

2. ผลกระทบของสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ตามปกติในระบบทางอาหารและทางเดินหายใจ (intestinal and upper respiratory tract flora) ของมนุษย์ (โดยวิธี disk diffusion)

2.1 สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ MK007 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจจำนวน 37 และ 16 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงถึง 10 mg/disk

2.2 สารออกฤทธิ์ที่อยู่ในรูปแบบของน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ B24, B26, และ MK007 ไม่มีผลยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารและทางเดินหายใจจำนวน 31 และ 34 สายพันธุ์ แม้ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เจือจาง

2.3 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (purified extract) I-7/2, IB007, และ I4 ล้วนไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารและทางเดินหายใจจำนวน 21 และ 22 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 160 µg/ml (ของสาร IB007 และ I4) และ 350 µg/ml ของสาร I-7/2

สรุปผลในภาพรวม ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

1. ผลการทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดขาวบ่งชี้ว่าแม้สารสกัดหยาบจะไม่มีผลต่อความอยู่รอดและการตอบสนองของเซลล์ต่อสารกระตุ้นในความเข้มข้นสูงถึง 100 µg/ml แต่มีผลยับยั้งการตอบสนองของเซลล์เมื่ออยู่ในสภาพสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 µg/ml ขึ้นไป

2. สารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อราในโรคข้าวจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีผลกระทบต่อการดำรงชีพของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามปกติในร่างกายมนุษย์ แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่าการฆ่าเชื้อราถึง 50-100 เท่าก็ตาม

3. การนำเชื้อ Antagonistic *Bacillus subtilis* มาใช้ในการควบคุมเชื้อราในโรคข้าว นั้นสรุปได้ว่าค่อนข้างปลอดภัย แต่การที่จะนำสารสกัดบริสุทธิ์มาใช้ประโยชน์นั้นจำเป็นต้องผ่านการทดสอบความเป็นพิษ (Toxicology) ตามร่างกฎหมาย พ.ร.บ. การควบคุมสารหรือวัสดุมีพิษของหน่วยงานในกระทรวงสาธารณสุขต่อไป

หัวข้อย่อยที่ 8
การทดสอบประสิทธิภาพสูตร BCA ต่อการควบคุมโรคกาบใบแห้ง
และใบไหม้ในต้นข้าว

โดย

ดร. สมคิด ดิษฐาพร*, นางนงรัตน์ นิลพานิชย์*, นายพาทเพียร อรัญนารถ*
นายวิชาติ .ศิริสันธนะ*, นางพาณี หนูเนียม**, นางนลินี จาริกภากร***

*กลุ่มงานวิจัยโรคข้าว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, **ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง สถาบันวิจัยข้าว
***สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 สงขลา กรมวิชาการเกษตร

สรุป

จากผลการทดลองตลอดโครงการ 2539-2542 ได้ผลที่สมควรสรุปเป็นหัวข้อสำคัญดังนี้

1. เชื้อจุลินทรีย์ (BCA) ที่นำมาทดลอง เมื่อผ่านการทดลองในระดับเรือนทดลอง (greenhouse) แปลงทดลองขนาดเล็ก (small plot test) พบว่าเชื้อ BCA หมายเลข (24+007) สูตรเหลวความเข้มข้น 10^7 cfu/ml มีประสิทธิภาพสามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งที่มีเชื้อสาเหตุคือ *Rhizoctonia solani* อยู่ในระดับที่น่าพอใจ สามารถเข้าสู่งการทดสอบในระดับไร่นาแปลงนาใหญ่ (big field trial)
2. การทดสอบในสภาพไร่นา ระดับเกษตรกรสามารถลอกเลียนแบบนำไปปฏิบัติได้ด้วยตนเอง พบว่าเชื้อ BCA หมายเลข (24+007) สูตรเหลวความเข้มข้น 10^7 cfu/ml มีประสิทธิภาพสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ระดับหนึ่ง เชื่อกันว่าหากได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์กันอย่างแพร่หลายซ้ำในที่เกิดโรคจะช่วยให้การแพร่ระบาดของโรคลดน้อยลงจนถึงระดับไม่เป็นโรคเลย นับเป็นการป้องกันกำจัดโรคข้าวที่ยั่งยืนถาวร
3. จากผลการทดลองเปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ (BCA) ต่อการควบคุมโรคกาบใบแห้งที่มีอยู่ในท้องตลาด พบว่าเชื้อ BCA หมายเลข (24+007) สูตรเหลวมีคุณสมบัติควบคุมโรคได้ดีที่สุด
4. ผลการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลในการนำเสนอขอขึ้นทะเบียนตามกฎระเบียบพรบ.วัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 พบว่าเชื้อ BCA หมายเลข (24+007) สูตรเหลวยังคงแสดงคุณสมบัติสามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่วางขายในท้องตลาดในปัจจุบัน
5. เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดลองจนสิ้นสุดโครงการ สามารถขยายผลไปสู่การผลิตเพื่อการค้าส่งเสริมให้เกษตรกรนำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย เป็นผลดีต่อการลดการใช้สารเคมี รักษาสมดุลธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

Greenhouse Test

Greenhouse 1 Aug-Nov 97			Greenhouse 2 Sept 97-Jan 98			Greenhouse 3 Dec 97-Feb 98			Greenhouse 4 Jan-Apr. 98		
Treatment	Rank	Mean	Treatment	Rank	Mean	Treatment	Rank	Mean	Treatment	Rank	Mean
9771	5	60.143 cd	F1	2	31.324 b	207A	2	50.970 b	9841	3	31.167 b
9772	6	60.350 cd	F2	5	42.735 cd	207C	4	55.372 b	9842	5	32.871 b
9773	9	62.243 d	F3	3	32.070 b	208	5	55.490 b	9843	2	30.156 b
24+007A	3	57.173 bc	TW	4	39.755 c	209	3	54.438 b	9844	4	31.210 b
24+007B	7	60.368 cd	Dis-ck	6	48.156 d	Dis-ck	6	67.882 c	Dis-ck	6	37.166 c
Cell	8	61.228 cd	Non-dis Ck	1	0.000 a	Non-dis Ck	7	73.727 c	Non-dis Ck	1	0.000 a
TW_WP	2	55.982 b					1	0.000 c			
TW_LQ	4	58.655 bcd									
Dis-ck	10	67.120 c									
Non-dis Ck	1	0.000 a									

การทดลองในเรือนปฏิบัติการครั้งที่ 1

ในการเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย 2 strain (24+007A) ให้ผลดีใกล้เคียงสูตรผงจากไต้หวัน(TW_WP) ส่วนสูตรผสมแบคทีเรีย 2 strains อื่นๆ 9771 9772 9773 (24+007B) และสารละลายเซลล์ของแบคทีเรียให้ผลรองลงมาใกล้เคียงกับสูตรน้ำจากไต้หวัน (TW_LQ) และ ผลจากการใช้แบคทีเรียทั้งหมดดีกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรีย และชี้ให้เห็นผลของสูตรผสมในโครงการดีเท่าเทียมสูตรที่เป็นผลิตภัณฑ์จากแหล่งอื่น

การทดลองในเรือนปฏิบัติการครั้งที่ 2

ในการเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย 2 strain F1 (ผง 10^7 cfu/ml) และ F3 (ผง 10^9 cfu/ml) ให้ผลดีกว่าสูตร F2 (ผง 10^7 cfu/ml) และสูตรน้ำจากไต้หวัน (TW) และผลจากการใช้แบคทีเรียทั้งหมดดีกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรีย และชี้ให้เห็นผลของสูตรผสมในโครงการดีกว่าหรือเท่าเทียมสูตรที่เป็นผลิตภัณฑ์จากแหล่งอื่นและการใช้ความเข้มข้นของสูตรผสมแบคทีเรียที่ 10^7 cfu/ml (F1) ให้ผลดีเช่นเดียวกับการใช้ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml (F3) การทดลองต่อไป จึงสามารถใช้ความเข้มข้นที่ 10^7 cfu/ml เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต

การทดลองในเรือนปฏิบัติการครั้งที่ 3

ในการเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ (relative lesion height) ของโรคกาบใบแห้ง ในแปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย 2 strain 207A (ผง) 207C (ผง) 208 (น้ำ) และ 209 (น้ำ) ให้ผลใกล้เคียงกันทุกสูตรและผลจากการใช้แบคทีเรียทั้งหมดดีกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรีย

การทดลองในเรือนปฏิบัติการครั้งที่ 4

ในการเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย 2 strain 9841 (ผง) 9842 (ผง) 9843 (น้ำ) และ 9844 (น้ำ) ให้ผลใกล้เคียงกันทุกสูตร และผลจากการใช้แบคทีเรียทั้งหมดดีกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรีย

จากการทดลองในเรือนปฏิบัติการทั้ง 4 ครั้งได้ผลเป็นที่น่าพอใจสมควรนำสูตรผสมเชื้อแบคทีเรียไปทดลองต่อในสภาพแปลงทดลองต่อไป

Small plot Test

Small plot 1 Feb-Jun 97			Small plot 2 Aug-Dec 97			Small plot 3 Feb.-Jun 98		
Treatment	Rank	Mean	Treatment	Rank	Mean	Treatment	Rank	Mean
701	6	40.752 b	1001	2	50.550 b	9841	3	50.832 b
805	5	38.890 b	1003	6	55.205 b	9842	4	50.945 b
24+26	3	37.737 b	F13	4	51.702 b	9843	5	55.820 b
24+007	2	37.128 b	F2	3	51.370 b	9844	2	46.770 b
Dis-ck	4	37.830 b	TW	5	51.728 b	Dis-ck	6	56.820 b
Non-dis Ck	1	0.000 a	Dis-ck	7	74.778 c	Non-dis Ck	1	0.000 a
			Non-dis Ck	1	0.000 a			

การทดลองแปลงเล็กในสถานีครั้งที่ 1

ในการเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย 2 strain 701 (ผง) 805 (ผง) 24+26 (น้ำ) และ 24+007 (น้ำ) ให้ผลใกล้เคียงกันทุกสูตรและไม่แตกต่างจากแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรียเนื่องจากความรุนแรงของโรคต่ำเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่อำนวยในการขยายของแผล

การทดลองแปลงเล็กในสถานีครั้งที่ 2

ในการเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย 2 strain 1001 (ผง) 1003 (ผง) F1 (น้ำ) F2 (น้ำ) และสูตรผงจากได้หวัน (TW) ให้ผลใกล้เคียงกันทุกสูตรและผลจากการใช้แบคทีเรียทั้งหมดดีกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรีย

การทดลองแปลงเล็กในสถานีครั้งที่ 3

ในการเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย 2 strain 9841 (ผง) 9842 (ผง) 9843 (น้ำ) และ 9844 (น้ำ) ให้ผลใกล้เคียงกันทุกสูตรแม้จะมีค่า RLH ต่ำกว่าแต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากแปลงที่ไม่ใช้แบคทีเรียชนิดพ่น

Big field in station

Relative lesion height

Big field in station 1 Aug.-Nov. 98			Big field in station 2 Feb.-Jun. 98		
Treatment	Mean	Difference	Treatment	Mean	Difference
A	75.132	-6.202 *	A	46.41	-10.85 *
B	74.36	-6.974 *	B	48.51	-8.75 *
Ck	81.334		Ck	57.26	

Grain weight (Kgs/rai)

Big field in station1 Aug.-Nov. 98			Big field in station2 Feb.-Jun. 98		
Treatment	Mean	Difference	Treatment	Mean	Difference
A	702.51	95.62 *	A	591.00	78.33 *
B	646.16	39.27 ns	B	522.67	10.00 ns
Ck	606.89		Ck	512.67	

Treatments comparing with check by LSD

จากผลการทดลองในแปลงทดลองขนาดเล็กพบประสิทธิภาพของสูตรน้ำค่อนข้างจะมากกว่าการทดลองในขั้นแปลงใหญ่จึงเลือกใช้สูตรน้ำ แต่ยังไม่มีความชัดเจนในแง่การใช้สูตรผสม 1 strain หรือ 2 strains จึงทำการทดลองในสูตรดังกล่าวเพื่อย้ำผลการทดลอง

การทดลองแปลงนาใหญ่ในสถานีครั้งที่ 1

การเปรียบเทียบความยาวแผลสัมผัสในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย Bs24+MK007 (A) และ แบคทีเรียเดี่ยว MK007 (B) ให้ผลใกล้เคียงกันและผลจากการใช้แบคทีเรียทั้ง 2 สูตร ดีกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรีย

ผลผลิตข้าวที่ได้จากการใช้สูตร A ให้ผลดีกว่า ในขณะที่แปลงที่ใช้สูตร B ให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากแปลงที่ไม่ใช้แบคทีเรีย

การทดลองแปลงนาใหญ่ในสถานีครั้งที่ 2

การเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย Bs24+MK007 (A) และแบคทีเรียเดี่ยว MK007 (B) ให้ผลใกล้เคียงกันและผลจากการใช้แบคทีเรียทั้ง 2 สูตร ดีกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดลองครั้งที่ 1

ผลผลิตข้าวที่ได้จากการใช้สูตร A ให้ผลดีกว่า ในขณะที่แปลงที่ใช้สูตร B ให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากแปลงที่ไม่ใช้แบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดลองครั้งที่ 1

Farmer's field

Relative lesion height

Farmer's field 1 Jan.-Apr. 99			Farmer field 2 Apr.-Aug. 99		
Treatment	Mean	Difference	Treatment	Mean	Difference
Bs(A)	63.63	-6.04 *	A	44.098	-8.365 *
Ck	57.99		B	45.210	-7.253 ns
			Ck	52.463	-

Grain weight (kgs/rai)

Farmer's field 1 Jan.-Apr. 99			Farmer field 2 Apr.-Aug. 99		
Treatment	Mean	Difference	Treatment	Mean	Difference
Bs(A)	749.44	-55.75 ns	A	731	-40 ns
Ck	805.19		B	700	-9 ns
			Ck	691	

Treatments comparing with check by LSD

จากผลการทดลองแปลงใหญ่ในสถานี นำมาทดลองในแปลงขนาดใหญ่กว่าและในสภาพการปฏิบัติของเกษตรกร และยังคงมีการเปรียบเทียบระหว่างสูตร strain และ 2 strains

การทดลองในแปลงเกษตรกรครั้งที่ 1

ผลการทดลองผกผันไปจากสมมุติฐานที่คาดไว้ คือ แปลงที่ไม่ใช้แบคทีเรียเกิดแผล (relative lesion height) ต่ำกว่าแปลงที่ใช้แบคทีเรีย สูตรผสม (A) ผลผลิตข้าวที่ได้มีความผกผันเช่นกันคือ แปลงที่ไม่ใช้แบคทีเรียให้ผลผลิตสูงกว่าแปลงที่ใช้แบคทีเรีย ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นคาดว่าเกิดจากความแปรปรวนในพื้นที่การทดลองและ/หรือการปฏิบัติของเกษตรกรที่ไม่เท่าเทียมกัน เนื่องจากการใช้แบคทีเรียสูตรผสมทำให้ต้นทุนสูง จึงเห็นสมควรทำการทดสอบสูตรแบคทีเรียเดี่ยวควบคู่กันไป

การทดลองในแปลงเกษตรกรครั้งที่ 2

การเปรียบเทียบความยาวแผลสัมพัทธ์ (relative lesion height) ในโรคกาบใบแห้ง แปลงที่ใช้สูตรผสมแบคทีเรีย Bs24+MK007 (A) ให้ผลดีกว่าแปลงที่ใช้แบคทีเรียเดี่ยว MK007 (B) ซึ่งผลของ สูตร B ให้ผลไม่แตกต่างจากแปลงที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรีย

ผลผลิตข้าวที่ได้จากการใช้ทั้ง 2 สูตร A สูตร B ให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากแปลงที่ไม่ใช้แบคทีเรีย

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรเชื้อ BCA ต่างๆที่มีในท้องตลาดต่อการควบคุมโรคกาบใบแห้ง ในระดับเรือนทดลอง

Comparison of sheath blight disease severity among treatment of RD 23 variety when treated with antagonistic bacteria and fungicide, Rice Pathology Research green house. Wet season 1999.

