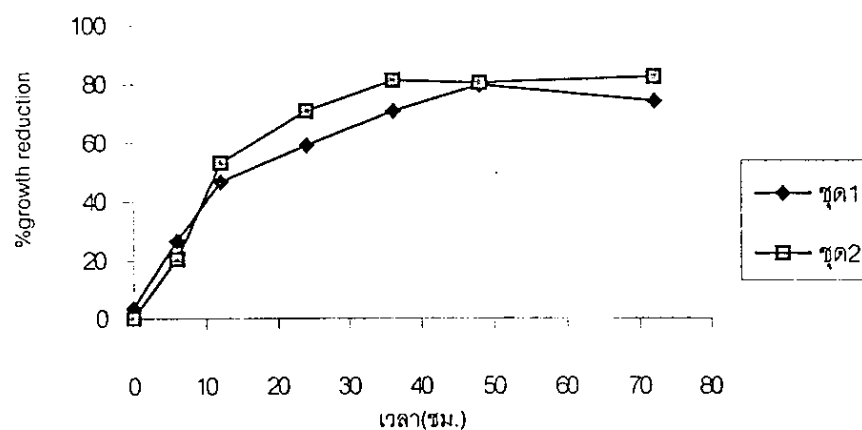
2.2 การเจริญของเชื้อจากสูตรแห้งและสูตรน้ำ

ได้ทดลองใช้สูตรแห้งและสูตรน้ำเจือจางโดยใช้ 1 กรัม หรือ 1 มล.ผสมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มล.แล้วจุด 0.1 มล.ใส่ในหลอดอาหารที่มี ซูโครส 2.0 % และ yeast extract 0.1 % ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 เชื้อจากสูตรแห้งมีการเจริญต่ำกว่าสูตรน้ำน่าจะมีผลมาจาก CMC โดย สูตรขวัญจิต 1 มี CMC 5 % ขวัญจิต 2 มี CMC 10 % ในขณะที่สูตรน้ำ 1 และ 2 มี CMC เพียง 1%

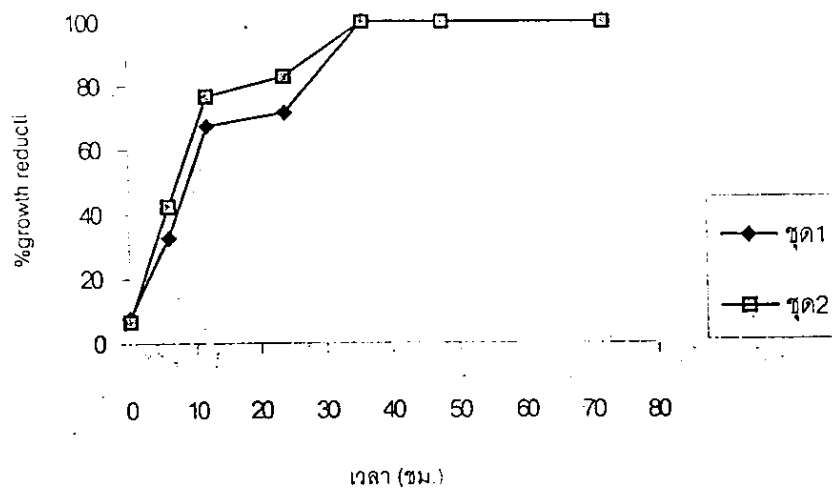
รูปที่ 1.1 การเจริญของเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 ในอาหาร ไมลาล-ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจน
ฟอสเฟต(ชุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร ไมลาล+ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต+แร่ธาตุ(ชุด 2)

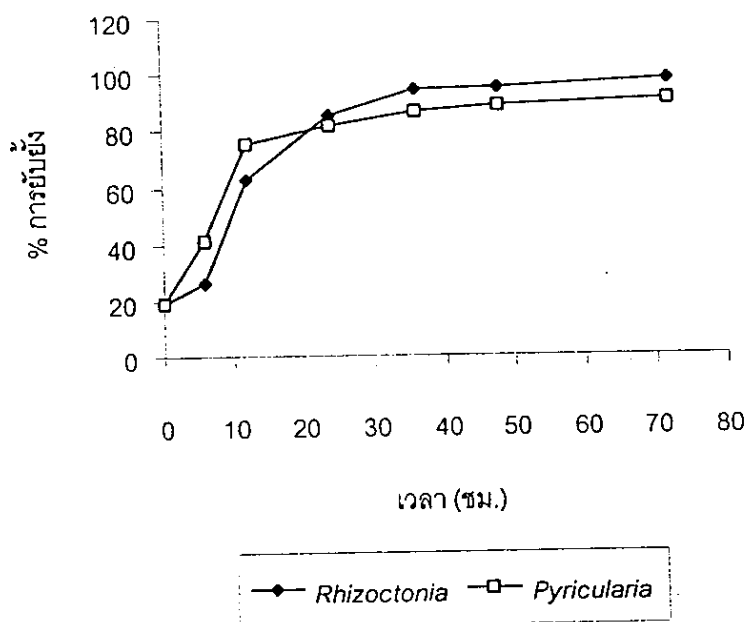
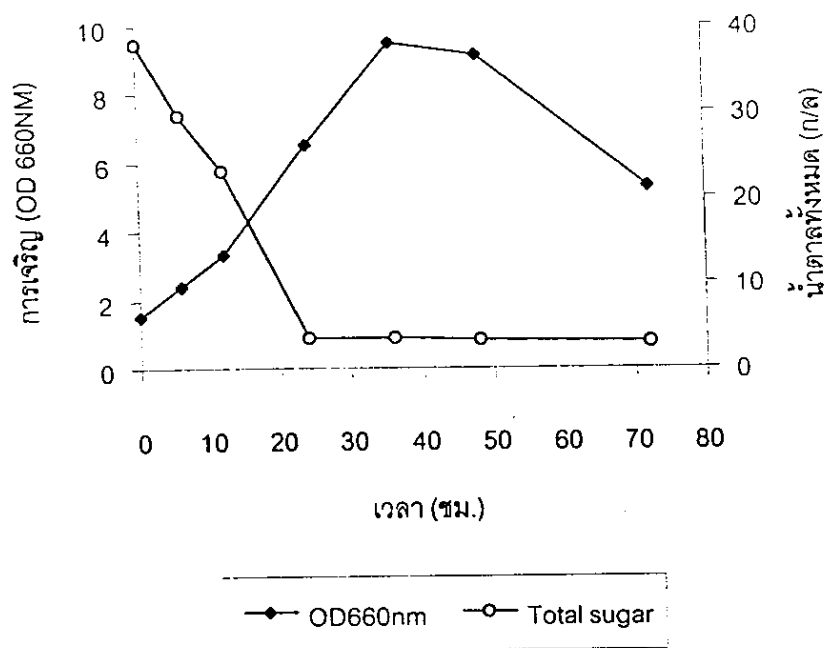