Treatment	Rank	Mean
1. Agroguard (WP.)	6	64.89 d
2. Agroguard (Liq.)	5	63.06 cd
3. BS916	9	66.95 d
4. Panta (BS 24+26)	8	66.79 d
5. Larminar	4	58.73 bc
6. BS(A)	2	50.61 b
7. BS(B)	3	55.64 bc
8. BCA 321+562	7	65.33 d
9. Validamycin	1	35.13 a
10. Control	10	73.25 e
Mean		60.04

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

สรุปการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ BCA ต่อโรคไหม้และกาบใบแห้งในเรือนทดลองและแปลงนาเล็ก

(1) ส่วนของการทดลองที่กรมวิชาการเกษตร บางเขน

(1.1) ผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ BCA (Whole Cell) พบว่า B.24 + B.26 และ B.24 + MK007 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าวดีกว่าชนิดอื่น

(1.2) ผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ BCA สูตรต่างๆ ต่อโรคกาบใบแห้งในเรือนทดลอง พบว่า B.24 + MK007 สูตร A ให้ผลดีที่สุด รองลงมาได้แก่ B.24 + MK007 สูตร B

(1.3) ผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ BCA สูตรต่างๆ ต่อโรคกาบใบแห้งในแปลงขนาดเล็ก พบว่า B.24 + MK007 สูตร A ให้ผลดีที่สุด

(1.4) ผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ BCA สูตรต่างๆ ต่อโรคกาบใบแห้งในเรือนทดลอง (ซ้ำครั้งที่ 2) พบว่า B.24 + MK007 สูตร A ยังคงให้ผลดีที่สุดในระดับเดียวกับ BCA สูตรจากได้วัน

(2) ส่วนของการทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

(2.1) ยืนยันผลการทดสอบประสิทธิภาพ BS สูตรต่างๆ ต่อโรคกาบใบแห้งข้าวในเรือนทดลอง พบว่า สูตรน้ำ II ให้ผลดีที่สุด

(2.2) ผลการทดลองครั้งที่ 2 ในเรือนทดลองพบว่า สูตรผง 9782 ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ สูตรผง 9781

(2.3) การทดลองประสิทธิภาพ BS สูตรต่างๆ ต่อโรคไหม้ในสภาพไร่ พบว่า

- | | |
|------------|---|
| ครั้งที่ 1 | - ไม่ได้ผลการทดลองเนื่องจากโรครุนแรงทุกแปลง |
| ครั้งที่ 2 | - ทุกการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ |

1. การทดลองที่กรมวิชาการเกษตร บางเขน

1.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพ BCA สูตรต่างๆ ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในเรือนทดลอง (มกราคม - เมษายน 2540)

ปลูกข้าวพันธุ์ กข 23 ในกระถางมังกรขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 32 กระถาง วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี คือ การใช้แบคทีเรียผสมสูตรต่าง ๆ ได้แก่ 9721, 9722, B.24 + B.26 สูตร A, B.24 + MK007 สูตร A, B.24 + B.26 สูตร B, B.24 + MK007 สูตร B, diseased check และ Non-diseased check ปลูกเชื้อโรคกาบใบแห้ง (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/เกลบ/รำ) ด้วยกระดาษฟางสอดลงในกอข้าว ฉีดพ่นแบคทีเรียทุกกรรมวิธีก่อนปลูกเชื้อโรค 1 วัน หรือเมื่อข้าวอายุได้ 79 วัน และฉีดพ่นอีก 2 ครั้ง เมื่อข้าวอายุได้ 82 และ 89 วัน

ตรวจผลการเกิดโรคกาบใบแห้ง 4 ครั้ง คือ เมื่อข้าวอายุ 87, 96, 108, และ 117 วัน ตามลำดับ โดยการวัดแผลสูงสุดจากผิวดินและความสูงของต้นข้าวในแต่ละกอ รวม 3 กอต่อกระถาง คำนวณความรุนแรงของโรคเป็น % Relative lesion height ($= \frac{\text{ความสูงแผล}}{\text{ความสูงต้น}} \times 100$)

ความสูงต้น

ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1.1 A และ 1.1 B

กล่าวโดยสรุปจากการอ่านผลครั้งสุดท้ายเชื้อแบคทีเรียเกือบทุกสูตร ยกเว้น B.24 + B.26 สูตร B ให้ผลดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ (dis-check) ในจำนวนนี้สูตรที่ให้ผลดีที่สุด คือ B.24 + MK007 สูตร A รองลงมา คือ B.24 + M007 สูตร B ถ้าพิจารณาจาก Relative lesion height

ตารางที่ 1.1 A Lesion height (%) of rice sheath blight due to treatments of Bs formulation,
Large pots experiment (Jan-Apr 97)

Treatment	1 st observation		2 nd observation		3 rd observation		4 th observation	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
9721	3	15.163 bc	2	20.415 bc	6	22.250 cde	6	30.167 bc
9722	4	16.413 bc	6	21.502 bc	5	23.665 bcd	4	26.375 bc
24+26A	5	16.745 bc	3	20.500 b	3	22.377 bc	5	28.665 bc
24+007A	8	17.580 c	4	20.750 b	2	21.455 b	3	26.250 bc
24+26B	6	16.748 bc	7	21.583 bc	7	26.000 de	7	31.833 cd
24+007B	2	13.415 b	5	21.165 bc	4	22.500 bc	2	25.667 b
CK1 (dis)	7	16.827 bc	8	24.833 c	8	27.415 e	8	36.790 d
CK2 (non-dis)	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
mean		14.111		18.843		21.083		25.718

ตารางที่ 1.1 B Relative lesion height (%) of rice sheath blight due to treatments of Bs formulation, Large pots experiment (Jan-Apr 97)

Treatment	1 st observation		2 nd observation		3 rd observation		4 th observation	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
9721	3	14.823 b	2	17.202 b	6	22.138 bcd	6	25.300 b
9722	5	15.255 b	4	17.602 b	4	20.360 bc	3	23.003 b
24+26A	4	15.247 b	3	17.505 b	3	19.950 bc	5	24.938 b
24+007A	8	16.427 b	5	17.935 b	2	19.043 b	2	22.785 b
24+26B	6	15.473 b	6	18.290 b	7	23.127 cd	7	27.805 bc
24+007B	2	12.935 b	7	18.315 b	5	20.440 bc	4	24.100 b
CK1 (dis)	7	15.660 b	8	21.580 c	8	24.372 d	8	32.180 c
CK2 (non-dis)	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
mean		13.227		16.054		18.679		22.514

1.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพ BCA สูตรต่างๆ ในการควบคุมโรคกาบใบแห้ง ในนาแปลงเล็ก (มีนาคม - มิถุนายน 2540)

หว่านข้าวพันธุ์ กข 23 ในแปลงย่อยขนาด 4×7 เมตร จำนวน 24 แปลง วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี คือ เชื้อแบคทีเรียสูตร 701, 805, สูตรผสม B.24 + B.26, สูตรผสม B.24 + MK007 และแปลงเปรียบเทียบเป็นโรค (diseased) และไม่เป็นโรค (non-diseased) นีดพ่นเชื้อทุกกรรมวิธี ครั้งที่ 1 เมื่อข้าวอายุได้ 70 วัน หลังปลูก (70 DAS) หลังจากนั้น 2 วัน (72 DAS) ปลูกเชื้อโรคกาบใบแห้ง โดยการห่มก้อนเชื้อ (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/เกลบ/รำนึ่ง) ด้วยกระดาษฟางห่มด้วยมุ้งลวดกันหนู สอดลงในกอข้าวที่สุ่มทำเครื่องหมายไว้จำนวน 20 กอ ต่อแปลง ต่อจากนั้นนิตพ่นเชื้อสูตรต่าง ๆ อีก 2 ครั้ง เมื่อข้าวอายุได้ 74 และ 81 วัน

ผลการทดลองจากการตรวจผล 3 ครั้ง คือ เมื่อข้าวอายุได้ 80, 88 และ 102 วัน โดยการวัดความสูงของแผลและความสูงของต้นข้าว จำนวน 20 กอ/แปลง คำนวณความรุนแรงโรคเป็น % Relative lesion height ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของ lesion height, Relative lesion height และ biomass & yield แสดงไว้ในตารางที่ 1.2A, 1.2B และ 1.2C ตามลำดับ พบว่าได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละกรรมวิธี อย่างไรก็ตาม B.24 + MK007 ให้ผลดีที่สุด ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งและให้ผลผลิตสูงสุด แต่เชื้อที่ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดคือสูตร 701 เหตุที่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับการทดลองในกระถาง อาจเป็นเพราะปริมาณเชื้อที่ใช้ต่อพื้นที่น้อยกว่ามากและการนิตพ่นในขณะอุณหภูมิสูง

หมายเหตุ : สูตร 701 = B.24 + MK007 และสูตร 805 = B.24 + B.26

ตารางที่ 1.2A Effects of BS formulation on ShB. Development pathum – thani Rice research Center, of season 1997 (March – June, 1997)

Lesion height

Treatment	1 st observation		2 nd observation		3 rd observation	
	Rank	Means	Rank	Mean	Rank	Mean
T ₁ (701)	3	22.145 b	2	25.790 b	6	41.190 b
T ₂ (805)	5	23.772 b	4	27.813 b	4	38.060 b
T ₃ (24 + 26)	6	24.795 b	5	28.895 b	3	37.170 b
T ₄ (24 + 007)	2	21.563 b	3	26.770 b	2	36.475 b
T ₅ (dis)	4	22.792 b	6	30.833 b	5	39.695 b
T ₆ (non-dis)	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
Mean		19.178		23.350		32.098

ตารางที่ 1.2B Effects of BS formulation on ShB. Development pathum – thani Rice research Center, of season 1997 (March – June, 1997)

Relative lesion height

Treatment	1 st observation		2 nd observation		3 rd observation	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
T ₁ 701	3	23.823 b	2	26.670 b	6	40.752 b
T ₂ 805	5	24.998 b	4	28.130 b	5	38.890 b
T ₃ 24 + 26	6	25.023 b	5	29.223 b	3	37.737 b
T ₄ 24 + 007	2	22.085 b	3	26.825 b	2	37.128 b
T ₅ dis	4	24.290 b	6	30.588 b	4	37.830 b
T ₆ non-dis	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
Mean		20.036		23.573		32.056

ตารางที่ 1.2C Effects of BS formulation on ShB. Development pathum – thani Rice research Center, of season 1997 (March – June, 1997)

Biomass, yield

Treatment	Grain weight (gms/m ³)		Empty grain wt. (gms/sqr.m)		Biomass (gms/sqr.m)	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
T ₁ 701	4	107.33 a	2	6.188 a	6	324.455 a
T ₂ 805	5	110.34 a	3	6.318 a	1	272.667 a
T ₃ 24 + 26	1	97.327 a	4	6.640 a	3	278.045 a
T ₄ 24 + 007	6	126.557 a	6	8.262 a	5	317.695 a
T ₅ dis	2	100.975 a	5	7.603 a	2	273.808 a
T ₆ non-dis	3	102.983 a	1	5.917 a	4	287.903 a
Mean		107.586		6.821		292.429

1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพ BCA สูตรต่างๆ ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในเรือนทดลอง (มิถุนายน - กันยายน 2540)

ปลูกข้าวพันธุ์ กข. 23 ในกระถางมังกรขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 40 กระถาง วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 10 กรรมวิธี คือ

T1 = 9771 (ผง)

T2 = 9772 (ผง)

T3 = 9773 (ผง)

T4 = B.24 + MK007 สูตร 1 (น้ำ)

T5 = B.24 + MK007 สูตร 2 (น้ำ)

T6 = whole cell B.24 + MK007

T7 = BS ผง (Taiwan)

T8 = BS น้ำ (Taiwan)

T9 = dis check

T10 = non-dis, check

ปลูกเชื้อโรคกาบใบแห้ง เมื่อข้าวอายุได้ 62 วัน ฉีดพ่นเชื้อตามกรรมวิธีต่างๆ ทั้งหมด 3 ครั้ง คือ เมื่อข้าวอายุได้ 60, 78 และ 85 วัน

ตรวจผลการเกิดโรค หลังจากปลูกเชื้อได้ 1 สัปดาห์ และตรวจวัดการพัฒนาของแผลโรคกาบใบแห้งอีกทุก ๆ สัปดาห์รวม 6 ครั้ง จากการตรวจผลแต่ละครั้งไม่พบความแตกต่างในการควบคุมการเกิดโรคของแต่ละกรรมวิธีเมื่อเปรียบเทียบกับ diseased check แต่เมื่อพิจารณาจากการเรียงลำดับพบว่า กรรมวิธีที่ 4 คือ B.24 + MK007 สูตร 1 (น้ำ) กับ BCA ของได้วันสูตรให้ผลดีกว่ากรรมวิธีอื่น การทดลองครั้งนี้จะพิจารณาได้ว่าการฉีดพ่นเชื้อกระชั้นอยู่ตรงต้นฤดู ทำให้เชื้อไม่สามารถครอบคลุมตอนปลายฤดูได้ จะเห็นว่าโรคได้พัฒนาไปได้รุนแรงมากจนไม่สามารถควบคุมได้แม้กรรมวิธีใด

หมายเหตุ : สูตร 9771 = B.24 + MK007 + crude extract

9772 = crude extract

9773 = B.24 + MK007

2. การทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

2.1 การควบคุมโรคกาบใบแห้งในสภาพเรือนทดลอง

มี BCA 4 สูตร ผง 2 สูตร และน้ำ 2 สูตร

เริ่มปลูกข้าวเมื่อวันที่ 28 เมษายน 2540

ตรวจผลการทดลองครั้งที่ 3 เมื่อวันที่ 25 กรกฎาคม 2540

ผลปรากฏว่า BCA สูตรน้ำสูตรที่ II ให้ผลดีที่สุด จากการตรวจผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง โดยทำให้เกิดความสูงของแผล (Lesion height) และเปอร์เซ็นต์ความสูงของแผล (Relative lesion height) น้อยกว่าสูตร BCA สูตรอื่นๆ และมีความแตกต่างกับตัวเปรียบเทียบ (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งปลูกข้าวในกระถางมังกรมี BCA สูตรน้ำ 2 สูตรและสูตร ผง 3 สูตร ครั้งนี้ใช้ BCA สูตรผงของไค้หวันเป็นตัวเปรียบเทียบกับ

เริ่มปลูกข้าวเมื่อวันที่ 13 มิถุนายน 2540

ฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรกเมื่อวันที่ 22 สิงหาคม 2540

ตรวจผลครั้งแรกเมื่อวันที่ 2 กันยายน 2540

ตรวจผลครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 10 กันยายน 2540

ผลการทดลอง จากการตรวจผลการทดลองครั้งแรกทุกสูตรเชื้อให้ผลไม่แตกต่างจาก control การตรวจผลครั้งที่ 2 สูตรผง 9782 และ 9781 ความสูงของแผลโรคแตกต่างจาก control

การทดลองการควบคุมโรคไหม้ในสภาพไร่

ครั้งแรกใช้สูตร BCA 4 สูตร คือ ผง 2 สูตร และน้ำ 2 สูตร

ปลูกเมื่อ 23 มิถุนายน 2540

พ่นสูตรเชื้อครั้งแรกเมื่อ 4 กรกฎาคม 2540

พ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 2 เมื่อ 8 กรกฎาคม 2540

พ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 3 เมื่อ 12 กรกฎาคม 2540

ตรวจผลเมื่อวันที่ 11 กรกฎาคม 2540 ผลปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างระหว่างแปลง ทุกแปลงเกิดโรครุนแรงเหมือนกัน

การทดลองครั้งที่ 2 ใช้ BCA น้ำ 2 สูตร และผง 3 สูตร ปลุกข้าวในสภาพไร่เมื่อวันที่ 8 กันยายน 2540

ปลุกข้าวในถาด (ตะกุงยาง) เมื่อวันที่ 9 กันยายน 2540

ฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก วันที่ 19 กันยายน 2540

ฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 2 วันที่ 24 กันยายน 2540

การทดลองการควบคุมโรคกาบใบแห้งในสภาพเรือนทดลอง

มี BCA 4 สูตร ผง 2 สูตร และน้ำ 2 สูตร

28 เม.ย. 40 ปลุกข้าว

30 มิ.ย. 40 ฉีดพ่นสูตรเชื้อ ครั้งที่ 1

2 ก.ค. 40 ปลุกเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้ง

4 ก.ค. 40 ฉีดพ่นสูตรเชื้อ ครั้งที่ 2

10 ก.ค. 40 ตรวจผลการทดลอง ครั้งที่ 1

11 ก.ค. 40 ฉีดพ่นสูตรเชื้อ ครั้งที่ 3

18 ก.ค. 40 ตรวจผลการทดลอง ครั้งที่ 2

25 ก.ค. 40 ตรวจผลการทดลอง ครั้งที่ 3

ผลการทดลองปรากฏว่า BCA สูตรน้ำสูตรที่ 2 ให้ผลดีที่สุด จากการตรวจผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง โดยทำให้เกิดความสูงของแผล (Lesion height) จากตารางที่ 2.1A และ เปอร์เซ็นต์ความสูงของแผล (Relative lesion height) จากตารางที่ 2.1B น้อยกว่าสูตร BCA สูตรอื่นๆ และมีความแตกต่างกับตัวเปรียบเทียบ (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2.1 A ความสูงของแผลโรคกาบใบแห้ง จากการทดลองในกระถาง ครั้งที่ 1

Treatment	1 st. observation		2 nd. observation		3 rd. observation	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
1.	6	9.520 ab	5	12.837 ab	7	14.66 a
2.	5	9.500 ab	6	12.845 ab	5	13.13 ab
3.	3	8.562 b	4	12.187 ab	4	12.69 ab
4.	4	8.875 b	3	10.750 b	3	11.40 b
5.	2	0.500 c	2	0.687 c	2	0.75 c
6.	7	11.000 a	7	13.125 a	6	13.50 a
7.	1	0.000 c	1	0.000 c	1	0.00 c

Treatment (t) = 7

T1 = ผง 9761 T5 = ขาวลิดาลิน 1 st observation = 72 day after seedling
T2 = ผง 9762 T6 = ck1 (dis) 2 nd observation = 80 day after seedling
T3 = น้ำ I T7 = ck2 (non-dis) 3 rd observation = 87 day after seedling
T4 = น้ำ II

หมายเหตุ : สูตร 9761 = B.24 + B.26

9762 = B.24 + MK007

ตารางที่ 2.1 B Relative Lesion/plant height ของแผลโรคกาบใบแห้งจากการทดลองในกระถางครั้งที่ 1

Treatment	1 st. observation		2 nd. observation		3 rd. observation	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
1.	5	11.672 ab	5	14.185 a	7	15.85 a
2.	6	11.817 ab	6	14.375 a	5	14.30 ab
3.	3	10.350 b	4	13.425 ab	4	13.93 ab
4.	4	10.630 b	3	11.575 b	3	12.21 b
5.	2	0.617 c	2	0.76 c	2	0.82 c
6.	7	13.552 a	7	14.715 a	6	14.94 a
7.	1	0.000 c	1	0.000 c	1	0.0 c

2.2 การทดลองการควบคุมโรคกาบใบแห้งครั้งที่ 2

ได้ปลูกข้าวในกระถางมังกรมี BCA สูตรน้ำ 2 สูตร และสูตรผง 3 สูตร ครั้งนี้ใช้ BCA สูตรผงของไต้หวันเป็นตัวเปรียบเทียบด้วย โดยดำเนินการดังนี้

- 13 มิ.ย. 40 ปลูกข้าวพันธุ์ กข. 23 ในกระถางมังกร
- 22 ส.ค. 40 ฉีดพ่นสูตรเชื้อ ครั้งที่ 1
- 25 ส.ค. 40 ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้ง
- 27 ส.ค. 40 ฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 2
- 2 ก.ย. 40 ตรวจสอบผลการทดลอง ครั้งที่ 1
- 3 ก.ย. 40 ฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 3
- 10 ก.ย. 40 ตรวจสอบผลการทดลองครั้งที่ 2
- 25 ก.ย. 40 ตรวจสอบผลการทดลองครั้งที่ 3
- 3 ต.ค. 40 ตรวจสอบผลการทดลองครั้งที่ 4

ผลการทดลอง จากการตรวจสอบผลการทดลองครั้งแรกทุกสูตรเชื้อให้ผลไม่แตกต่างจาก control การตรวจสอบครั้งที่ 2 สูตรผง 9782 และ 9781 ความสูงของแผลโรคแตกต่างจาก control และจากการตรวจสอบครั้งที่ 4 ทุกสูตรเชื้อให้ความสูงของแผลโรคแตกต่างจาก control เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของ Rank พบว่าสูตรเชื้อที่มีแนวโน้มว่าจะดีกว่าสูตรอื่นๆ คือ สูตรผง 9782, 9781 และสูตรน้ำ 816 (ตารางที่ 2.2 A และ 2.2 B)

ตารางที่ 2.2 A ความสูงของแผลโรคกาบใบแห้ง (Lesion height) จากการทดลองครั้งที่ 2 ใน
กระถางมังกร

Treatment	1 st. observation		2 nd. observation		3 rd. observation		4th. observation	
	Ranks	Means	Ranks	Means	Ranks	Means	Ranks	Means
1. น้ำ 815	8	17.37 a	7	23.51 abc	6	32.41 ab	5	36.13 b
2. น้ำ 816	3	15.96 a	4	21.37 bc	4	28.44 ab	4	35.72 b
3. ผง 9781	5	15.88 a	3	20.13 c	3	28.12 ab	2	35.59 b
4. ผง 9782	6	16.38 a	2	19.94 c	2	26.87 b	3	35.69 b
5. ผง 9783	2	15.50 a	6	23.31 abc	5	29.22 ab	6	38.19 b
6. เชื้อสด	7	17.35 a	9	25.12 a	9	36.02 a	8	44.19 b
7. ได้หัววัน (ผง)	4	15.88 a	5	22.03 abc	8	35.41 ab	7	42.94 ab
8. เปรียบเทียบ + โรค	9	17.94 a	8	24.65 ab	7	34.64 ab	9	48.87 a
9. เปรียบเทียบ ไม่มีโรค	1	0.00 b	1	0.00 a	1	0.00 c	1	0.00 c

หมายเหตุ : สูตร 9781 = B.24 + MK007 + crude extract

9782 = crude extract

9783 = B.24 + MK007

ตารางที่ 2.2 B เปอร์เซ็นต์ความสูงของแผลโรคกาบใบแห้ง (Relative lesion height) จากการทดลองครั้งที่ 2 ในกระถางมังกร

Treatment	1 st. observation		2 nd. observation		3 rd. observation		4th. observation	
	Ranks	Means	Ranks	Means	Ranks	Means	Ranks	Means
1. น้ำ 815	6	16.18 a	5	21.48 ab	6	29.51 ab	2	32.86 b
2. น้ำ 816	4	15.61 a	3	19.28 b	3	27.28 ab	4	34.29 b
3. ผง 9781	7	16.33 a	4	20.04 ab	4	27.48 ab	5	34.77 b
4. ผง 9782	5	15.89 a	2	19.08 b	2	25.53 b	3	33.91 b
5. ผง 9783	2	14.62 a	7	22.64 ab	5	28.23 ab	6	36.61 ab
6. เชื้อสด	8	16.40 a	9	23.60 a	8	33.63 ab	7	41.19 ab
7. ได้หัวน (ผง)	3	15.45 a	6	21.56 ab	9	34.24 a	8	41.26 ab
8. เปรียบเทียบ + โรค	9	17.10 a	8	22.91 ab	7	32.23 ab	9	44.77 a
9. เปรียบเทียบ ไม่มีโรค	1	0.00 b	1	0.00 c	1	0.00 c	1	0.00 c

2.3 การทดลองการควบคุมโรคไหม้ในสภาพไร่

ครั้งแรกใช้สูตร BCA 4 สูตร คือผง 2 สูตรน้ำ 2 สูตร

23 มี.ย. 40	ปลูกข้าว
4 ก.ค. 40	พ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 1
8 ก.ค. 40	พ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 2
12 ก.ค. 40	พ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 3

ตรวจผลเมื่อวันที่ 11 ก.ค. 40 ผลปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างระหว่างแปลง ทุกแปลงเกิดโรครุนแรงเหมือนกัน

การทดลองครั้งที่ 2 ใช้ BCA สูตรน้ำ 2 สูตร และสูตรผง 3 สูตร ปลูกข้าวในสภาพไร่ และในถาดทดลอง

8 ก.ย. 40	ปลูกข้าวสภาพไร่
9 ก.ย. 40	ปลูกข้าวในถาดอคูมินิยม (ตะกงยาง)
19 ก.ย. 40	ฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 1
24 ก.ค. 40	ฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 2
30 ก.ค. 40	ฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งที่ 3
2 ต.ค. 40	ตรวจผลการทดลอง

ผลการทดลองในแปลงเกิดโรครุนแรงทุกแปลง ไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแปลงได้ ส่วนในถาดจากการตรวจวัดขนาดของแผลและบันทึกจำนวนแผลโดยสุ่มนับจาก 2 ใบบนถัดจากใบยอด ถาดละ 10 ต้น นำไปคำนวณหาพื้นที่ใบที่เกิดโรค ผลการทดลองพบว่าทุก treatment ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับเปรียบเทียบแต่สูตรผง 9782 มี แนวโน้มดีกว่าสูตรอื่นๆ โดยให้พื้นที่ใบที่เกิดโรคต่อใบน้อยที่สุด 4.34 ซม² รองลงไปเป็น เชื้อสด (5.81 ซม²) สูตรน้ำ 815 (6.60 ซม²) ทุกสูตรให้พื้นที่ใบเกิดโรคน้อยกว่ายาเชื้อของไต้หวันผง และน้ำในถาดที่พ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืช Beam ให้ผลใกล้เคียงกับผลของไต้หวันส่วนถาดเปรียบเทียบจะให้พื้นที่ใบเกิดโรคสูงสุด (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 แสดงพื้นที่ใบที่เกิดโรค ของการทดลองควบคุมโรคไหม้

Treatment	พื้นที่ใบเป็นโรค (ชม ²)				เฉลี่ย
	I	II	III	IV	
T1 น้ำ 815	6.90	5.95	4.56	9.00	6.6025
T2 น้ำ 816	4.59	8.01	4.44	10.70	6.935
T3 ผง 9781	6.43	9.02	3.83	7.34	6.655
T4 ผง 9782	2.81	7.60	6.46	2.50	4.8425
T5 ผง 9783	5.3	9.35	6.73	6.93	7.077
T6 เชื้อสด	11.33	1.22	2.95	7.74	5.810
T7 ได้ห้วน น้ำ	6.06	12.24	6.05	8.47	8.205
T8 ได้ห้วน ผง	5.17	11.00	5.66	11.47	8.325
T9 Beam	4.25	10.42	8.13	10.23	8.257
T10 ck	6.47	10.19	9.74	17.78	11.045

หมายเหตุ : สูตร 815 = B.24 + MK007 + CMC

816 = B.24 + MK007 + carrageenan

9781 = B.24 + MK007 + crude extract

9782 = crude extract

9783 = B.24 + MK007

3. สรุปผลการทดสอบประสิทธิภาพของสูตร ABS ต่อการควบคุมโรคกาบใบแห้ง ณ. กรมวิชาการเกษตร

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง ในเรือนทดลองและแปลงนาเล็ก รวมทั้ง 4 การทดลองแล้ว กล่าวโดยสรุปได้ว่า เชื้อ ABS 4 สูตร ทั้งในรูปแบบผงและของเหลวมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งได้ดีกว่าการไม่ใช้เชื้อ ABS อย่างเห็นได้ชัดเจนและไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อทั้ง 4 สูตร

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* สูตรต่างๆ ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในนาแปลงเล็ก (ครั้งที่ 2) สิงหาคม - ธันวาคม 2540

ปักดำข้าวพันธุ์ กข. 23 อายุ 21 วันในแปลงย่อยขนาด 4X7 เมตร จำนวน 24 แปลง วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ ประกอบด้วยการใช้แบคทีเรียผสมสูตรต่างๆ 7 กรรมวิธี

T1	=	สูตรผง	MK007 + B24 (1001)
T2	=	สูตรผง	MK007 + B24 (1003)
T3	=	สูตรเหลว	MK007 + B24 (F1)
T4	=	สูตรเหลว	MK007 + B24 (F2)
T5	=	Taiwan	
T6	=	Disease check	
T7	=	Non-disease check	

เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 57 วันปลูกเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งโดยการห่มก้อนเชื้อ (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/เกลบ/รำนึ่ง) ด้วยกระดาษฟางห่มด้วยมุ้งลวดกันหนู สอดลงในกอข้าวที่สุ่มทำเครื่องหมายไว้จำนวน 20 กอต่อแปลงต่อจากนั้นฉีดพ่นเชื้อสูตรต่างๆ 4 ครั้ง เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 60, 70, 81 และ 91 วัน

ตรวจผลการเกิดโรค 4 ครั้ง คือเมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 67, 77, 88 และ 98 วัน โดยการวัดแผลสูงสุดจากดินและความสูงของต้นข้าวในแต่ละกอ แล้วนำไปคำนวณความรุนแรงของโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล (% Relative lesion height) ตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยความสูงของแผล}}{\text{ค่าเฉลี่ยความสูงของต้น}} \times 100$$

ในตารางที่ 3.1 A แสดงให้เห็นว่าจากการตรวจผลครั้งแรก ในแบคทีเรียทั้ง 5 สูตร แบคทีเรียสูตร 1001 และ 1003 ให้ผลในการควบคุมโรคกาบใบแห้งดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ ก่อนข้างชัดเจน ในขณะที่สูตร F1 F2 และ Taiwan ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติจากกรรมวิธีเปรียบเทียบ ส่วนการตรวจผลครั้งที่ 2, 3 และ 4 แบคทีเรียทั้ง 4 สูตร รวมทั้ง Taiwan ให้ผลในการควบคุมโรคไม่แตกต่างกันภายในกลุ่มแต่ให้ผลดีกว่าการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease-check) ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูลผลผลิต (ตารางที่ 3.1 B) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ทางสถิติ ในด้านน้ำหนักเมล็ด แต่มีแนวโน้มที่สูตรต่างๆ ให้ผลดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease-check) เล็กน้อย ยกเว้น สูตร F1 ที่ให้ผลผลิตต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease-check) ซึ่งคาดว่าอาจเป็นผลอันมาจากความแปรปรวนของปัจจัยอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ ในด้านน้ำหนักแห้ง (biomass) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างสูตรต่างๆ และกรรมวิธีเปรียบเทียบ

ตารางที่ 3.1 A Relative lesion height (%) of rice sheath blight of antagonistic Bs.
Treatments on small plot tested, PathumThani Rice Research Center.
August-December 1997

Treatment	1 st observation		2 nd observation		3rd. observation		4th. observation	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
(T1) NO.1001	3	22.618 bc	5	32.443 b	3	33.258 b	2	50.550 b
(T2) NO.1003	2	20.380 b	4	32.035 b	4	35.978 b	6	55.205 b
(T3) F1	6	27.788 cd	6	34.342 b	6	39.947 b	4	51.702 b
(T4) F2	4	23.682 bcd	3	31.992 b	5	37.103 b	3	51.370 b
(T5) TW	5	25.780 bcd	2	26.487 b	2	31.250 b	5	51.728 b
(T6) CK1(DIS)	7	29.615 d	7	53.888 c	7	74.363 c	7	74.778 c
(T7) CK2 (NON-DIS)	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
Mean		21.409		30.170		35.985		47.905

ตารางที่ 3.1 B Yield and yield components of small plots test (August -December 1997)
Pathumthani Rice Research Center Weight expressed in grams per square
meter.

Treatment	Biomass (gms)		Grain weight. (gms)	
	Rank	Mean	Rank	Mean
T1 = NO.1001	5	908.907 a	5	407.425 ab
T2 = NO.1003	2	828.737 a	3	385.037 ab
T3 = F1	1	754.097 a	1	330.288 a
T4 = F2	4	893.250 a	4	385.367 ab
T5 = TW	7	1036.285 a	6	436.275 b
T6 = CK1(DIS))	3	861.382 a	2	364.650 ab
T7 = CK2(NON-DIS)	6	1023.630 a	7	437.427 b
Mean		900.899		392.353

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* สูตรในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในเรือนทดลอง (ครั้งที่ 3) ธันวาคม 2540 - เมษายน 2541

ปลูกข้าวพันธุ์ กข. 23 ในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว จำนวน 42 กระถาง วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 ซ้ำ ประกอบด้วยการใช้แบคทีเรียผสมสูตรต่างๆ 7 กรรมวิธีคือ

T1	=	สูตรผง	MK007	(207A)
T2	=	สูตรผง	MK007+B24	(207C)
T3	=	สูตรเหลว	MK007	(208)
T4	=	สูตรเหลว	MK007+B24	(209)
T5	=	Taiwan		
T6	=	Disease check		
T7	=	Non-disease check		

ปลูกเชื้อราโรคกาบใบแห้ง (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/แกลบ/รำ) เมื่อข้าวมีอายุ 63 วัน ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียตามกรรมวิธีต่างๆ จำนวน 3 ครั้ง คือเมื่อข้าวมีอายุได้ 70, 84 และ 98 วัน ตรวจสอบการเกิดโรคกาบใบแห้งหลังจากการปลูกเชื้อ 14 วัน (ข้าวอายุ 77 วัน) และติดตามการพัฒนาของโรคอีก 2 ครั้งเมื่อข้าวอายุได้ 91 และ 105 วัน ตรวจสอบการเกิดโรคกาบใบแห้ง โดยการวัดแผลสูงสุดจากดินและความสูงของต้นข้าวในแต่ละกระถาง แล้วนำไปคำนวณความรุนแรงของโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล

ผลการทดลอง (ตารางที่ 3.2) แสดงให้เห็นว่าจากการตรวจสอบผลครั้งแรก แบคทีเรียทั้ง 4 สูตร ให้ผลในการควบคุมโรคกาบใบแห้งแตกต่างกันเล็กน้อย และไม่แตกต่างกับการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease-check) แต่จากการตรวจสอบครั้งที่ 2 และ 3 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สูตรให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ให้ผลดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease-check) สรุป แบคทีเรียทั้ง 4 สูตร ในรูปผงและของเหลว ให้ผลในการควบคุมโรคกาบใบแห้งได้ดีในระดับเดียวกัน

ตารางที่ 3.2 Relative lesion height of sheath blight due to antagonistic Bs. Formulation on RD.23, in greenhouse test (III), sowing 8 Dec 97, Inoc. 9 Feb 98.

Application 1 :16 Feb 98, Observation 1 : 23 Feb 98

Application 2 :2 Mar 98, Observatiion 2 : 9 Mar 98

Application 3 :16 Mar 98, Observatiion 3 : 23 Mar 98

TABLE OF treatment (t) MEANS FOR relative lesion height (%)
(AVE. OVER 6 REPS)

Treatment	Observation 1 23 Feb 1998		Observation 2 9 March 1998		Observation 3 23 March 1998	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
207A	2	23.155 b	3	42.500 b	2	50.970 b
207C	6	27.547 bc	4	43.000 b	4	55.372 b
208	7	28.440 c	2	41.467 b	5	55.490 b
209	5	25.268 bc	6	43.333 b	3	54.438 b
TW	3	23.550 b	5	43.083 b	6	67.882 c
CK1(DIS)	4	24.862 bc	7	49.333 c	7	73.727 c
CK2(NON-DIS)	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
Mean		21.832		37.531		51.125

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* สูตรในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในเรือนทดลอง (ครั้งที่ 4) มกราคม - พฤษภาคม 2541

ปลูกข้าวพันธุ์ กข. 23 ในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว จำนวน 42 กระถาง วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 7 ซ้ำ ประกอบด้วยการใช้แบคทีเรียผสมสูตรต่างๆ 6 กรรมวิธีคือ

T1	=	สูตรผง	MK007+B24 (9841)
T2	=	สูตรผง	MK007+B24 (9842)
T3	=	สูตรเหลว	MK007+B24 (9843)
T4	=	สูตรเหลว	MK007+B24 (9844)
T5	=	Disease check	
T6	=	Non-disease check	

ปลูกเชื้อราโรคกาบใบแห้ง (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/เกลบ/รำ) เมื่อข้าวมีอายุ 73 วัน ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียตามกรรมวิธีต่างๆ จำนวน 3 ครั้ง คือเมื่อข้าวมีอายุได้ 80, 94 และ 108 วัน ตรวจสอบการเกิดโรคกาบใบแห้งหลังจากการปลูกเชื้อ 14 วัน และติดตามการพัฒนาของโรคอีก 3 ครั้งเมื่อข้าวอายุได้ 101, 108 และ 115 วัน ตรวจสอบการเกิดโรคกาบใบแห้ง โดยการวัดแผลสูงสุดจากดินและความสูงของต้นข้าวในแต่ละกระถาง แล้วนำไปคำนวณความรุนแรงของโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล

ผลการทดลอง (ตารางที่ 3.3) แสดงให้เห็นว่าจากการตรวจสอบผลครั้งแรก แบคทีเรียทั้ง 4 สูตร ให้ผลในการควบคุมโรคกาบใบแห้งได้ดีกว่าการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease-check) และแบคทีเรียสูตรเหลวคือ 9843 และ 9844 ให้ผลดีกว่าสูตรผงคือ 9841 และ 9842 แต่จากการตรวจสอบครั้งที่ 3 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สูตรให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามสูตรเหลว 9843 ให้ผลในการควบคุมโรคดีที่สุด

ตารางที่ 3.3 Relative lesion height of sheath blight due to antagonistic Bs. formulations on RD.23, in greenhouse test (IV), sowing 20 Jan 98, Inoc. 3 Apr 98.