รูปที่ 1.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในอาหาร ไมลาล+ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(ชุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร ไมลาล+ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต+แร่ธาตุ(ชุด 2) ของเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24

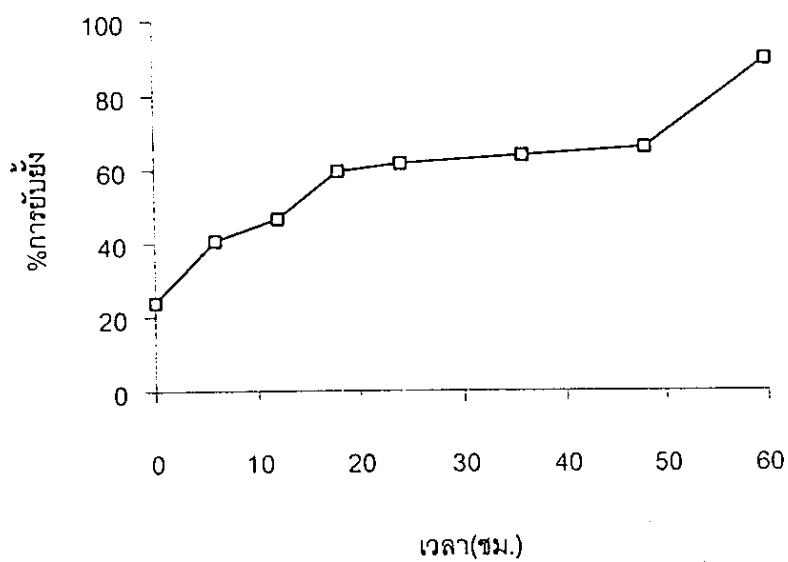
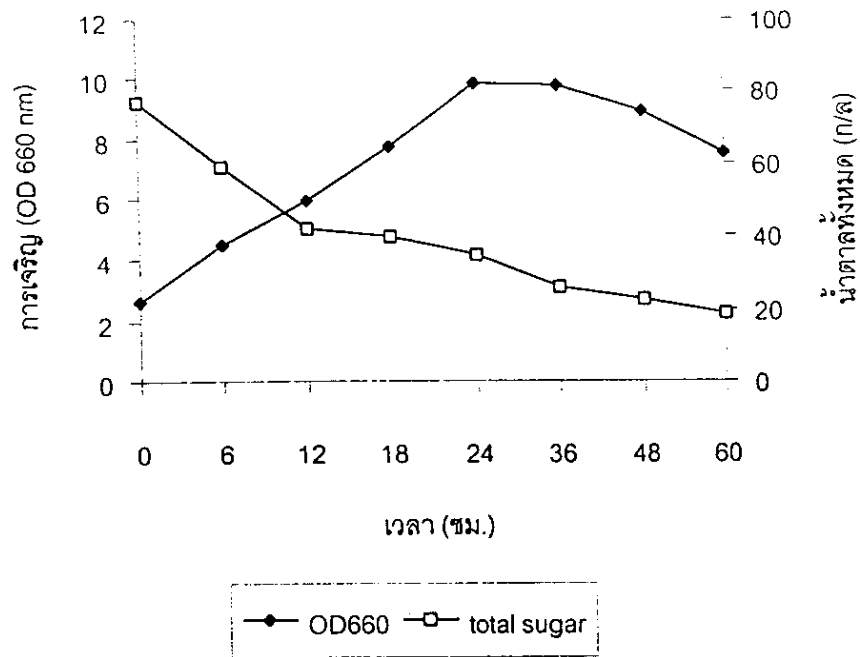


รูปที่ 1.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในอาหาร โผลาส+โดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(ชุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร โผลาส+โดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต+แร่ธาตุ(ชุด 2) ของเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24