Application 1 :10 Apr 98, Observation 1 : 17 Apr 98

Application 2 :24 Apr 98, Observation 2 : 1 May 98

Application 3 :7 May 98, Observation 3 : 15 May 98

TABLE OF treatment (t) MEANS FOR relative lesion height (%)

(AVE. OVER 6 REPS)

Treatment	Observation 1 17 Apr 98		Observation 2 1 May 1998		Observation 3 15 May 98	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
9841	4	16.143 c	4	16.260 bc	3	31.167 b
9842	5	16.727 c	5	17.621 c	5	32.871 b
9843	2	12.744 b	2	14.881 b	2	30.156 b
9844	3	13.909 b	3	15.547 b	4	31.210 b
ck1(dis)	6	18.803 d	6	23.326 d	6	37.166 c
ck2 (non-dis)	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
Mean		13.054		14.606		27.095

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพ *Bacillus subtilis* สูตรต่างๆ ในการควบคุมโรคกาบใบแห้ง ในนาแปลงเล็ก (ครั้งที่ 3) กุมภาพันธ์ - พฤษภาคม 2541

ปักดำข้าวพันธุ์ กข. 23 อายุ 22 วันในแปลงย่อยขนาด 4X7 เมตร จำนวน 24 แปลง
วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ ประกอบด้วยการใช้แบคทีเรียผสมสูตรต่างๆ 6 กรรม
วิธี

T1	=	สูตรผง	MK007+B24 (9841)
T2	=	สูตรผง	MK007+B24 (9842)
T3	=	สูตรเหลว	MK007+B24 (9843)
T4	=	สูตรเหลว	MK007+B24 (9844)
T5	=	Disease check	
T6	=	Non-disease check	

เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 66 วันปลูกเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งโดยการหุ้มก้อนเชื้อ
(ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/แกลบ/รำนึ่ง) ด้วยกระดาษฟางหุ้มด้วยมุ้งลวดกันหนู สอดลงในกอข้าว
ที่สุ่มทำเครื่องหมายไว้จำนวน 20 กอต่อแปลงต่อจากนั้นฉีดพ่นเชื้อสูตรต่างๆ 3 ครั้ง เมื่อต้น
ข้าวมีอายุได้ 72, 86 และ 100 วัน

ผลการทดลอง จากการตรวจผล 3 ครั้ง คือเมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 79 100 และ
107 วัน โดยการวัดแผลสูงสุดจากดินและความสูงของต้นข้าวในแต่ละกอ แล้วนำไปคำนวณ
ความรุนแรงของโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล

ในตารางที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่าจากการตรวจผลครั้งแรก แบคทีเรียทั้ง 4 สูตร ให้ผล
ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้ผลดีกว่าการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรีย
ในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease-check) และแบคทีเรียสูตรเหลวคือ 9843 และ 9844 ให้ผลให้
ผลดีกว่าสูตรผงคือ 9841 และ 9842 จากการตรวจผลครั้งที่ 2 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สูตรแม้จะ
มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าแบคทีเรียสูตรเหลว 2 สูตรคือ 9843 และ 9844 ให้ผลดี
ในการควบคุมโรคดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ ซึ่งจากการตรวจผลเพียง 2 ครั้งนี้ให้ผลไปใน
ทางเดียวกันกับการทดลองในเรือนทดลองครั้งที่ 4

ตารางที่ 3.4 Relative lesion height of sheath blight due to antagonistic Bs. formulations on RD.23, in small plots test (III), sowing 17 Feb 98, Inoc. 24 Apr 98.

Application 1 :30 Apr 98, Observation 1 : 7 May 98

Application 2 :14 May 98, Observation 2 : 21 May 98

Application 3 :28 May 98, Observation 3 : 04 June 98

TABLE OF treatment (t) MEANS FOR relative lesion height (%)

(AVE. OVER 6 REPS)

Treatment	Observation 1 7 May 98		Observation 2 21 May 1998		Observation 3 04 June 98	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
9841	4	24.610 b	4	35.665 bc	3	50.832 b
9842	5	26.702 b	5	37.418 bc	4	50.945 b
9843	2	22.148 b	3	32.780 b	5	55.820 b
9844	3	22.855 b	2	32.765 b	2	46.770 b
ck1(dis)	6	32.307 c	6	39.127 c	6	56.820 b
ck2(non-dis)	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
Mean		21.437		29.626		43.531

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

4. การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis*

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* สูตรต่างๆ ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในนาแปลงเล็ก(ครั้งที่ 3) กุมภาพันธ์ - มิถุนายน 2541

ปักดำข้าวพันธุ์ กข.23 อายุ 22 วันในแปลงย่อยขนาด 4X7 เมตร จำนวน 24 แปลง
วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี

T1 = 9841

T2 = 9842

T3 = 9843

T4 = 9844

T5 = Disease check

T6 = Non-disease check

เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 66 วันปลูกเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งโดยการหุ้มก้อนเชื้อ (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/ แกลบ/รำ นึ่ง) ด้วยกระดาษฟางหุ้มด้วยมุ้งลวดกันหนู สอดลงในกอข้าวที่สุ่มทำเครื่องหมายไว้จำนวน 20 กอต่อแปลงต่อนั้นฉีดพ่นเชื้อสูตรต่างๆ 3 ครั้ง เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 72, 86 และ 100 วัน

ผลการทดลอง จากการตรวจผล 2 ครั้ง คือเมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 79 และ 100 วัน โดยการวัดแผลสูงสุดจากดินและความสูงของต้นข้าวในแต่ละกอ แล้วนำไปคำนวณความรุนแรงของโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล (% Relative lesion height) ตามสูตร

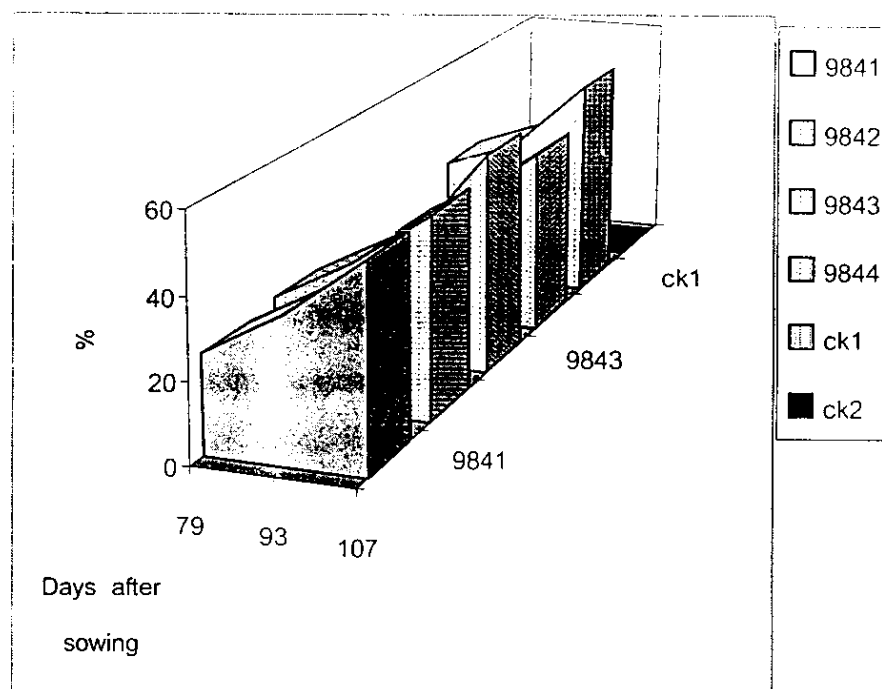
ในตารางที่ 4.1A แสดงให้เห็นว่าจากการตรวจผลครั้งแรก แบคทีเรียทั้ง 4 สูตร ให้ผลในการควบคุมโรคกาบใบแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้ผลดีกว่าการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease -check) และแบคทีเรียสูตรน้ำคือ 9843 และ 9844 ให้ผลดีกว่าสูตรผงคือ 9841 และ 9842 จากการตรวจผลครั้งที่ 2 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สูตรแม้จะมีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าแบคทีเรียสูตรน้ำ 2 สูตรคือ 9843 และ 9844 ให้ผลดีในการควบคุมโรคดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ ซึ่งตรวจผลเพียง 2 ครั้งนี้ให้ผลไปในทางเดียวกันกับการทดลองในเรือนทดลองครั้งที่ 4 ส่วนการตรวจผลครั้งที่ 3 ความสูงของโรคได้พัฒนาไปจนการยับยั้งจากแบคทีเรียทั้ง 4 สูตร ไม่มีความแตกต่างไปจากข้าวที่ไม่มีแบคทีเรียควบคุม (disease check) แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาของโรคได้สูงขึ้นในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ของข้าว โดยพิจารณาจากความชันที่แตกต่างในอัตราการพัฒนาของแผลของสูตรต่างๆ ในรูปที่ 1 ซึ่งได้จากการกำหนดจุดค่าเฉลี่ย relative lesion height ของสูตรต่างๆ ลงบนแกนอายุของข้าว (จุดเวลาที่ตรวจผล 3 ครั้ง)

ตารางที่ 4.1B Relative lesion height of sheath blight due to antagonized by different formulation of Bs February - June 1998.

Treatment	Observation 1 7 May 98		Observation 2 21 May 1998		Observation 3 04 June 98	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
9841	4	24.610 b	4	35.665 bc	3	50.832 b
9842	5	26.702 b	5	37.418 bc	4	50.945 b
9843	2	22.148 b	3	32.780 b	5	55.820 b
9844	3	22.855 b	2	32.765 b	2	46.770 b
ck1(dis)	6	32.307 c	6	39.127 c	6	56.820 b
ck2(non-dis)	1	0.000 a	1	0.000 a	1	0.000 a
Mean		21.437		29.626		43.531

In a column, means followed by a common letter

Relative lesion height progress curve due to different
Bs.formulation



จากเส้นการพัฒนาของโรคตามอายุของข้าวที่นำมาสรุปเป็นค่าพื้นที่ใต้เส้น (area under disease progress curve) ในตารางที่ 4.1B จะพบความแตกต่างในพื้นที่ใต้เส้น หรืออีกนัยหนึ่งคือค่าสะสมของ relative lesion height จากน้อยถึงมากคือ ข้าวไม่เป็นโรค (non-disease check) สูตร 9844 9843 9841 9842 และที่ไม่ใช่เชื้อแบคทีเรีย (disease check) ตามลำดับ แต่เนื่องจากเป็นค่าสรุปจากค่าเฉลี่ยของ relative lesion height จึงไม่มีค่ายืนยันทางสถิติถึงความแตกต่าง

ในช่องการเปรียบเทียบน้ำหนักเมล็ดต่อไร่ของแต่ละสูตร ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติกับข้าวที่ไม่ใช่เชื้อแบคทีเรีย แต่จากค่าเฉลี่ยพบความแตกต่างในน้ำหนักเมล็ดระหว่างข้าวที่ใช้เชื้อกับไม่ใช่เชื้อแบคทีเรียในลำดับที่สอดคล้องกับค่าพื้นที่ใต้เส้น (area under disease progress curve) คือกลุ่มที่ใช้เชื้อแบคทีเรียมีค่าพื้นที่ต่ำกว่า จะได้น้ำหนักเมล็ดสูงกว่าในข้าวที่ไม่ใช่เชื้อแบคทีเรีย เช่นเดียวกับความสอดคล้องในอัตราเมล็ดลิบที่ได้ (%) ในกลุ่มที่ใช้เชื้อแบคทีเรียจะมีอัตราเมล็ดลิบต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้เชื้อแบคทีเรีย ความแตกต่างนัยทางสถิติไม่ปรากฏ เนื่องจากความแปรปรวนในการทดลองสูง โดยสาเหตุจากความแตกต่างของพื้นที่ซึ่งหลีกเลี่ยงได้ยาก

ตารางที่ 4.1B Grain weight and empty grain of RD23, obtained from different antagonistic Bs Formulation controlling sheath blight (area under disease progress curve), February - June 1998.

Treatment	AUDPC		Grain weight Kgs/rai		empty grain %	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
9841	4	1027.40	4	652.470 a	2	0.100 a
9842	5	1067.38	5	703.258 a	4	0.122 a
9843	3	1004.70	2	592.328 a	5	0.127 a
9844	2	946.09	3	625.620 a	3	0.105 a
ck1(dis)	6	1171.67	1	558.093 a	6	0.135 a
ck2(non-dis)	1	0.00	6	745.578 a	1	0.088 a
Mean				646.224		0.113

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* สูตรในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในเรือนทดลอง (ครั้งที่ 5) สิงหาคม - ตุลาคม 2541

ปลูกข้าวพันธุ์ กข.23 ในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว จำนวน 40 กระถาง วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 10 ซ้ำ 4 กรรมวิธีคือ

T1 = BS24 + MK 007 ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml

T2 = BS24 + MK 007 ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml

T3 = MK 007 ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml

T4 = Disease check

ปลูกเชื้อราโรคกาบใบแห้ง (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/เกลบ/รำ) เมื่อข้าวมีอายุ 60 วัน ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียตามกรรมวิธีต่างๆ จำนวน 3 ครั้ง คือเมื่อข้าวมีอายุได้ 64, 78 และ 92 วัน ตรวจผลการเกิดโรคกาบใบแห้งหลังจากการฉีดพ่นเชื้อ 7 วัน คือเมื่อข้าวอายุได้ 71 วัน และติดตามการพัฒนาของโรคอีก 2 ครั้งเมื่อข้าวอายุได้ 85 และ 99 วัน

การตรวจผลการเกิดโรคกาบใบแห้ง ใช้วิธีการวัดแผลสูงสุดจากดินและความสูงของต้นข้าวในแต่ละกระถาง แล้วนำไปคำนวณความรุนแรงของโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล (% Relative lesion height) ตามสูตร

ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าจากการตรวจผลครั้งแรก แบคทีเรียสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 ให้ผลในการควบคุมโรคกาบใบแห้งได้ดีกว่าการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (disease-check) ขณะที่แบคทีเรียสูตรที่ 3 ให้ผลเท่ากับการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียในกรรมวิธีเปรียบเทียบ แต่จากการตรวจผลครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 พบว่าให้ผลไปในทางเดียวกันคือแบคทีเรียทั้ง 3 สูตรให้ผลในการควบคุมโรคกาบใบแห้งดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเรียงลำดับจากกรรมวิธีที่ 1 คือ BS24 + MK007 10^7 cfu/ml ให้ผลดีที่สุดรองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 คือ BS24 + MK007 10^6 cfu/ml และกรรมวิธีที่ 3 คือ MK007 10^6 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 Relative lesion height of sheath blight due to antagonized by different concentration formulation of Bs

Treatment	1 st observation 18 Aug. 98		2 nd observation 1 Sept. 98		3 rd observation 15 Sept. 98	
	Rank	Means	Rank	Mean	Rank	Mean
t1(24+007)10-7	1	23.226 a	1	30.430 a	1	33.570 a
t2 (24+007)10-6	3	26.414 b	2	40.564 b	2	49.153 b
t3 (007)10-6	2	27.462 bc	3	43.564 b	3	57.795 c
t4 (dis-chk)	4	29.364 c	4	53.293 c	4	71.593 d
Mean		26.617		41.963		53.028

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* สูตรเลข 2 สูตร ในการควบคุมโรคกาบใบแห้ง ในนาแปลงใหญ่ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ฤดูนาปี 2541 (สิงหาคม-พฤศจิกายน 2541) ปลูกร่วมพันธุ์ กข. 23 วันที่ 1 สิงหาคม 2541 เมื่อข้าวอายุ 23 วัน นำไปปักดำในแปลง ขนาด 25x33 เมตร (=825 ตารางเมตร) จำนวน 3 แปลง

แปลงที่ 1 สำหรับทดสอบแบคทีเรียสูตร A ($MK007+BS24 = 10^7$ cfu/ml)

แปลงที่ 2 สำหรับทดสอบแบคทีเรียสูตร B ($MK007 = 10^7$ cfu/ml)

แปลงที่ 3 แปลงเปรียบเทียบเป็นโรค (diseased check)

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 60 วัน (30 ก.ย.41) ปลูกร่วมเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้ง (*R. solani*) โดยการห่มก้อนเชื้อ (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/แกลบ/รำ นึ่ง) ด้วยกระดาษฟาง สอดลงในกอข้าว ที่สุ่มทำเครื่องหมายไว้จำนวน 192 กอต่อแปลง ทั้ง 3 แปลง

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 67 วัน (7 ต.ค.41) ต้องปลูกร่วมเชื้อซ้ำอีกเพราะหนูกินก้อนเชื้อในนาที่ สอดไว้ในกอข้าวเป็นจำนวนมาก ปลูกร่วมเชื้อซ้ำโดยห่มก้อนเชื้อด้วยกระดาษฟางและมุ้งลวด

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 72 วัน (12 ต.ค.41) ฉีดพ่นเชื้อสูตร A และ สูตร B ครั้งแรกในแปลงที่ 1 และ 2 ตามลำดับ โดยใช้เชื้อสูตรเหลว A และ B ผสมน้ำ 1:100 ส่วน ในอัตรา 80 ลิตร/ไร่ (=40 ลิตรต่อแปลง) ฉีดพ่นด้วยเครื่อง mist blower

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 79 วัน (19 ต.ค.41) ตรวจผลการเกิดโรคครั้งที่ 1 โดยการวัดความสูงของแผลโรคกาบใบแห้งและความสูงของกอข้าวจากระดับพื้นดิน เลือกตรวจโรค 1 แถว เว้น 1 แถว และในแต่ละแถวตรวจ 1 กอ เว้น 1 กอ รวมทั้งสิ้น 48 กอต่อแปลง ในแต่ละกอที่ตรวจวัดได้ทำแผนที่การแพร่ระบาดของโรคจากกอที่เริ่มต้นปลูกเชื้อไปยังกอใกล้เคียงรอบๆ เพื่อเป็นข้อมูล ปริมาณการเกิดโรค (disease incidence) นอกเหนือจากค่าความรุนแรงของโรค (disease severity) ซึ่งได้จากการนำความสูงของแผลและความสูงของต้นข้าวมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล (%relative lesion height)

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 86 วัน (26 ต.ค. 41) ฉีดพ่นเชื้อสูตร A และ B ครั้งที่ 2 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นจาก 1:100 เป็น 1:50 ในปริมาณ 40 ลิตรต่อแปลงเท่าเดิม

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 94 วัน (3 พ.ย. 41) ตรวจการเกิดโรคครั้งที่ 2 ในกอเดิมและบันทึกการแพร่ระบาดในกอข้างเคียงเพิ่มเติม

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 101 วัน (10 พ.ย. 41) ฉีดพ่นเชื้อสูตร A และ B ครั้งที่ 3 ความเข้มข้นและปริมาณ เท่ากับการฉีดพ่นครั้งที่ 2

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 108 วัน (17 พ.ย. 41) ตรวจผลการเกิดโรคครั้งที่ 3 เป็นครั้งสุดท้าย วิธีการเช่นเดียวกัน

เก็บเกี่ยวข้าวทั้งแปลงเมื่อข้าวอายุได้ 116 วัน (25 พ.ย.41) นวด ชั่งน้ำหนักผลผลิต และวัดความชื้น ข้อมูลผลผลิตเปรียบเทียบแต่ละแปลงกำลังประมวลผล

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ % relative lesion height และ cumulative area under disease progress curve แสดงไว้ในตารางที่ 4.3A และ 4.3B ตามลำดับ ข้อมูลผู้ผลิตเปรียบเทียบแต่ละแปลงประมวลผลดังในตารางที่ 4.3C

ตารางที่ 4.3A Pair comparison among treatment mean of rice sheath blight relative lesion height due to different Bs formulation, Rd.23 variety, big field trial, Pathumtani rice research center, Sowing 1 August 98, harvested 25 November 98.

	Treatment	Mean	Treatment	Mean	Treatment	Mean
1 st obs.. 79 DAS	A	45.401	A	45.401	B	45.325
	B	45.325	Ck	49.082	Ck	49.082
	difference	0.076		-3.681		-3.757
	t=0.0482	ns	t=-2.305	sig.	t=-3.274	sig.
2 nd obs.. 94 DAS	A	68.5	A	68.5	B	68.02
	B	68.02	Ck	70.479	Ck	70.479
	difference	0.48		-1.979		-2.459
	t=0.304	ns	t=-1.391	ns	t=-1.616	ns
3 rd obs.. 108 DAS	A	75.132	A	75.132	B	74.36
	B	74.36	Ck	81.334	Ck	81.334
	difference	0.772		-6.202		-6.974
	t=0.398	ns	t=-3.524	sig.	t=-3.941	sig.

pair comparison between treatment means are significant different by t-test ,at α 0.05 (table)

degree of freedom 47 =2.411 A= (MK007+BS24 = 10^7 cfu/ml) B = (MK007 = 10^7 cfu/ml)

ตารางที่ 4.3B Cumulative of rice sheath blight in value of area under disease progress curve among different treatment of Bs formulation.

DAS	A	B	Ck
79	45.401	45.325	49.082
94	68.5	68.02	70.479
108	75.132	74.36	81.0334
AUDPC	1859.682	1846.748	1959.399

ตารางที่ 4.3C Grain weight obtained from plots of different treatment of Bs. fomulation, Rd.23 variety, big field trial, Pathumtani rice research center, Sowing 1 August 98, harvested 25 November 98.

	Treatment	Mean	Treatment	Mean	Treatment	Mean
grain wt. (Kgs./rai)	A	702.51	A	702.51	B	646.16
	B	646.16	Ck	606.89	Ck	606.89
	difference	56.35		95.62		39.27
	t=6.279	sig.	t=3.1394	sig.	t=1.3425	ns

สรุปผลการทดลองในแปลงนาขนาดใหญ่ ณ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

พบว่าเชื้อ BS สูตร A ให้ผลในการควบคุมโรคกาบใบแห้งได้ผลดีที่สุดให้ผลเฉลี่ย 702.51 กก./ไร่ ขณะที่ BS สูตร B สามารถยับยั้งอาการแผลได้ดีกว่าแปลงไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์แต่ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ

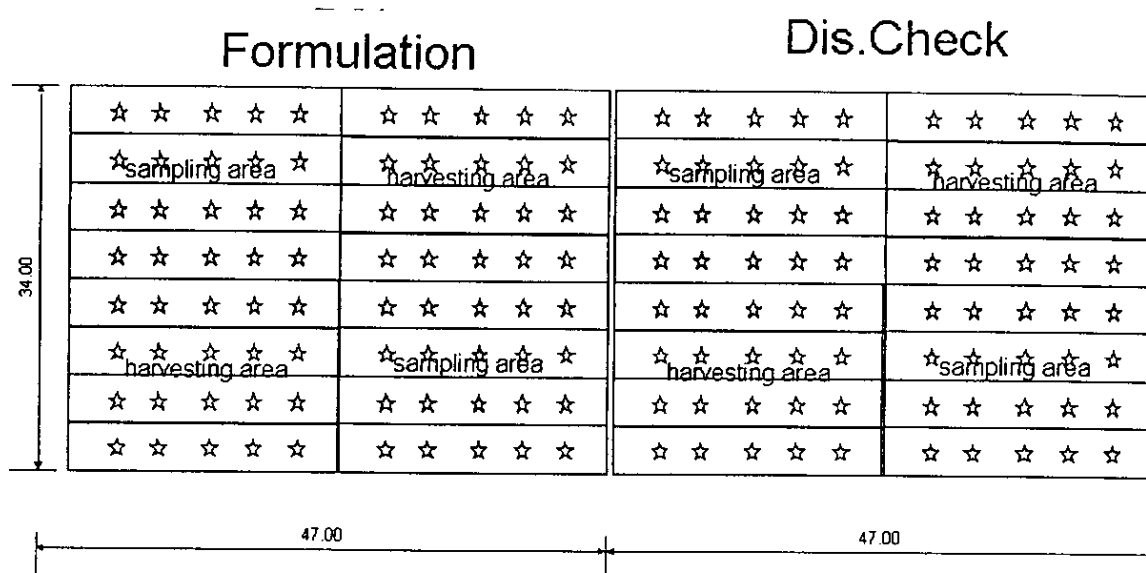
4.4 การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* สูตรเหลว 1 สูตร ในนาแปลงใหญ่ของเกษตรกร (มกราคม - เมษายน 2542)

ทดลองในแปลงนาพื้นที่ 2 ไร่ที่หว่านข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 ของเกษตรกร คลอง 6 อ. รัษฎา จ.ปทุมธานี โดยแบ่งออกเป็น 2 แปลงๆละ 1 ไร่ แปลงที่ 1 สำหรับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย แปลงที่ 2 ไม่พ่นเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อต้นข้าวอายุ 57 วัน (2 ก.พ. 42) ปลุกเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้ง (*R. solani*) โดยการห่มก้อนเชื้อ (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/แกลบ/รำนึ่ง) ด้วยกระดาษฟางสอดลงในกอข้าวที่สุ่มทำเครื่องหมายไว้จำนวน 160 กอในพื้นที่ 2 ไร่

เมื่อต้นข้าวอายุ 60 วัน (5 ก.พ. 42) พ่นเชื้อแบคทีเรียครั้งที่ 1 ในแปลงที่ 1 โดยนำเชื้อแบคทีเรียสูตรเหลวมาทำให้เจือจาง 100 เท่า พ่นในอัตรา 80 ลิตร /ไร่ และพ่นน้ำเปล่าในแปลงที่ 2 ในปริมาณเท่ากันคือ 80 ลิตร /ไร่

เมื่อต้นข้าวอายุ 67 วัน (12 ก.พ. 42) ตรวจการเกิดโรคกาบใบแห้งในแปลงที่ 1 และ 2 โดยแบ่งแปลงที่ 1 ออกเป็น 4 ซ้ำแต่ละซ้ำแบ่งเป็น 2 แปลงเล็กเท่าๆกัน (twin plots) โดยแปลงเล็กแปลงหนึ่งของแต่ละซ้ำเก็บไว้เป็นแปลงสำหรับเก็บเกี่ยวไม่เข้าไปตรวจโรคเพื่อไม่ให้ผลผลิตถูกรบกวน (ดูแผนผังแปลง)



ตรวจการเกิดโรคในส่วนของ 2 แปลงเล็กที่เหลือ จำนวน 25 กอต่อแปลงรวม 50 กอ (2 ซ้ำ) ทำเช่นเดียวกันนี้กับแปลงที่ 2 ที่ไม่พ่นเชื้อแบคทีเรีย หรือแปลงเปรียบเทียบ

เมื่อต้นข้าวอายุ 74 วัน (19 ก.พ. 42) พ่นเชื้อแบคทีเรียครั้งที่ 2 ในแปลงที่ 1 และพ่นน้ำเปล่าในแปลงที่ 2

เมื่อต้นข้าวอายุ 80 วัน (25 ก.พ. 42) ตรวจการเกิดโรคกาบใบแห้งในแปลงที่ 1 และ 2 เฉพาะในแปลงเล็ก 4 แปลงเช่นเดียวกับการตรวจครั้งที่ 1

เมื่อต้นข้าวอายุ 88 วัน (5 มี.ค. 42) พ่นเชื้อแบคทีเรียครั้งที่ 3 ในแปลงที่ 1 และพ่นน้ำเปล่าในแปลงที่ 2

เมื่อเมื่อต้นข้าวอายุ 95 วัน (12 มี.ค.42) และ 102 วัน (19 มี.ค.42) ตรวจการเกิดโรคกาบใบแห้งในแปลงที่ 1 และ 2 เฉพาะในแปลงเล็ก 4 แปลงเช่นเดียวกับการตรวจครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

ผลการตรวจการพัฒนาของโรคกาบใบแห้งเปรียบเทียบระหว่างแปลงที่ 1 ซึ่งพ่นเชื้อแบคทีเรียกับแปลงที่ 2 ซึ่งเป็นแปลงเปรียบเทียบ แสดงไว้ในตาราง 4.4A และ ตาราง 4.4B

ตารางที่ 4.4A Comparison between treatment mean of rice sheath blight relative lesion height due to Bs. Application and non-application, SPR1 variety, farmer's field field trial, Klong 6 Pathumtani , January - April 1999.

1 st observation 12 Feb 99 (67 DAS)		2 nd observation 25 Feb 99 (80 DAS)		3 rd observation 12 Mar 99 (95 DAS)	
Treatment	Mean	Treatment	Mean	Treatment	Mean
Bs	24.98	Bs	47.11	Bs	63.63
Ck	25.40	Ck	43.49	Ck	57.99
difference	-0.307	difference	3.62	difference	6.04
t=0.0482	ns	t=-2.1159	ns	t=2.2503	sig

ตารางที่ 4.4B Comparison between treatment mean of rice sheath blight relative lesion height due to Bs. Application and non-application, SPR1 variety, farmer's field field trial, Klong 6 Pathumtani, January - April 1999. Data collection on the 4th Observation, comparing result from sampling plots and harvesting plots.

4 th observation 19 Mar 99 (102 DAS)			
sampling plot		harvesting plot	
Treatment	Mean	Treatment	Mean
Bs	64.61	Bs	70.30
Ck	62.69	Ck	67.82
difference	1.92	difference	2.48
t=0.4426	ns	t=2.2503	ns

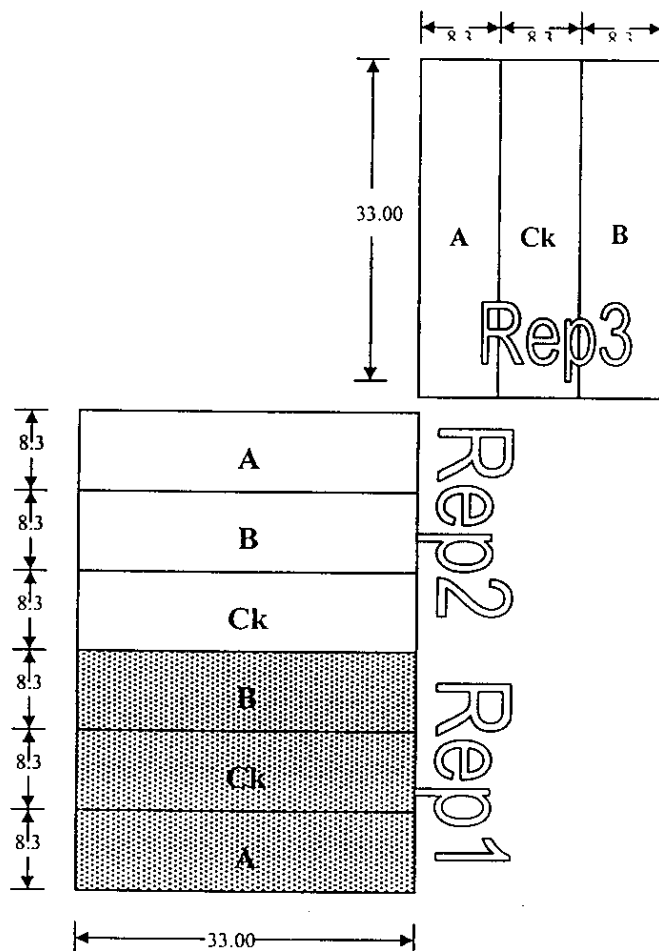
เมื่อข้าวอายุได้ 120 วัน เก็บเกี่ยวผลผลิตในแปลงทดลองที่ 1 และ 2 ในส่วนที่ไม่มี การรบกวนผลผลิต โดยในแปลงใหญ่แต่ละแปลงเก็บเกี่ยวใน 4 แปลงย่อยขนาด 1/8 ไร่ (200 ตารางเมตร) เปรียบเทียบผลผลิตระหว่างกรรมวิธีที่พ่นเชื้อแบคทีเรีย และไม่พ่นเชื้อแบคทีเรีย ที่ระดับความชื้น 14% ผลปรากฏว่าผลผลิต (ตารางที่ 4.4C) ในแปลงที่ไม่พ่นเชื้อแบคทีเรีย หรือแปลงเปรียบเทียบถึงแม้ไม่แตกต่างจากแปลงที่พ่นเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.4B แต่ก็สูงกว่า ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับระดับความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งในทั้งสองแปลง

ตารางที่ 4.4C Comparison between treatment mean of grain weight obtained due to Bs application and non-application, SPR1 variety, farmer's field field trial, Klong 6 Pathumtani , January - April 1999.

Grain weight Kgs/rai	
Treatment	Means
Bs	749.44
Ck	805.19
difference	-55.75
t=1.5764	ns

สรุปผลการทดสอบในแปลงนาขนาดใหญ่ ณ.แปลงนาราชบุรี คลอง 6 ปทุมธานีพบว่า เชื้อ BS สูตรเดี่ยว (007) ไม่สามารถยับยั้งอาการแผลได้ เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่ไม่ใส่เชื้อ BS และให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ

4.5 การทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* สูตรเลข 2 สูตร ในการควบคุมโรคกาบใบแห้ง
ในนาแปลงใหญ่ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ฤดูนาปรัง 2542 (กุมภาพันธ์ - มิถุนายน
2542)



ปลูกข้าวพันธุ์ กข.23 วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2542 เมื่อข้าวอายุ 23 วันนำไปปักดำใน 3
block แต่ละ block (replication) แบ่งเป็นแปลงย่อยขนาด 8.3x33 เมตร (ประมาณ 1/6 ไร่)
จำนวน 3 แปลง

แปลงที่ 1 สำหรับทดสอบแบคทีเรียสูตร A

แปลงที่ 2 สำหรับทดสอบแบคทีเรียสูตร B

แปลงที่ 3 แปลงเปรียบเทียบเป็นโรค (diseased check)

$$A = (MK007 + BS24 = 10^7 \text{ cfu/ml}) \quad B = (MK007 = 10^7 \text{ cfu/ml})$$

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 67 วัน (20 เม.ย. 42) ปลุกเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้ง (*R. solani*) โดยการห่มก้อนเชื้อ (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/แกลบ/รำนึ่ง) ด้วยกระดาษฟาง สอดลงในกอข้าวที่สุ่มทำเครื่องหมายไว้จำนวน 16 กอต่อแปลง รวมทั้งหมดเป็น 144 กอ

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 70 วัน (23 เม.ย. 42) ฉีดพ่นเชื้อสูตร A และสูตร B ครั้งแรกตามแปลงที่ 1 และ 2 ตามลำดับ โดยใช้เชื้อสูตรเหลว A และ B ผสมน้ำ 1:100 ส่วน ในอัตรา 80 ลิตร/ไร่ (= 14 ลิตรต่อแปลง) ส่วนแปลงเปรียบเทียบเป็นโรค (diseased check) พ่นน้ำในอัตราเดียวกัน การฉีดพ่นทำโดยเครื่อง mist blower

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 77 วัน (30 เม.ย. 42) ตรวจผลการเกิดโรคครั้งที่ 1 โดยการวัดความสูงของแผลโรคกาบใบแห้งและความสูงของกอข้าวจากระดับพื้นดิน โดยตรวจโรคในกอที่ปลุกเชื้อโรคกาบใบแห้งไว้ 16 กอต่อแปลง ความรุนแรงของโรค (disease severity) ซึ่งได้จากการนำความสูงของแผลและความสูงของต้นข้าวมาคำนวณ เปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล (% relative lesion height)

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 84 วัน (7 พ.ค. 42) ฉีดพ่นเชื้อสูตร A และ B ครั้งที่ 2 โดยใช้เชื้อสูตรเหลว A และ B ผสมน้ำ 1:100 ส่วน ในอัตรา 80 ลิตรต่อไร่ (= 14 ลิตรต่อแปลง) และน้ำในแปลงเปรียบเทียบเช่นเดิม

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 94 วัน (17 พ.ค. 42) ตรวจการเกิดโรคครั้งที่ 2 ในกอเดิม

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 98 วัน (21 พ.ค. 42) ฉีดพ่นเชื้อสูตร A และ B ครั้งที่ 3 โดยใช้เชื้อสูตรเหลว A และ B ผสมน้ำ 1:100 ส่วน ในอัตรา 80 ลิตรต่อไร่ (= 14 ลิตรต่อแปลง) และน้ำในแปลงเปรียบเทียบเช่นเดิม

เมื่อต้นข้าวอายุได้ 105 วัน (28 พ.ค. 42) ตรวจผลการเกิดโรคครั้งที่ 3 เป็นครั้งสุดท้าย วิธีการเช่นเดียวกัน

เก็บเกี่ยวข้าวทั้งแปลงเมื่อข้าวอายุได้ 118 วัน (10 มิ.ย. 42) นวด ชั่งน้ำหนักผลผลิต และวัดความชื้น ข้อมูลผลผลิตเปรียบเทียบแต่ละแปลงกำลังประมวลผล

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ % relative lesion height แสดงไว้ในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 Comparison among treatment mean of rice sheath blight relative lesion height and grain weight due to different Bs. Formulation, Rd.23 variety, big field trial, Pathumtani rice research center, Sowing 12 February 99.