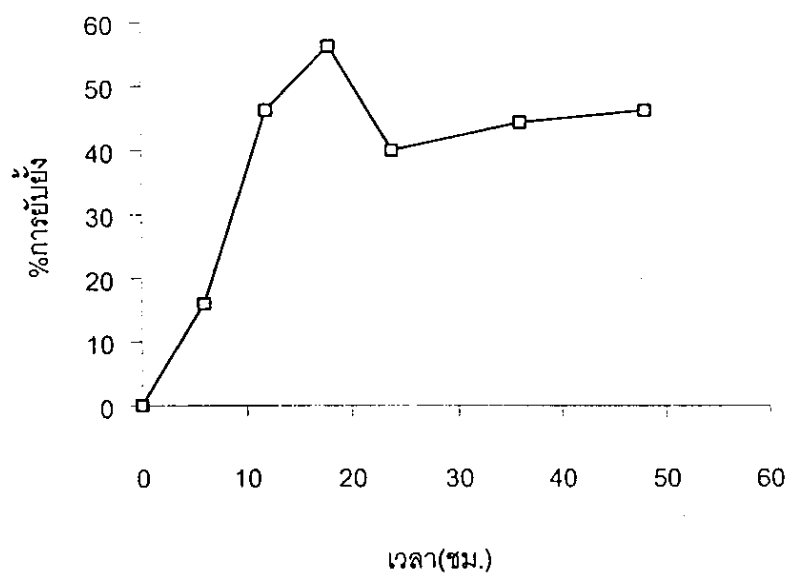
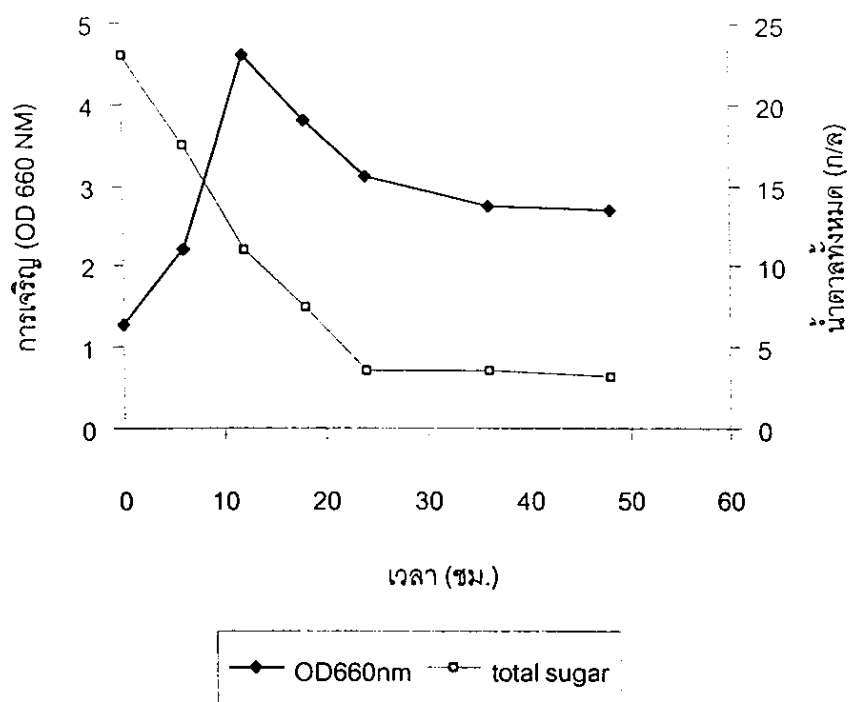




ภาพที่ 38 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด การเจริญและการสร้างสปอร์ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในถังหมักขนาด 10 ลิตร (อาหารประกอบด้วยโมลาส 5% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1%)



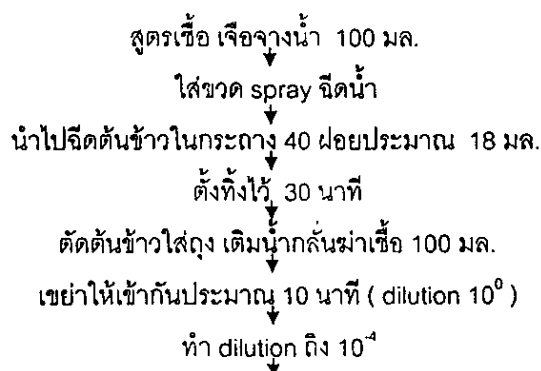
ภาพที่ 39 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด การเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตร (อาหารประกอบด้วยโมลาส 10% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1%)



ภาพที่ 40 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด การเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา ของ *Bacillus MK007* ระหว่างการเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตร (อาหารประกอบด้วยโมลาส 3% และ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10% และแร่ธาตุตามสูตรอาหาร Mckeen)

วิธีการทดสอบฉีดต้นข้าว 17/1/41

- สูตร 1. Bacillus (ขวัญจิต 1) ซึ่ง 1 กรัมละลายน้ำ 100 มล.
 สูตร 2. Bacillus (ขวัญจิต 2) ซึ่ง 1 กรัมละลายน้ำ 100 มล.
 สูตร 3. เชลล์เปียก Bacillus MK007 + น้ำกลั่น - CMC 1% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.
 สูตร 4. เชลล์เปียก Bacillus MK007 + culture broth + CMC 1% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.
 สูตร 5. เชลล์เปียก Bacillus MK007 + น้ำกลั่น - CMC 5% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.
 สูตร 6. Bacillus MK 007 (ขวัญจิต 1) ซึ่ง 0.4 กรัมละลายน้ำ 100 มล.
 สูตร 7. ชุดควบคุมไม่ฉีดเชื้อ



และนับเชื้อจากสูตรโดยตรง(เป็นตัว control) หลังจากนั้นหาน้ำหนักแห้งของต้นข้าว แล้วคำนวณหาเชื้อที่ติดต้นข้าว

ตารางที่ 1 ผลการนับเชื้อจากการฉีดต้นข้าวเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที และ 7 วัน (17/1/41)

สูตร	เชื้อก่อนการฉีดพ่น (CFU / ml)	หลังฉีด 30 นาที CFU/g	หลังฉีด 7 วัน CFU /g
1 (ขวัญจิต 1)	4×10^7	2.6×10^7	4.3×10^5
2 (ขวัญจิต 2)	3×10^7	2.0×10^7	9.3×10^5
3 สูตรน้ำกลั่น	2×10^7	8.0×10^6	2.3×10^5
4 สูตร culture broth	2×10^7	1.4×10^7	3.2×10^5
5 สูตรน้ำกลั่น CMC 5%	1×10^7	1.7×10^7	4.6×10^5
6 (ขวัญจิต 1) 0.4 กรัม	1.4×10^7	1.2×10^7	2.5×10^5
7 ไม่ฉีดเชื้อ		ไม่พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ

16/1/41

การเจริญของสูตรเชื้อในอาหาร Yeast extract 0.1%+ Sucrose 2.0 %

1. สูตรแห้งขวัญจิต 1
2. สูตรแห้งขวัญจิต 2
3. สูตรน้ำ 1 Bacillus MK007
4. สูตรน้ำ 2 (รวม culture broth) Bacillus MK 007

เชื้อจากสูตร 1 กรัม หรือ 1 มล.ต่อน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มล.แล้วเติมมา 0.1 มล.ใส่อาหาร 10 มล.

ตารางที่ 2 การเจริญของ *Bacillus* MK 007 จากสูตรต่าง ๆ ในอาหาร Yeast extract 0.1 % + Sucrose 2.0 %

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชม.)	ค่า OD ₆₅₀			
	ขั้วญาติ 1	ขั้วญาติ 2	สูตรน้ำ 1	สูตรน้ำ 2
0	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0.80	0.70	0.90	0.95
48	0.60	0.60	1.00	1.10
72	0.60	0.55	1.10	1.30
96	0.60	0.55	1.70	1.70

การวัด MIC ของสูตรน้ำ 1 (96 ชม.) $1/100 = 38.46\%$

ของสูตรน้ำ 2 (96 ชม.) $1/100 = 51.28\%$

รายงานความก้าวหน้าการผลิตเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 และ *Bacillus* MK 007

1. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในถังหมัก 100 ลิตร ที่มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ซึ่งได้รายงานในการประชุมคราวที่แล้วแต่ไม่ได้เสนอข้อมูล จึงนำมาเสนอในครั้งนี้ (ตารางที่ 1 และ 2)
2. การผลิต *Bacillus* NSRS 89-24 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร (working volume 20 ลิตร) เพื่อเตรียมเชื้อสำหรับการทดลองในแปลงนาใหญ่ ผลการทดลองดังตารางที่ 3 และรูปที่ 1.1 และ 1.2 มีน้ำหนักเซลล์เปียกประมาณ 189 กรัม/20 ลิตร

เซลล์เปียก 1 กรัมมีเชื้อ 7.4×10^{10} CFU (หลังให้ความร้อน)

ดังนั้นในการหมัก 1 ครั้งได้เชื้อ ประมาณ $189 \times 7.4 \times 10^{10} = 1.4 \times 10^{13}$ CFU

ข้อมูลจากคุณสมบัติของเชื้อ สำหรับการทดลองแปลงนา 2 ไร่ เมื่อฉีดพ่น 3 ครั้งจะใช้สูตรเชื้อ 720 ลิตร ต่อสูตร หากฉีดพ่นเชื้อ ประมาณ 10^7 CFU/มล.จะต้องใช้เชื้อทั้งหมด $720 \times 1000 \times 10^7 = 7.2 \times 10^{12}$ CFU/สูตร แสดงว่าการเตรียมสูตรเชื้อในถังหมัก 20 ลิตร ก็เพียงพอแล้วแสดงว่าการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก 1 ครั้งก็เพียงพอต่อการเตรียมเชื้อ 1 สูตร จะทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 สำหรับใช้ทั้งในสูตรแห้งและสูตรน้ำ สำหรับการทดลองในแปลงนา 3 ครั้ง (ต้องทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักอย่างน้อย 6 ครั้ง)

3. การผลิต *Bacillus* MK 007 ทางหัวหน้าโครงการได้ไปติดต่อกับ KMIT เพื่อขอใช้ถังหมัก 1000 ลิตร เพื่อผลิตเชื้อ *Bacillus* MK 007 แต่ผลการทดลองคือเชื้อไม่เจริญและได้ให้ทางผมทดสอบว่าจะมีผลมาจากโหมลาที่ใช้และน้ำมันพืชหรือไม่ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 สรุปได้ว่าโหมลาและน้ำมันพืชที่ใช้ทดลองไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* MK007

จากข้อมูลที่ได้รับเกี่ยวกับการใช้ถังหมัก 1000 ลิตร ใช้โหมลา มี

reducing sugar	20 กรัม/ลิตร
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 กรัม/ลิตร
เติมน้ำมันพืช	1 ลิตร
ความเร็วรอบในการกวน	250 rpm
การให้อากาศ	1.5 VVM

สันนิษฐานว่าเนื่องเป็นการเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ ปัจจัยจำกัดการเจริญน่าจะมาจากการให้อากาศ และการกวนเนื่องจากเป็นถังหมักขนาดใหญ่เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ log phase dissolved oxygen คงจะหมดไป หรือไม่เช่นนั้นน่าจะเนื่องมาจากสภาวะที่เป็นกรดมากทำให้เชื้อเกิดการช็อคจึงไม่เจริญ

4. การผลิต *Bacillus* MK007 20 ลิตร working volume ผลดังแสดงในตารางที่ 5

5. แผนงานอนาคต

ทางมหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายายินดีให้ใช้ถังหมักขนาด 100 ลิตรฟรี 1 ครั้งคาดว่าจะไปทำการทดลองได้ในเดือนมิถุนายน โดยจะทดลองกับเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 หากงบประมาณยังมีอยู่ก็จะทดลองกับ *Bacillus* MK 007 อีก 1 ครั้ง เพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตในถังหมักขนาด 100 ลิตร

23/2/41 - 3/3/41

1. การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 ในถังหมัก 100 ลิตร (90 ลิตร working volume)

ที่ ม.มหิดล ศาลายา

1. เตรียม starter NB 7 ลิตร ในถังหมัก 10 ลิตร

2. สูตรอาหารใช้

โมลาส 10 %

แอมโมเนียมซัลเฟต 1 %

3. สภาพที่เลี้ยง

ขณะเริ่มต้นให้อากาศ 1 VVM และความเร็ว 200 รอบ/นาที

อุณหภูมิ 35 °C

พีเอช 7

ควบคุม DO > 50 % สามารถทำได้

- โดยการเพิ่มความเร็วในการกวน ควรเพิ่มครั้ง 100 รอบ/นาที

- โดยการเพิ่มอากาศ

การป้องกันการเกิดฟอง

- โดยการเติม antifoam A 10% พร้อมอาหารในสูตร ตอนเริ่มต้น 10 มล.