	Treatment	Mean	Treatment	Mean	Treatment	Mean
30 April 99 1 st obs. 77 DAS	A	29.11	A	29.11	B	29.38
	B	29.38	Ck	32.06	Ck	32.06
	difference	-0.27		-2.95		-2.60
	t=-0.1673	ns	t=-1.6629	ns	t=-1.8965	ns
17 May 99 2 nd obs. 94 DAS	A	37.08	A	37.08	B	39.22
	B	39.22	Ck	43.32	Ck	43.32
	difference	-2.14		-6.24		-4.1
	t=-0.7835	ns	t=-1.6629	Sig.	t=-1.8965	ns
28 May 99 3 rd obs. 105 DAS	A	46.41	A	46.41	B	48.51
	B	48.51	Ck	57.26	Ck	57.26
	difference	-2.10		-10.85		-4.1
	t=-1.3704	Ns	t=-3.9041	Sig.	t=-2.8549	Sig.
Grain Weight (Kgs/rai)	A	591.00	A	591.00	B	522.67
	B	522.67	Ck	512.67	Ck	512.67
	difference	68.33		78.33		10.00
	t=-3.5778	Sig.	t=-3.7273	Sig.	t=-1.3859	ns

A = (MK007+BS24 = 10^7 cfu/ml) B = (MK007 = 10^7 cfu/ml)

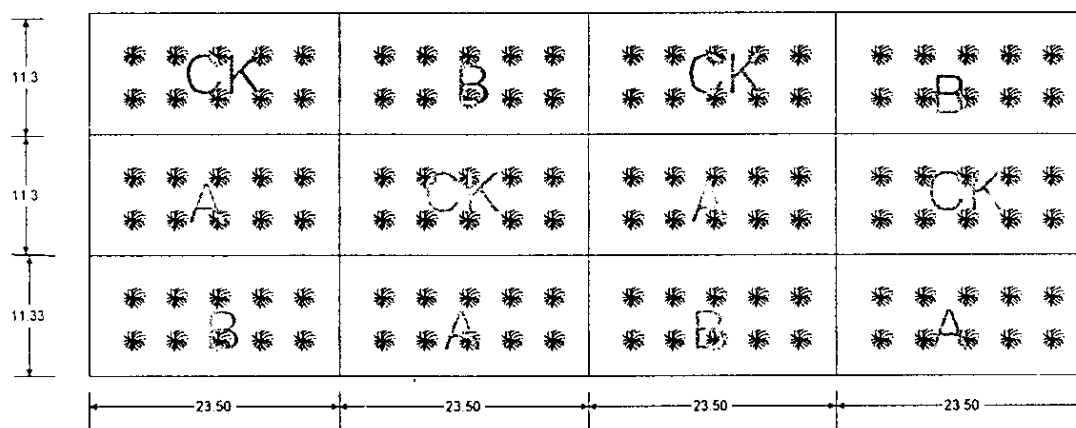
4.6 การทดสอบประสิทธิภาพ *Bacillus subtilis* สูตรเลข 2 สูตร ในนาแปลงใหญ่ (เมษายน-สิงหาคม 2542)

ทดลองในแปลงนาพื้นที่ 2 ไร่ที่หว่านข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 ของเกษตรกรคลอง 6 อ. รัษฎา จ. ปทุมธานี โดยแบ่งออกเป็น 4 block block ละ 1/2 ไร่ ในแต่ละ block แบ่งเป็นแปลงย่อย 3 แปลง ขนาด 1/6 ไร่ แปลงที่ 1 สำหรับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียสูตร A แปลงที่ 2 สำหรับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียสูตร B และแปลงที่ 3 ไม่พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Ck) แผนการทดลองแบบ randomized complete block 3 ซ้ำ

เมื่อต้นข้าวอายุ 60 วัน (22 มิ.ย. 42) ปลุกเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้ง (*R. solani*) โดยการห่มก้อนเชื้อ (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/แกลบ/รำ นึ่ง) ด้วยกระดาษฟางสอดลงในกอข้าวที่สุ่มทำเครื่องหมายไว้จำนวน 10 กอในแต่ละแปลงย่อย (พื้นที่ 1/6 ไร่)

เมื่อต้นข้าวอายุ 63 วัน (25 มิ.ย. 42) พ่นเชื้อแบคทีเรียครั้งที่ 1 ในแปลงที่ A และ B โดยนำเชื้อแบคทีเรียสูตรเลขมาทำให้เจือจาง 100 เท่า พ่นในอัตรา 80 ลิตร/ไร่ และพ่นน้ำเปล่าในแปลง Ck ในปริมาณเท่ากันคือ 80 ลิตร/ไร่

เมื่อต้นข้าวอายุ 70 วัน (2 ก.ค. 42) ตรวจสอบการเกิดโรคกาบใบแห้งในแต่ละแปลงย่อย A



B และ Ck ในทั้ง 3 block (ซ้ำ) (ดูแผนผังแปลง)

ตรวจการเกิดโรค จำนวน 10 ก่อต่อแปลง ในทั้ง 3 กรรมวิธีคือ A B และ Ck รวม 120 กอ (3 ซ้ำ)

เมื่อต้นข้าวอายุ 77 วัน (9 ก.ค. 42) พ่นเชื้อแบคทีเรียครั้งที่ 2 ในแปลงที่ A และ B โดยนำเชื้อแบคทีเรียสูตรเหลวมาทำให้เจือจาง 100 เท่า พ่นในอัตรา 80 ลิตร/ไร่ และพ่นน้ำเปล่าในแปลง Ck ในปริมาณเท่ากันคือ 80 ลิตร/ไร่ เช่นเดิม

เมื่อต้นข้าวอายุ 84 วัน (16 ก.ค. 42) ตรวจการเกิดโรคกาบใบแห้งในแปลงที่ A B และ Ck ในทั้ง 3 block เช่นเดียวกับการตรวจครั้งที่ 1

เมื่อต้นข้าวอายุ 91 วัน (23 ก.ค. 42) พ่นเชื้อแบคทีเรียครั้งที่ 3 ในแปลง A และ B โดยนำเชื้อแบคทีเรียสูตรเหลวมาทำให้เจือจาง 100 เท่า พ่นในอัตรา 80 ลิตร/ไร่ และพ่นน้ำเปล่าในแปลง Ck ในปริมาณเท่ากันคือ 80 ลิตร/ไร่ เช่นเดิม

เมื่อเมื่อต้นข้าวอายุ 98 วัน (30 ก.ค. 42)) ตรวจการเกิดโรคกาบใบแห้งในแปลง A B และ Ck ในทั้ง 3 block เช่นเดียวกับการตรวจครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

ผลการตรวจการพัฒนาของโรคกาบใบแห้งเปรียบเทียบระหว่างแปลงที่ 1 ซึ่งพ่นเชื้อแบคทีเรียกับแปลงที่ 2 ซึ่งเป็นแปลงเปรียบเทียบ แสดงไว้ในตาราง 4.6A เปรียบเทียบกันหมดระหว่างทุกกรรมวิธี (A, B, Ck) และ ตาราง 4.6B เปรียบเทียบระหว่าง สูตร (A, B) กับ ไม่มีเชื้อ Ck เก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อข้าวอายุ 117 วัน^p(18 สิงหาคม 2542) โดยเก็บเกี่ยวผลผลิตในแต่ละแปลงขนาด 1/6 ไร่ ชั่งน้ำหนักและวัดความชื้น ปรับน้ำหนักผลผลิตที่ความชื้น 14% การวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลผลิตต่อไร่แสดงในตารางที่ 4.6C และ 4.6D

๑151๓๓ 4.6A Pair comparison between treatment mean of rice sheath blight relative lesion height due to Bs. Formulation and non-Bs. (disease check), from 3 observations, SPR60 variety, farmer's field trial, Lamlookka Pathumtani ๓, Sowing 23 April 99.

1 st observation 2 Jul 99 (70 DAS)			2 nd observation 16 Jul 99 (84 DAS)			3 rd observation 30 Jul 99 (98 DAS)		
Treatment	Mean	Difference	Treatment	Mean	Difference	Treatment	Mean	Difference
A	25.883	-3.453 ns	A	33.165	-8.233 **	A	44.098	-8.365 *
B	25.700	-3.635 *	B	34.908	-6.490 *	B	45.210	-7.253 ns
Ck	29.335	-	Ck	41.398	-	Ck	52.463	-
Mean	26.973		Mean	36.490		Mean	47.257	

* = significant at 5% level A = (MK007+BS24 = 10^7 cfu/ml) B = (MK007 = 10^7 cfu/ml)

ns = not significant

பரீட்சை 4.6B Comparison among treatment mean of rice sheath blight relative lesion height due to different Bs. formulation, from 3 observations, SPR60 variety, farmer's field trial, Lamlookka Pathumtani rr, Sowing 23 April 99.

1 st observation 2 Jul 99(70 DAS)			2 nd Observation 16 Jul 99 (84 DAS)			3 rd . observation 30 Jul 99 (98 DAS)		
Treatment	Rank	Mean	Treatment	Rank	Mean	Treatment	Rank	Mean
A	2	25.883 a	A	1	33.165 a	A	1	44.098 a
B	1	25.700 a	B	2	34.908 a	B	2	45.210 ab
Ck	3	29.335 a	Ck	3	41.398 b	Ck	3	52.463 b
Mean		26.973	Mean		36.490	Mean		47.257

A = (MK007+BS24 = 10^7 cfu/ml) B = (MK007 = 10^7 cfu/ml)

ตารางที่ 4.6C Pair comparison between treatment mean of grain weight (kgs./rai), harvested from different Bs. Formulation and non-Bs. (disease check) plots, SPR60 variety, farmer's field trial, Lamlookka Pathumtani rr, Sowing 23 April 99(AVE. OVER 4 REPS)

Treatment	Mean	Difference
A	121.828	6.692 ns
B	116.685	1.550 ns
Ck (Dis.)	115.135	-
Mean	117.883	

ns = not significant

ตารางที่ 4.6D Comparison among treatment mean of grain weight (kgs./rai), harvested from different Bs. Formulation and non-Bs. (disease check) plots, SPR60 variety, farmer's field trial, Lamlookka Pathumtani rr, Sowing 23 April 99.

Treatment	Rank	Mean
A	3	121.828 a
B	2	116.685 a
Ck (Dis.)	1	115.135 a
Mean		117.883

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

5. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

5.1 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในสภาพเรือนทดลองกลุ่มงานวิจัยโรคข้าว

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ประกอบด้วย 10 กรรมวิธีการทดลอง จำนวน 7 ซ้ำ โดยปลูกข้าวพันธุ์ กข.23 ในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 57 วัน ปลูกเชื้อราสาเหตุของโรคกาบใบแห้ง (*R. solani*) โดยหุ้มกองเชื้อ (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/เกลบ/รำ ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว) ด้วยกระดาษฟางสอดลงกลางกอข้าว หลังจากนั้นจึงพ่นสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละชนิดจำนวน 3 ครั้ง เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 60, 75 และ 90 วัน ตรวจความรุนแรงของโรคเมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 111 วัน โดยวัดความสูงของแผลโรคกาบใบแห้งและความสูงของต้นข้าวแต่ละกอ แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล (% relative lesion height) จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไปดังตารางที่แสดงไว้ (พฤษภาคม - กันยายน 2542)

Comparison of sheath blight disease severity among treatment of RD 23 variety when treated with antagonistic bacteria and fungicide, Rice Pathology Research green house.

Treatment	Rank	Mean
1. Agroguard (WP.)	6	64.89 d
2. Agroguard (Liq.)	5	63.06 cd
3. BS916	9	66.95 d
4. Panta (BS24+26)	8	66.79 d
5. Larminar	4	58.73 bc
6. BS (A)	2	50.61 b
7. BS (B)	3	55.64 bc
8. BCA 321+562	7	65.33 d
9. Validamycin	1	35.13 a
10. control	10	73.25 e
Mean		60.04

CV = 12.6%

A = (MK007+BS24 = 10^7 cfu/ml) B = (MK007 = 10^7 cfu/ml)

5.2 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในสภาพแปลงนาทดลอง

นำชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในสภาพเรือนทดลอง มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในสภาพแปลงนาทดลอง เปรียบเทียบกับการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช ณ. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ในระหว่างเดือนกรกฎาคม - พฤศจิกายน 2542 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ประกอบด้วย 6 กรรมวิธีการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ โดยปักดำกล้าข้าวพันธุ์ กข.23 เมื่อมีอายุ 20 วันในแปลงย่อยที่มีขนาด 4x5 เมตร จำนวน 20 แปลง ในแต่ละแปลงย่อยมีคันดินล้อมรอบ เพื่อให้การเกิดโรคกาบใบแห้งในแปลงอย่างสม่ำเสมอ จึงปลูกเชื้อราสาเหตุของโรคกาบใบแห้ง (*R. solani*) เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 57 วัน โดยหุ้มกองเชื้อรา (ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก/เกลบ/รำ ที่นั่งฆ่าเชื้อแล้ว) ด้วยกระดาษฟางสอดลงกลางกอข้าว 20 กอต่อแปลงย่อย หลังจากนั้นจึงพ่นสารละลายชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละชนิดจำนวน 3 ครั้ง เมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 60, 75 และ 90 วัน ตรวจสอบความรุนแรงของโรคเมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 67, 82, 97 และ 109 วัน โดยวัดความสูงของแผลโรคกาบใบแห้งและความสูงของต้นข้าวแต่ละกอ แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสูงสัมพัทธ์ของแผล (% relative lesion height) จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไป

Comparison of sheath blight severity among different treatments of TRF.Bs formulation and commercial bioproducts available in market, RD23, Pathumthani Rice Research Center, wet season 1999.