- การฉีด antifoam ต้องปรับลดความดันให้เหลือประมาณ 0.1 bar โดยใช้กระบอก

ฉีดสเตอไรด์ (ใช้แล้วทิ้ง)

ตารางที่ 1. ผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 ในถังหมัก 100 ลิตร ที่ ม.มหิดล ศาลายา

เวลาเก็บ ดย. (ชม.)	พีเอช	OD 660 NM	DO	total sugar g/l	% growth reduction
0	6.64	2.63	125.7	77	23.73
6	5.89	4.47	71.9	59	40.0
12	5.88	5.92	49.2	41.5	46.35
18	4.95	7.70	0	39.5	61.59
24	4.67	9.81	0	34.5	63.3
36	5.17	9.77	0	26	65.0
48	5.10	8.90	0	22.5	66.66

ผลการ streak เชื้อบนอาหาร PDA ของ starter 10 ลิตรจนถึงการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เวลา 0 - 24 ชม. พบว่ามีเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 เจริญเพียงอย่างเดียวแต่ที่เวลา 48 ชม. มีเชื้อปนเปื้อนและไม่พบ B-24 และเมื่อนำตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. ไปผ่านความร้อนที่ 80°C นาน 30 นาทีพบว่าไม่มีเชื้อเจริญ เช่นเดียวกัน ลักษณะโคโลนีของเชื้อปนเปื้อน รูปร่างกลม สีครีมขุ่น มีเมือกเหนียว กลิ่นเปรี้ยว

และเมื่อนำเชื้อปนเปื้อนไปเลี้ยงในอาหาร NB 24 ชม. แล้วผ่านความร้อนที่ 60, 70, 80 และ 90°ซ นาน 20 นาทีพบว่าไม่มีเชื้อเจริญ

เนื่องจากตรวจไม่พบเชื้อปนเปื้อนที่เวลา 0 และ 24 ชม. ของการเพาะเลี้ยงแสดงว่ามีการปนเปื้อนในระหว่างการหมักคาดว่าน่าจะมาจากอากาศเข้าถึง

2. การเลี้ยง *Bacillus* MK 007 ในถังหมัก 100 ลิตร (Working volume) ที่ ม.มหิดล ศาลายา

1. ลง starter NB 5 ลิตร เลี้ยง 16 ชม.

2. ใช้สูตร จากของอาจารย์เพ็ญแข สูตร/100ลิตร

โมลลัส 3	%	
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	100.82	กรัม
KH_2PO_4	100	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50	กรัม
KCl	100	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.04	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.16	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.12	กรัม

3. สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับ *Bacillus* NSRS 89-24

ตารางที่ 2. ผลการเลี้ยง *Bacillus* MK 007 ในถังหมัก 100 ลิตร ที่ ม.มหิดล ศาลายา

เวลาเก็บ คย. (ชม.)	พีเอช	OD 660	DO	total sugar g/l	% growth reduction
0	6.90	1.28	111.5	23	0
6	6.31	2.21	60.9	17.5	15.87
12	6.02	4.62	71.4	11.0	46.35
18	5.68	3.80	0	7.5	56.19
24	6.14	3.11	0	3.6	40.0
36	6.30	2.75	0	3.5	44.28
48	6.48	2.70	0	3.2	46.34

ผลการ streak เชื้อบนอาหาร PDA ของ starter 10 ลิตรจนถึงการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เวลา 0 - 24 ชม. พบว่ามีเฉพาะเชื้อ *Bacillus* MK007 เจริญเพียงอย่างเดียวแต่ที่เวลา 48 ชม. มีเชื้อปนเปื้อนและพบ MK007 ด้วย และเมื่อนำตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. ไปผ่านความร้อนที่ 80°ซ นาน 30 นาที พบว่า MK 007 เจริญอย่างเดียว ลักษณะโคโลนีของเชื้อปนเปื้อน รูปร่างกลม สีขาวใส และเมื่อนำเชื้อปนเปื้อนไปเลี้ยงในอาหาร NB 24ชม. แล้วผ่านความร้อนที่ 60, 70, 80 และ 90°ซ นาน 20 นาที พบว่าไม่มีเชื้อเจริญ

16/4/41

3. การเลี้ยง Bacillus NSRS 89-24 ในถังหมัก 20 ลิตร (working volume)

เลี้ยงเชื้อ Bacillus NSRS 89-24 โดยใช้สูตรอาหาร Molasses 5%+(NH₄)₂SO₄ 1% ให้อากาศ 1 VVMความเร็วในการกวน 200 rpm อุณหภูมิ 35^oซ พีเอชเริ่มต้น 7 เลี้ยง 72 ชม.

ตารางที่ 3. ผลการเลี้ยง Bacillus NSRS 89-24 ในถังหมัก 20 ลิตร (working volume)

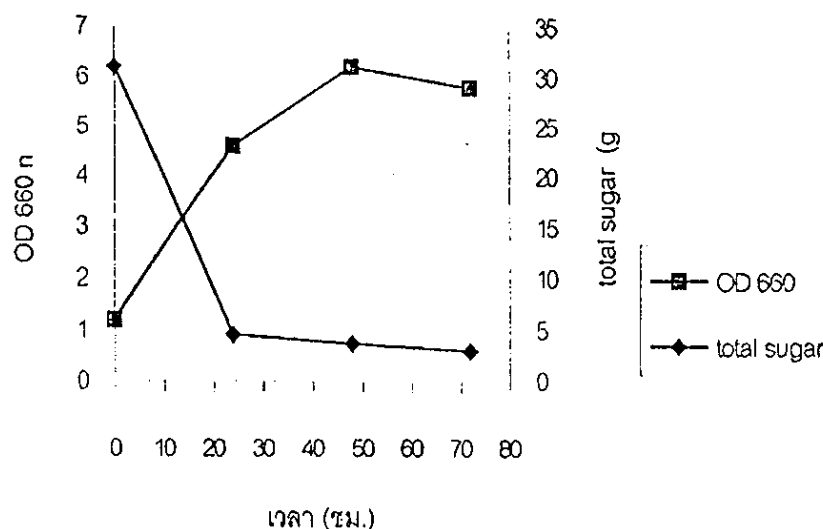
เวลา (ชม.)	OD ₆₆₀	pH	total sugar	เชื้อก่อนให้ ความร้อน	เชื้อหลังให้ ความร้อน	%growth reduction	cell dry weight g/l
0	1.2	7.0	31.0	-	-	13.2	
24	4.6	6.3	4.6	5.0x10 ⁸	3.8x10 ⁶	76.27	
48	6.2	6.0	3.7	7.8x10 ⁸	6.0x10 ⁸	88.12	
72	5.8	5.9	3.0	7.0x10 ⁸	6.3x10 ⁸	94.06	

น้ำหนักเซลล์เปียก 189.83 กรัมต่อ 20 ลิตร

น้ำหนักเซลล์เปียก 1 กรัมมีเชื้ออยู่เท่ากับ 7.4 x10¹⁰ CFU (หลังจากให้ความร้อน)

รูปที่ 1.1 การเจริญของเชื้อ Bacillus NSRS 89-24 ในถังหมัก 20 ลิตร โดยใช้สูตร

Molasses 5%+ แอมโมเนียมซัลเฟต 1% ให้อากาศ 1 VVM pH 7 ความเร็วในการกวน 200

rpm อุณหภูมิ 35^oซ

5/5/41

การเลี้ยง *Bacillus* MK 007 ใน Shaker โดยใช้สูตรอาหาร

1. Molasses 5 % + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% (ใช้โมลาสของอาจารย์วิจิตรา)
2. Molasses 5 % + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% + น้ำมันพืช 1.0%

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลองเลี้ยง *Bacillus* MK007 โดยใช้สูตรอาหาร Molasses 5% + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%

เวลา (ชม.)	พีเอช	OD660	total sugar g/l	เชื้อก่อนให้ ความร้อน CFU/ml	เชื้อหลังให้ ความร้อน CFU/ml	%growth reduction
0	6.99	1.50	32			11.10
24	6.63	7.58	15.5	1.9×10^9	1.6×10^9	79.01
48	6.49	11.37	5.1	6.0×10^9	5.0×10^9	86.96

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดลองเลี้ยง *Bacillus* MK 007 โดยใช้สูตรอาหาร Molasses 5% + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% + น้ำมันพืช 1.0%

เวลา (ชม.)	พีเอช	OD660	total sugar g/l	เชื้อก่อนให้ ความร้อน CFU/ml	เชื้อหลังให้ ความร้อน CFU/ml	%growth reduction
0	7.0	1.71	33			13.79
24	6.64	11.96	17.5	2.2×10^9	2.2×10^9	82.63
48	6.52	15.98	6.1	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}	90.66

ผลการทดลองแสดงว่าปัญหาที่อาจารย์วิจิตราไปใช้ถังหมัก 1000 ลิตรที่ KMIT และเชื้อ *Bacillus* MK 007 ไม่เจริญไม่ได้มีสาเหตุมาจากน้ำตาลโมลาสและการเติมน้ำมันพืชเพื่อเป็นสารกำจัดฟองก็ไม่ได้มีผลยับยั้งการเจริญถึง 10% ก็ไม่ได้มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* MK007

หัวข้อย่อยที่ 7
การศึกษาผลกระทบของสารออกฤทธิ์ต่อมนุษย์

โดย

พญ.สุวิณา รัตนชัยวงศ์* และ ดร.อุไรรัตน์ คงเมือง**

*ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. การศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน (Peripheral blood mononuclear cell = PBMC) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดลอง

ทำการแยก PBMC จากตัวอย่างเลือดที่เจาะใส่หลอด heparin ด้วยสารละลาย isoprep โดยอาศัยหลักของ density gradient centrifugation ที่ 450 g เป็นเวลา 25 นาที ปั่นล้าง PBMC ที่ได้ด้วย phosphate buffer saline (PBS) ที่ 500 g เป็นเวลา 5 นาที X 3 ครั้ง resuspend cell pellet ที่ได้ใน culture medium (RPMI-1640) นับและคำนวณจำนวนเซลล์ที่แยกได้ แล้วปรับปริมาตรของ cell suspension เพื่อให้ได้จำนวน 1×10^6 เซลล์/ml

ทำการเพาะเลี้ยง PBMC ในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุมที่ 37°C ในบรรยากาศของ 5% CO_2 เป็นเวลา 3 หรือ 7 วัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดสารที่ใช้ในการกระตุ้นหรือทดสอบ โดยมีองค์ประกอบของสถานะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงดังนี้