Treatment	1 st observation 67 DAS 4 Oct. 99		2 nd observation 82 DAS 19 Oct. 99		3 rd observation 97 DAS 3 Nov. 99		4 th observation 1109 DAS 15 Nov. 99	
	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean	Rank	Mean
Laminar	4	29.350 b	4	41.960 b	4	51.888 b	4	56.175 b
Validamycin	1	18.943 a	1	18.660 a	1	26.460 a	1	32.100 a
A	2	28.630 b	2	40.647 b	2	50.390 b	2	53.820 b
B	3	29.105 b	3	40.880 b	3	50.850 b	3	55.043 b
Agroguard(liq)	5	30.330 b	5	42.080 b	5	53.015 b	5	56.465 b
Control	6	35.283 c	6	49.015 c	6	63.867 c	6	67.065 c
Mean		28.607		38.874		49.412		53.445

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

A = (MK007+BS24 = 10^7 cfu/ml) B = (MK007 = 10^7 cfu/ml)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุม โรคข้าว

Development of Antagonist *Bacillus subtilis* for Control of Rice Diseases

โดย

นางวิจิตรา สีตะศุภกุล¹ น.ส.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร² น.ส.ลัดดา นิลรัตน์³ น.ส.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริ
กุล³ นางดวงพร คันทโชติ² นายอรรณพ หันพงศ์กิตติกุล⁴ นายมานะ กาญจนมณีเสถียร⁵ น.ส.สุวิณา รัตน
ชัยวงศ์⁶ นายดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง⁷ น.ส.ขวัญจิต อึ้งโพธิ์⁷ นางเพ็ญแข วันไชยธนวงศ์⁸ นายสม
คิด ดิสดาพร⁹ นางนงรัตน์ นิลพานิชย์⁹ นายพากเพียร อรรณนารถ⁹ นายวิจิต สิริสันธนะ⁹ นางพาณี
หนูนิม¹⁰ และนางนลินี จาริกภากร¹¹

¹ภาควิชาชีวเคมี ²ภาควิชาจุลชีววิทยา ³ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ⁴ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ⁵ภาค
วิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ ⁶ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ และ ⁷ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ⁸ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ ⁹กลุ่มงานวิจัยโรคข้าว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา ¹⁰ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง สถาบันวิจัยข้าว ¹¹สำนักวิจัยและ
พัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 สงขลา กรมวิชาการเกษตร

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

รหัสโครงการ : PG2/014/2538 และ RDG2/022/2540

ระยะเวลาโครงการ : เมษายน 2538 - พฤศจิกายน 2542

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้ดำเนินการจนสิ้นสุดและสำเร็จเนื่องด้วยความช่วยเหลือสนับสนุนอย่างดียิ่งทั้งงบประมาณและเครื่องมือวัสดุอุปกรณ์จากหลายฝ่ายดังต่อไปนี้คือ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรมวิชาการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) มูลนิธิร็อกกี้เฟลเลอร์ และ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ (สรบ.) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.สกล พันธุ์ยิ้มและศ.ดร.อมเรศ ภูมิรัตน มหาวิทยาลัยมหิดลเป็นอย่างสูงในเรื่องให้คำปรึกษาและวิจารณ์ผลการทดลองด้วยดีมาตลอด สุดท้ายการดำเนินงานของโครงการได้ฝ่าฟันอุปสรรคนานัปการมาด้วยคำแนะนำอย่างดีเลิศจาก ศ.ดร.ปิยะวัติ บุญ-หลง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รวมทั้ง รศ.ดร.พีรเดช ทองอำไพ ผู้อำนวยการฝ่าย 2 สกว. ในปัจจุบัน

หัวข้อย่อยที่ 6
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ antagonist *Bacillus* spp.
ในระดับขวดเย้าและถังหมัก

โดย

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

*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. สภาพะของการเพาะเลี้ยง

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) นอกจากนี้ยังทำได้โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (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* ที่ใช้กลีเซอรอลและแป้งร่วมกันเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจุลินทรีย์มีการใช้กลีเซอรอลในการเจริญและใช้แป้งในการผลิต Aurantinine โดยจะผลิต Aurantinine เมื่อกลีเซอรอลเกือบหมดแล้วและเริ่มใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นกลีเซอรอลจึงเป็น carbon catabolite เช่นกัน (Nishikiori *et al.*, 1978 อ้างโดย สุชาดา คุชชีสิทธิ์, 2535) แสดงว่ายังมีแหล่งคาร์บอนอื่นที่ทำให้เกิด carbon catabolite ได้ นอกจากนี้ในการทดลองของ อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรณ์ (2532 ก) พบว่า *Bacillus* KUBA 8601.2 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพดหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารปฏิชีวนะที่ผลิตและพบว่าน้ำตาลชนิดที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างซ้ำๆจะให้ผลผลิตของสารปฏิชีวนะสูง (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

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

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 rimus* และ Bacitracin จาก *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

1.4 เกลืออินทรีย์อื่นๆ ที่นิยมใช้เพิ่มผลผลิตสารปฏิชีวนะคือ โซเดียมคลอไรด์ เช่น การผลิต Streptomycin จากเชื้อ *Streptomyces griseus* ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ผลผลิตจะเพิ่มขึ้น แต่ถ้ามากเกินไปจะยับยั้งการผลิต (ควงพร คันธโชติ, 2530) และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่า ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อเจริญได้ดี (ธีรโชติ ภูมิโชติ, 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) ก็ได้รายงานว่า *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 แต่เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการผลิตเช่นการยับยั้งการผลิต Bacitracin โดย *B. licheniformis* เนื่องจากพีเอชที่ลดลง ซึ่งเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์จากการใช้กลูโคสของจุลินทรีย์ (Haavik, 1974 b) โดยทั่วไปจะพบว่าช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการผลิตสารปฏิชีวนะค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดต่ำลงเสมอ *B. subtilis* เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-8.5 (Buchanan *et al.*, 1974) และการรักษาพีเอชในอาหารไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก อาจทำได้โดยการเติม buffering agent เช่น CaCO_3 และ K_2HPO_4 (Iwai and Omura, 1982) และการควบคุมพีเอชในอาหารระหว่างการผลิตให้เหมาะสมจะทำให้ผลิตเพิ่มขึ้นได้

2.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะเพราะพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิหนึ่งมาก่อนข้างคงที่ แต่มักไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (ดวงพร กันธิโชติ, 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 (Tuffile and Pinto, 1970) ปริมาณอากาศที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น เช่น การผลิต Colistin จาก *B. polymyxa* ต้องการออกซิเจนมาก โดยพบว่าการกวนในอัตรา 600-700 รอบต่อนาที ทำให้ผลผลิตสูงขึ้น (Karatsu and Inuzuka, 1983) ในทำนองเดียวกัน ประไพศรี สมใจ (2538) ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* TISTR 1 พบว่าเมื่อให้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ 1.99×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อให้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง เป็น 3.61×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ

การป้องกันราโดยสารชีวภาพจากจุลินทรีย์นี้ พบว่าน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่อัตรา การกวน 300 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพการป้องกันการเจริญของราทดสอบสูงกว่า อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NB 22 เพื่อผลิต Iturin พบ ว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่ออัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 0.3 VVM แต่อัตราการ ให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการผลิต 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 เพื่อป้องกันการ สูญหายของพลาสมิดเมื่อเซลล์ถูกทำลายเนื่องจากการกวน (Miyoshi *et al.*, 1980) ส่วนสาร กำจัดฟอง (antifoam) ที่ดีควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้ (สนใจ ศิริโชค, 2537) คือ กระจายตัวได้ดี และทำลายฟองได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ความเข้มข้นต่ำ ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ มนุษย์และสัตว์ ไม่ทำให้เกิดปัญหาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ไม่มีผลต่อการส่งผ่านออกซิเจน ทนความร้อนที่ ใช้ในการทำให้ปราศจากเชื้อได้และราคาถูก

วัสดุและวิธีการ

1.1 จุลินทรีย์

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

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

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

2. การวิเคราะห์

2.1 การเจริญของเชื้อ

วัดการเจริญของเชื้อ โดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 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 โคลนนี้ นำวันที่เจาะได้ไปวาง
กลางจานอาหาร PDA จานใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (33 °C) 4 วัน จนได้โคลนนี้ขนาดเส้น
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 นำเชื้อที่อุณหภูมิ 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
รากากสูตร (Gamliel และคณะ, 1989)

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

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดริตเมนต์ละ
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 จากนั้นเชยเชื้อ 2 หลอด ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว 4 สูตร คือ Mckeen GAM GMP และ No. 3 medium โดยเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0 6 12 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างละ 3 ฟลาสก์ นำแต่ละตัวอย่างทำการวัดความขุ่นของเซลล์ ที่ OD 660 นาโนเมตร วัดพีเอช และนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์สารปฏิชีวนะต่อเชื้อราคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราได้มากที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา และใช้สภาพการเลี้ยงตามข้อ 1 ทดลองครั้งละ 3 ฟลาสก์ 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 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

2.6 ผลของการให้อากาศ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราและที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 2.5 นำไปเขย่าให้อากาศที่มีอัตราส่วนของอากาศต่อขนาดของฟลาสก์ 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 ลิตร 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. ศึกษาอุณหภูมิการเจริญเติบโตของเชื้อ *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 (ใช้ถังหมักของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพที่มหาวิทยาลัยมหิดลดังกล่าว) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับ 5.1 (90 ลิตร) ติดตามการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

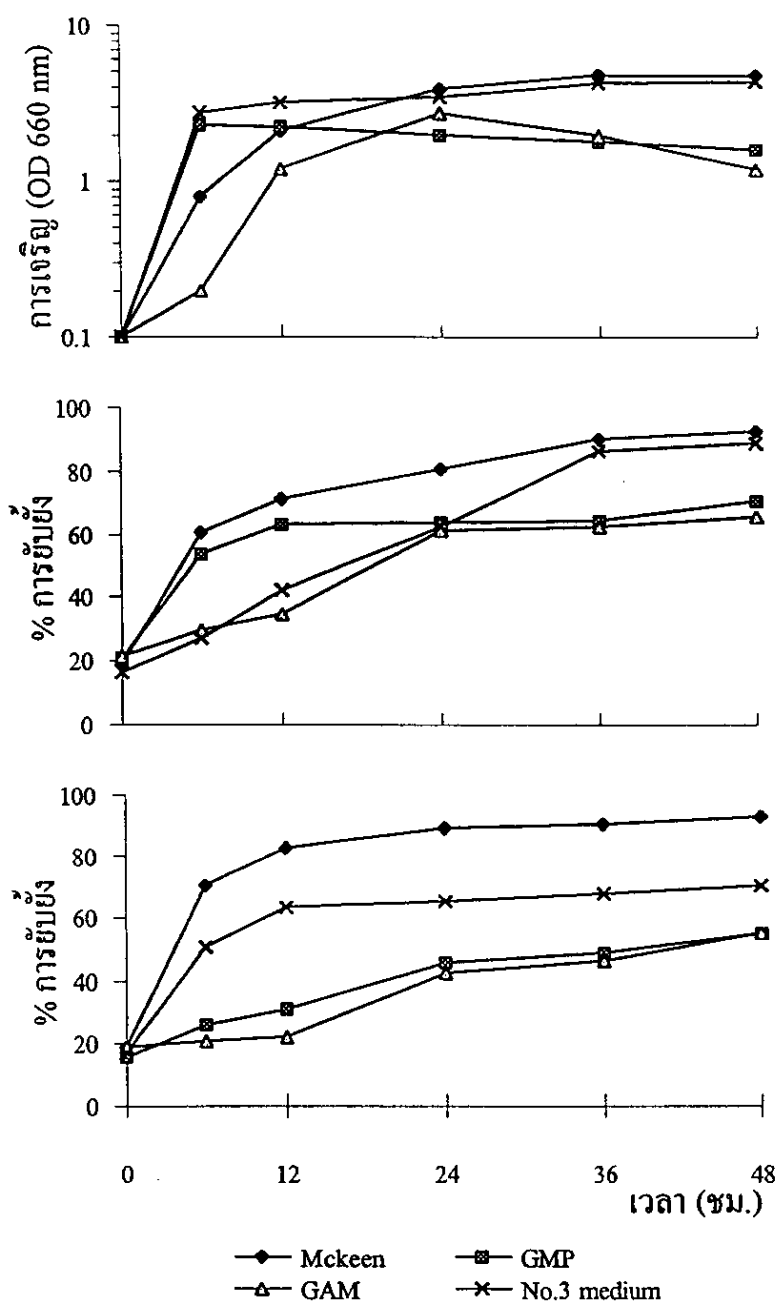
ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* MK 007 ในอาหารที่มีโมลาส 3% เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 10% เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีการเติมแร่ธาตุตามอื่นๆ ตามอาหารสูตร Mckeen โดยใช้สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับ 5.1 ติดตามการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

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* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคน้ำไหม้และโรคกาบใบแห้งในข้าว 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 สุขล 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

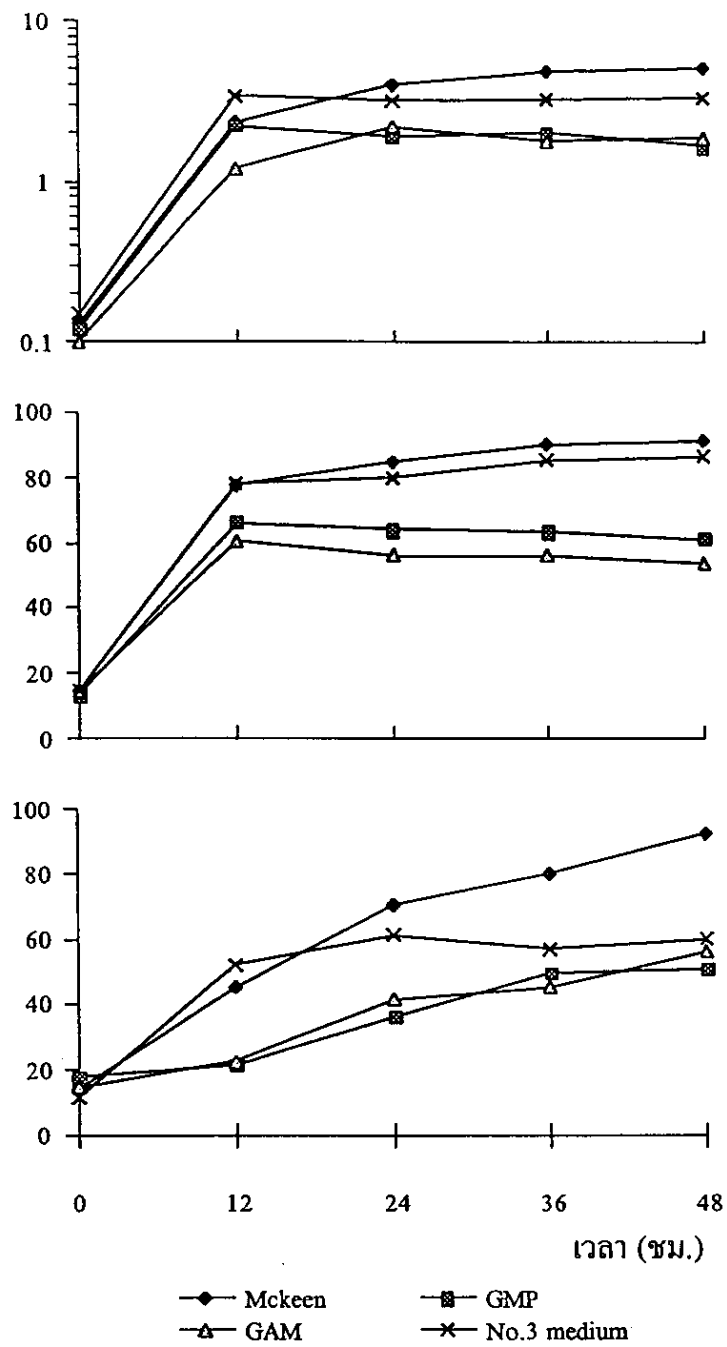
จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรต่างๆพบว่าอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 คือ อาหารเหลวสูตร Mckeen จึงศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารและสภาพที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

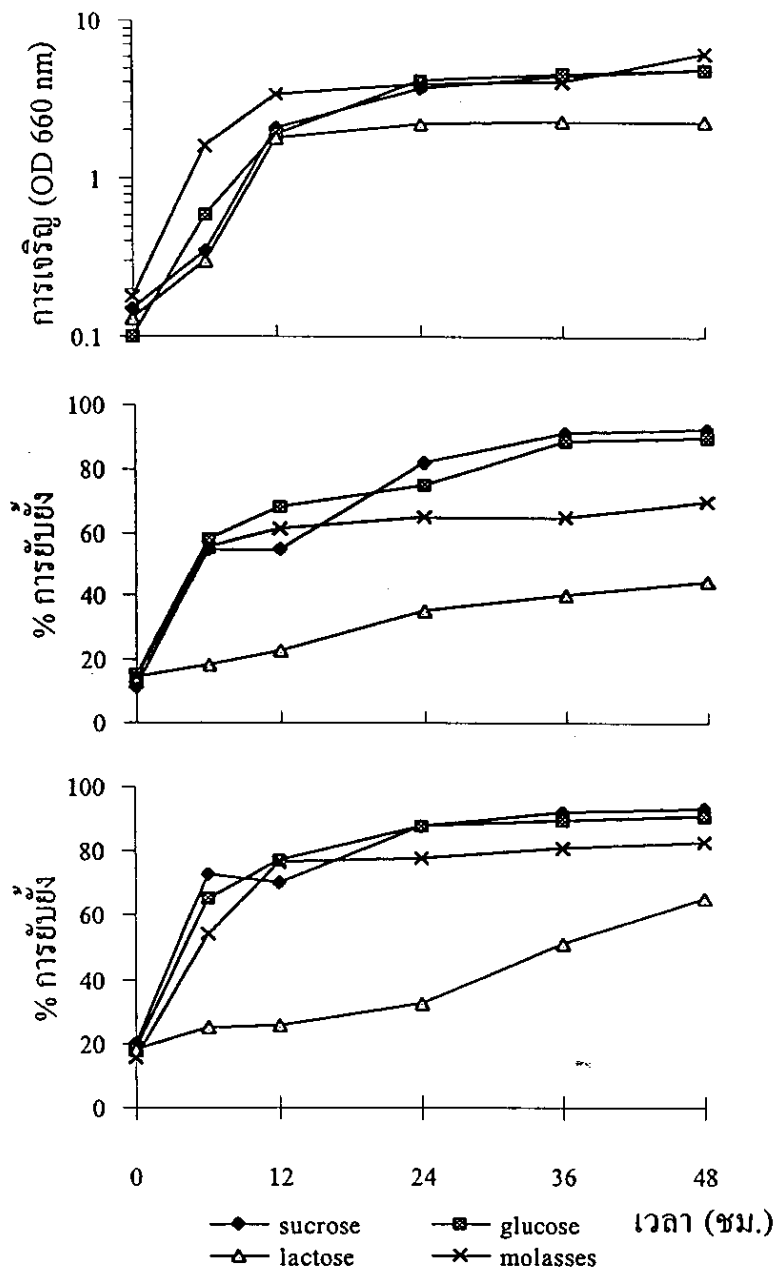
ในการศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen ที่เปลี่ยนแปลงชนิดของน้ำตาลจากกลูโคสเป็นซูโครส แลคโตส และโมลาส ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 6) และ *Bacillus*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