1. จำนวน PBMC 5×10^4 หรือ 1×10^5 เซลล์/หลุม ขึ้นกับปริมาณของจำนวนเซลล์ที่แยกได้
2. 5% human serum (HS)/RPMI-1640 ในหลุมควบคุมหรือ 5% HS/RPMI-1640 บวกกับสารสกัดที่ต้องการทดสอบและหรือสารมีฤทธิ์โมโดเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
3. ปรับปริมาตรรวมของการเพาะเลี้ยงให้ = 200 μl /หลุม โดยทำการเพาะเลี้ยงซ้ำจำนวน 3 หลุม ต่อทุก ๆ สถานะที่ทำการทดสอบ

ผลการทดลอง

1.1 ทดสอบความมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ (Viability test)

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในหลุมควบคุม และหลุมเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เสียชีวิต (ย้อมติดสีน้ำเงินของ Trypan blue) ในทุกๆ 100 เซลล์ แล้วหาค่าเฉลี่ย ได้ผลดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความอยู่รอดของเซลล์ในระหว่างเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัด MK007 และ NSRS89-24 ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 3-7 วัน ที่ 37°C ในบรรยากาศ 5% CO_2

PBMC จากคนปกติ (จำนวน 3 ราย)	ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่เสียชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ						
	RPMI 1640	MK007 ($\mu\text{g/ml}$)			NSRS89-24 ($\mu\text{g/ml}$)		
		10	50	100	10	50	100
หลังเพาะเลี้ยง 3 วัน	5.7%	4.3%	6.0%	6.7%	5.0%	6.3%	6.7%
หลังเพาะเลี้ยง 7 วัน	5.3%	6.0%	5.7%	6.3%	5.7%	7.3%	7.0%

1.2 ทดสอบผลกระทบที่มีต่อการแบ่งตัวของเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารมีฤทธิ์ไมโทเจน (Phytohaemagglutinin = PHA)

นำ PBMC ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในถาด 96 หลุมเช่นเดียวกับ 6.1 โดยมีองค์ประกอบของสถานะต่าง ๆ เพิ่มเติมดังนี้

1. จำนวน PBMC 5×10^4 หรือ 1×10^5 เซลล์/หลุม

2. 5% HS/RPMI-1640 ในหลุมควบคุม

หรือ 5% HS/RPMI-1640 + PHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0.5, 1.0, $\mu\text{g/ml}$)

หรือ 5% HS/RPMI-1640 + สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)

หรือ 5% HS/RPMI-1640 + PHA 1 $\mu\text{g/ml}$ + สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

ทำการเพาะเลี้ยงที่ 37°C ในบรรยากาศ 5% CO_2 เป็นเวลา 3 วัน จึงเติม ^3H -thymidine ให้ได้ความเข้มข้น = 1 $\mu\text{Ci/ml}$ แล้วเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ลงบนแผ่นกระดาษกรองใยแก้วที่ได้เคลือบสาร scintillan ไว้แล้ว นำกระดาษใยแก้วไปอบแห้ง (60°C X 2-3 ชั่วโมง) ก่อนนำไปตรวจวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง β - counter แล้วเปรียบเทียบปริมาณรังสีที่วัดได้จากหลุมที่ทดสอบกับหลุมควบคุม จะได้ค่าบ่งชี้ถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ดังค่าที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

$$\text{Proliferation index (PI)} = \frac{\text{ปริมาณสารรังสีที่วัดได้ในหลุมทดลอง}}{\text{ปริมาณรังสีที่วัดได้ในหลุมควบคุม}}$$

ตารางที่ 2 ความสามารถในการแบ่งตัวของลิ้ม โฟไซค์ (Proliferation index =PI) เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดและสาร โยโตเจนในความเข้มข้นต่าง ๆ

องค์ประกอบของสภาวะต่าง ๆ ที่ทำการเพาะเลี้ยง PBMC. ในทุก ๆ 3 หลุม เป็นเวลา 72 ชม.																
PHA µg/ml	-	0.5	1.0	5.0	-	-	-	1.0	1.0	1.0	-	-	-	1.0	1.0	1.0
MK007-1 µg/ml	-	-	-	-	10	50	100	10	50	100	-	-	-	-	-	-
B24-1 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	50	100	10	50	100
Proliferation index จากค่าเฉลี่ยของปริมาณรังสีที่วัดได้ใน 3 หลุม (3 replicates)																
PBMC1	1.0	7.0	7.6	11.1	2.7	2.3	2.2	20.3	8.2	9.4	7.5	2.4	3.1	16.4	13.8	6.3
PBMC2	1.0	39.6	69.1	133.8	2.4	1.8	1.5	81.6	42.7	19.6	1.6	1.0	0.9	115.4	99.9	91.5
PBMC3	1.0	5.7	9.5	38.0	1.1	0.7	0.5	9.4	117.1	233.3	0.9	0.6	0.6	17.9	11.5	160.6
PBMC4	1.0	183.5	50.7	34.1	2.0	1.2	1.1	93.1	83.3	97.7	2.0	2.3	2.0	ND	ND	ND
PBMC5	1.0	265.8	71.0	60.9	1.2	0.8	0.6	141.4	113.7	85.2	1.1	1.5	1.5	ND	ND	ND

สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาเบื้องต้นในข้อ 1.1 และ 1.2 บ่งชี้ว่า

1. สารสกัด MK007 และ NSRS89-24 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์หากได้รับสัมผัสในความเข้มข้นระหว่าง 10-100 $\mu\text{l/ml}$
2. สารสกัด MK007 และ NSRS89-24 ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน
3. สารสกัด MK007 และ NSRS89-24 ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลยับยั้งการกระตุ้นของสารออกฤทธิ์ไมโทเจน (PHA) ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

2. การศึกษาฤทธิ์ของ crude extract จาก MK007 ต่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่เป็นปกติตามร่างกายของมนุษย์

การทดสอบฤทธิ์ของ crude extract จาก MK007 ต่อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจด้วยวิธี disc diffusion เชื้อที่นำมาใช้ประกอบด้วย *Citrobacter* 10 สายพันธุ์ *E. coli* 16 สายพันธุ์ *Klebsiella* 5 สายพันธุ์ *Morganella* 2 สายพันธุ์ และ *Proteus* 4 สายพันธุ์ เชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ตามปกติที่ลำไส้และออกมากับอุจจาระสำหรับเชื้อที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินหายใจที่พบได้บ่อยและนำมาทดลอง ได้แก่ เชื้อ *Alpha streptococci* 2 สายพันธุ์ *Diphtheroid* 1 สายพันธุ์ *Neisseria* 1 สายพันธุ์ และ *Staphylococci* 12 สายพันธุ์ รวมเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งสิ้น 53 สายพันธุ์

วิธีการทดลอง

เตรียมแผ่นยา (disc) ที่ชุบ crude extract ของ *B. subtilis* ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยนำ crude extract 10 mg มาละลายด้วย 95% ethanol ประมาณ 0.5 ml ให้ละลายดีแล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาณรวม 1 ml (10mg/ml) และเตรียมเจือจาง crude extract ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นำ disc ชนิดที่ไม่มีตัวยา (sterile blank disc ของ Difco) มาจุ่มให้ชุ่มใน crude extract (ประมาณ 20 $\mu\text{l/disc}$) เหล่านี้และเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว (brain heart infusion broth ของ Difco) ประมาณ 2-3 ชั่วโมงในตู้บเลี้ยงเชื้อ 37°C นำมาปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ McFarland 0.5 standard (1.5×10^8 cell/ml) ใช้ไม้ปั่นสำลิจุ่มเชื้อป้ายลงบนอาหารวุ้น (Mueller-Hinton agar ของ Difco) วาง disc ที่จุ่มด้วย crude extract นำมาเลี้ยงในตู้บ 37°C 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรอบๆ disc

ผลการทดลอง

crude extract ที่ความเข้มข้น 500 µg/disc และ 1 mg/disc ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินหายใจที่นำมาทดสอบทั้ง 53 สายพันธุ์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ crude extract เป็น 10 mg/disc มีเพียง 2 สายพันธุ์ (*Staphylococci coagulase negative* 1 สายพันธุ์และ *Alpha streptococci* 1 สายพันธุ์) ที่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตแต่ผลยับยั้งมีเพียงเล็กน้อยคือให้ zone of inhibition วัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้เพียง 12 mm. (เส้นผ่าศูนย์กลางของ disc 6 mm.) รายละเอียดตามตารางที่ 3

สรุปผลการศึกษา

การทดสอบฤทธิ์ของ crude extract จาก MK007 ต่อเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ตามปกติของระบบทางเดินอาหาร และทางเดินหายใจจำนวน 53 สายพันธุ์ พบว่า crude extract นี้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเหล่านี้ หรือมีผลเพียงเล็กน้อยเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงมาก

**Effect of Crude extract of *B. subtilis* to Bacteria encountered in Gastrointestinal tract
and Respiratory tract assayed by disk diffusion method**

Bacteria	Conc. of Crude extract					
	500 µg/disk		1 mg/disk		10 mg/disk	
	Inhibition zone		Inhibition zone		Inhibition zone	
	-	+	-	+	-	+
Normal flora of GI tract						
<i>Citrobacter</i> (10)	10	0	10	0	8	0
<i>E. coli</i> (16)	16	0	16	0	6	0
<i>Klebsiella</i> (5)	5	0	5	0	5	0
<i>Morganella</i> (2)	ND		2	0	2	0
<i>Proteus</i> (4)	ND		4	0	4	0
Normal flora of Respiratory tract						
<i>Alpha streptococci</i> (2)	ND		2	0	1	1*
<i>Diphtheroid</i> (1)	ND		1	0	1	0
<i>Neisseria</i> (1)	ND		1	0	1	0
<i>Staphylococci</i> coagulase negative (12)	ND		12	0	11	1*

* วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ได้ 12 mm.

สรุปการศึกษาด้านผลกระทบของสารออกฤทธิ์ต่อมนุษย์

ทำการศึกษาสารออกฤทธิ์จากเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์คือ B24, B26, และ MK007 ในรูปแบบต่างๆ รวม 3 ลักษณะคือ สารสกัดหยาบ (crude extract) น้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (purified extract) โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนคือ

1. ผลกระทบของสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* culture of Peripheral blood mononuclear cell = PBMC) สรุปผลได้ดังนี้

1.1 สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ B24 และ MK007

ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 µg/ml -ไม่มีผลกระทบต่อความอยู่รอดของ PBMC

-ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของ PBMC

-ไม่มีผลยับยั้งการกระตุ้น PBMC โดยสาร mitogen (Phytohaemagglutinin = PHA)

1.2 สารออกฤทธิ์ที่อยู่ในรูปแบบของน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) นั้นมีสภาพไม่เหมาะสมในการใช้ทดสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ต่อ PBMC

1.3 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (purified extract) แต่ละตัวมีผลแตกต่างกันดังนี้

I-7/2 - ไม่มีผลยับยั้งการกระตุ้น PBMC ด้วย PHA ที่ความเข้มข้น ≤ 40 µg/ml

- แต่มีผลยับยั้งการตอบสนองของ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย tetanus toxin (TT) ที่ความเข้มข้น ≥ 5 µg/ml

IB-007 - ไม่มีผลยับยั้งการกระตุ้น PBMC ด้วย PHA ที่ความเข้มข้น ≤ 40 µg/ml

- แต่มีผลยับยั้งการตอบสนองของ PBMC ต่อ TT ที่ความเข้มข้น ≥ 20 µg/ml

I-4 - มีผลยับยั้งการกระตุ้น PBMC ด้วย PHA และการตอบสนองต่อ TT ที่ความเข้มข้น ≥ 20 µg/ml