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

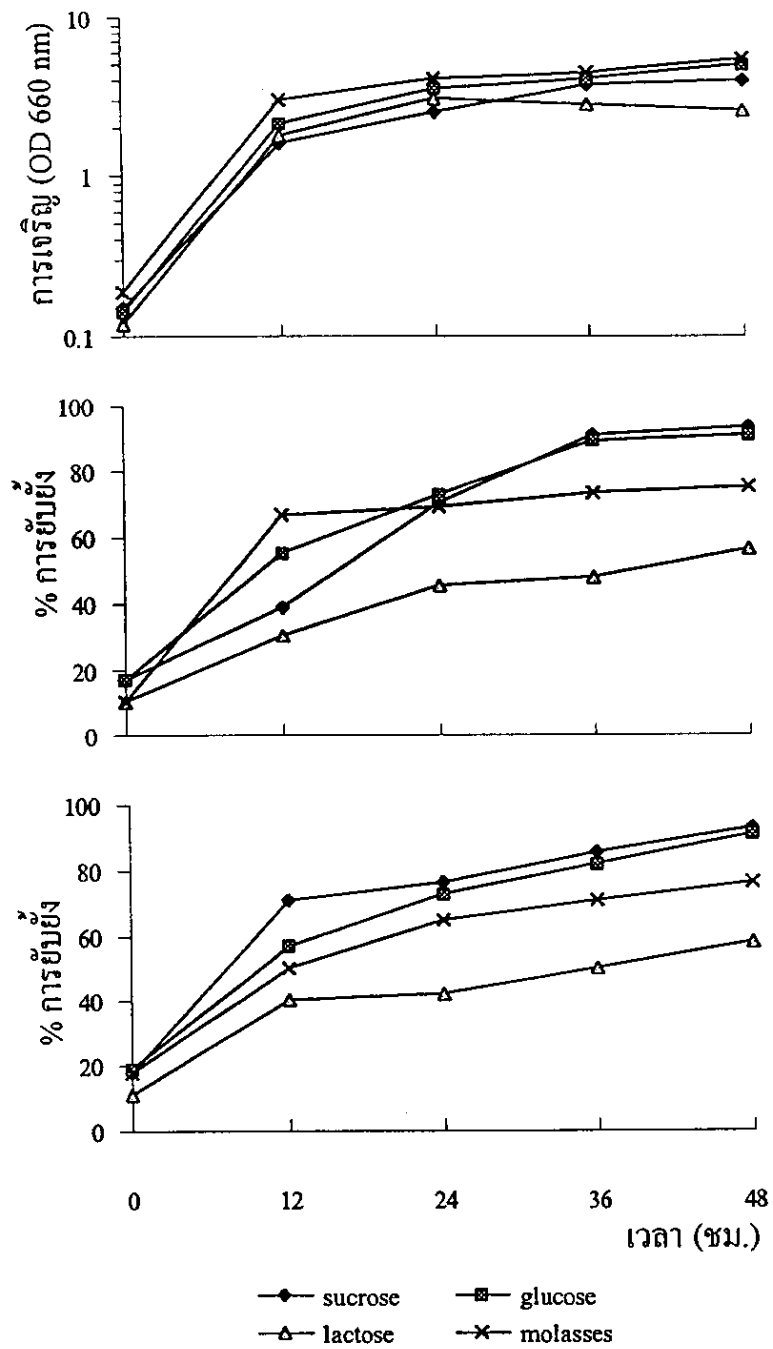
สมใจ เอี่ยมพรรณ (2531) พบว่าในการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* KUBA 8601.2 และ *Bacillus* 8612 นั้นสามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด หรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้



ภาพที่ 5 ผลของสูตรอาหารเหลวต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ
Bacillus sp. LN 007



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



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

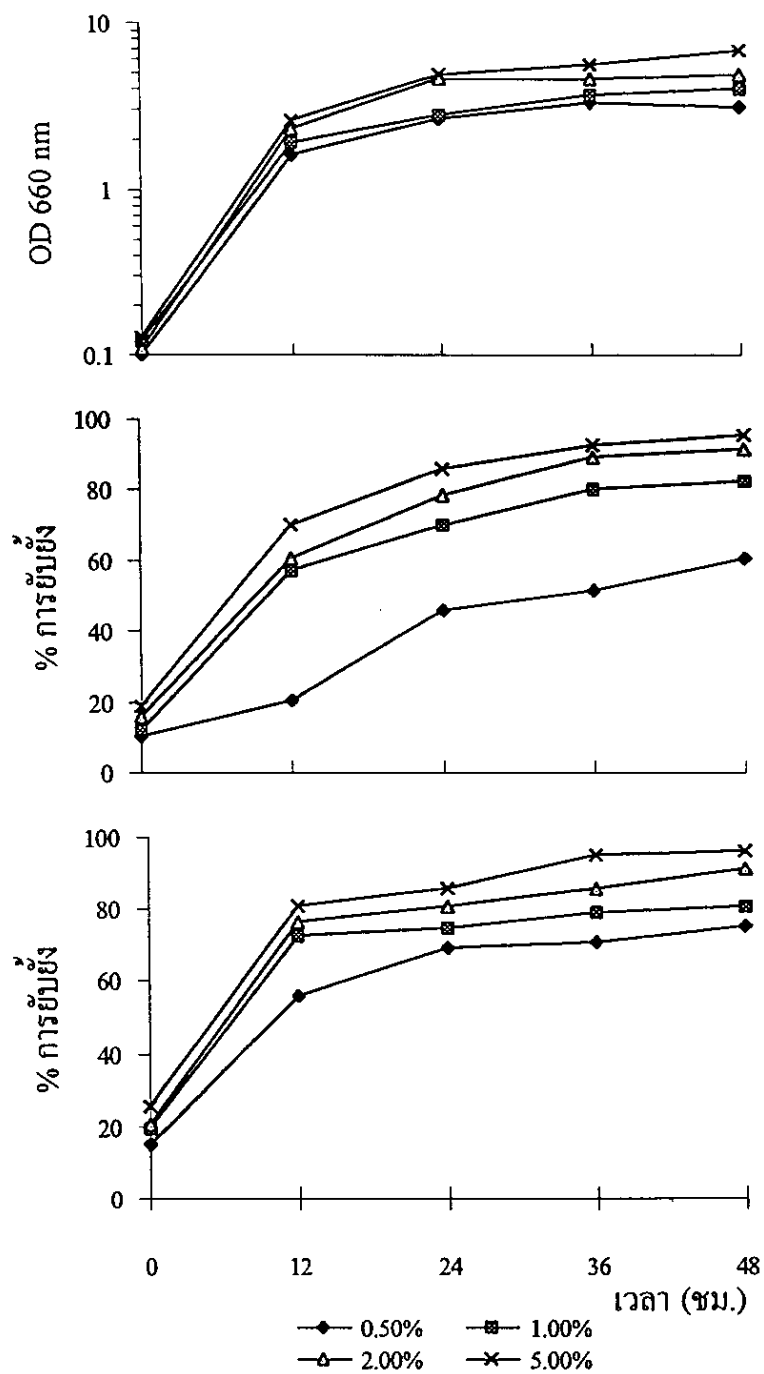
ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกชูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วจึงทำการศึกษาถึงปริมาณของชูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 8) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 9) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของชูโครสร้อยละ 5.0 เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและสามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้สูงกว่าชูโครสร้อยละ 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 ซึ่งจะเห็นว่าระดับความเข้มข้นของชูโครสที่ใช้นั้นค่อนข้างสูง

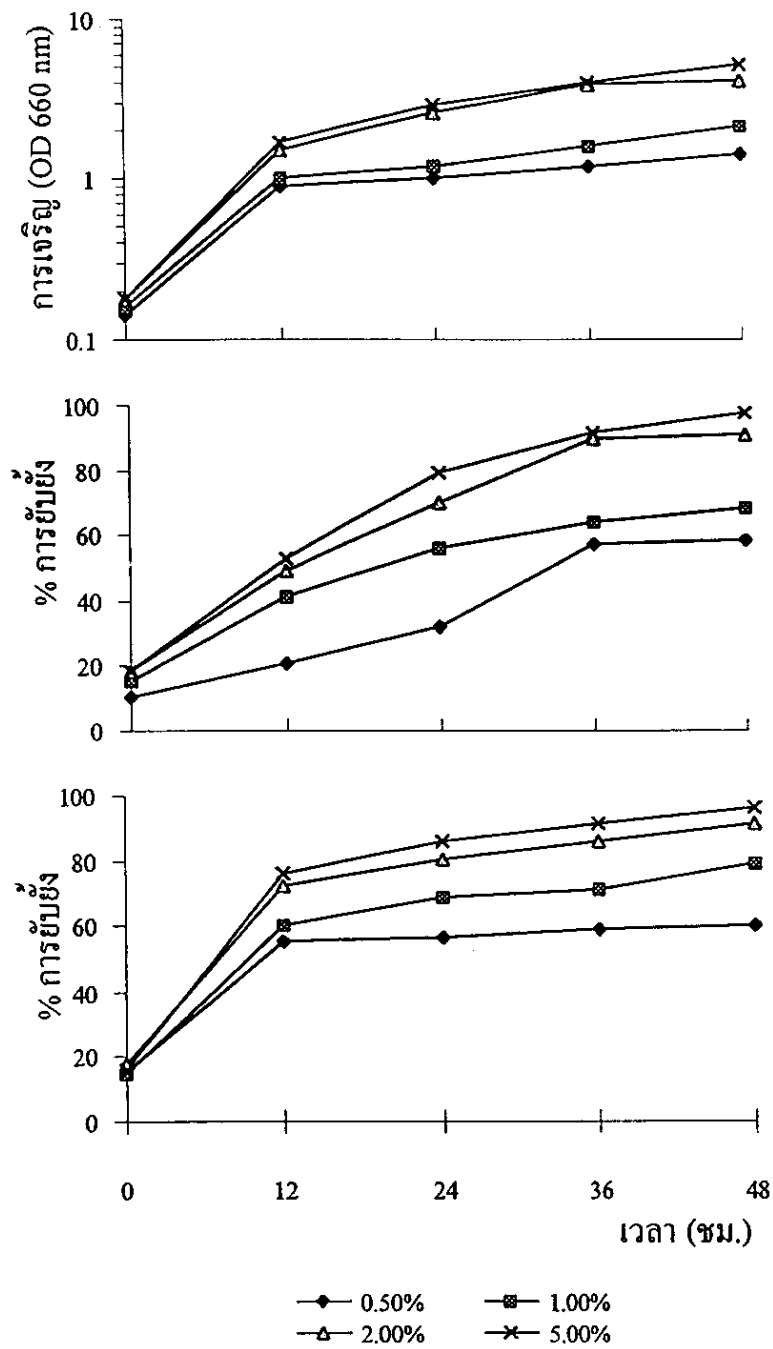
2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

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

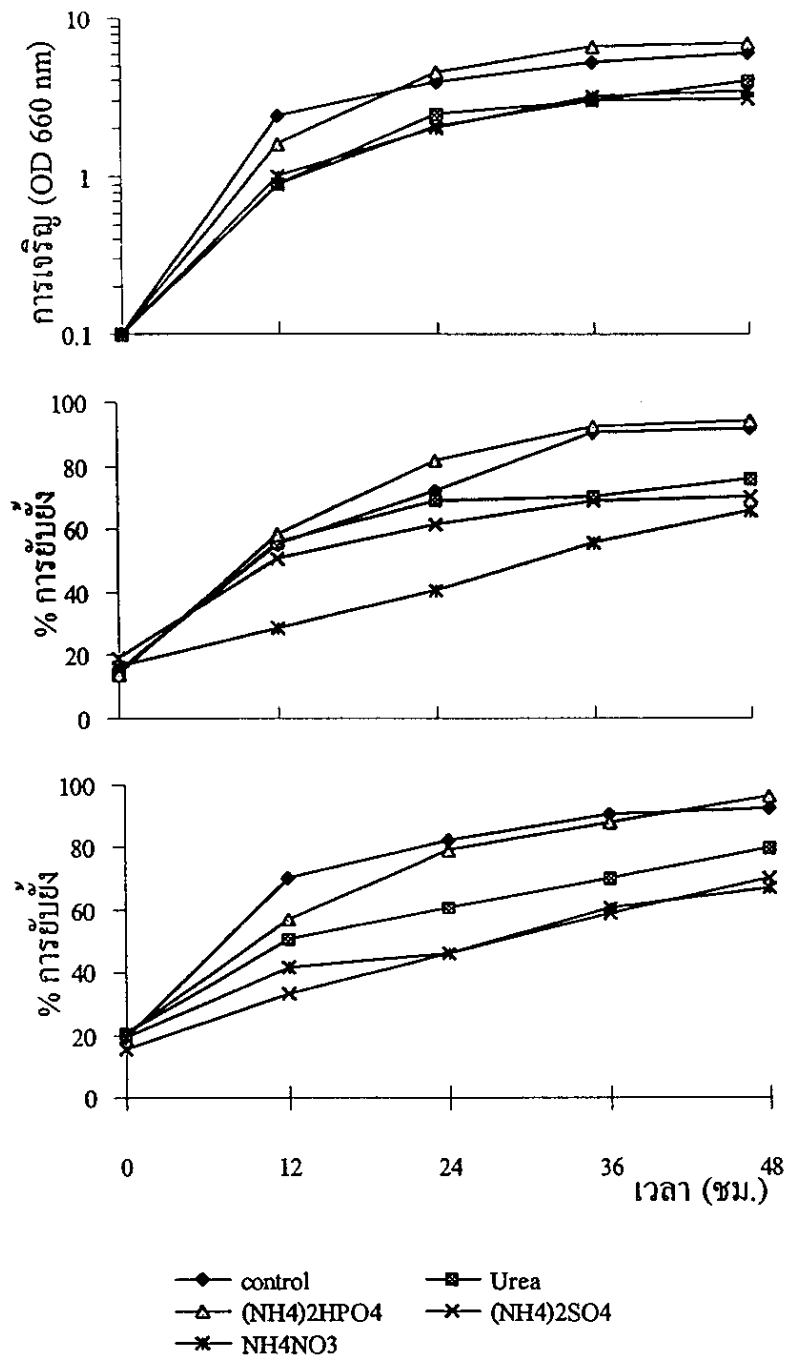
ดังนั้นจึงเลือกใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการทดลองขั้นต่อไป Sandrin และคณะ (1990) รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบนั้น ไนโตรเจนต้องอยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้ง่ายในกระบวนการเมตาโบลิซึม การทดลองนี้ พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 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

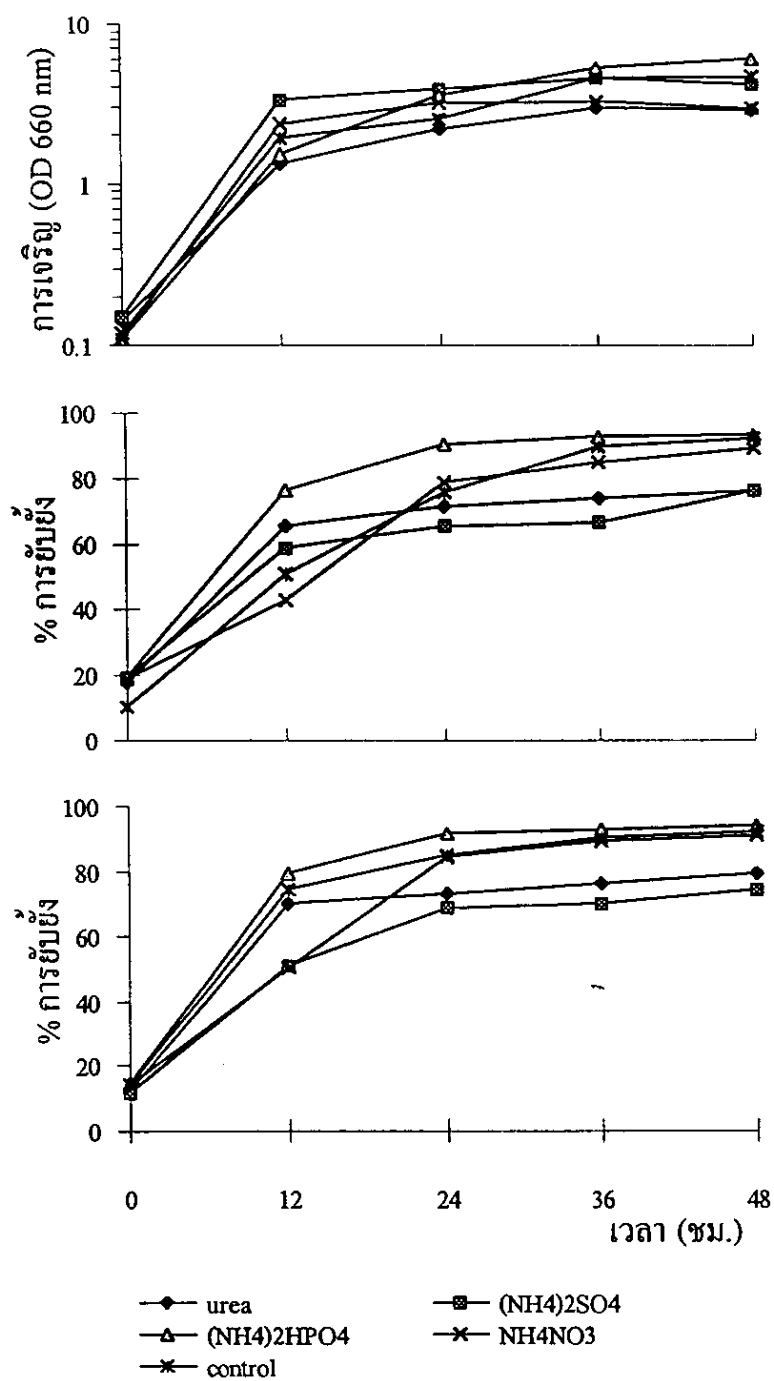


ภาพที่ 9 ผลของซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ
Bacillus sp. LN 007



ภาพที่ 10 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ

B. subtilis NSRS 89-24



ภาพที่ 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ *Bacillus* sp. LN 007

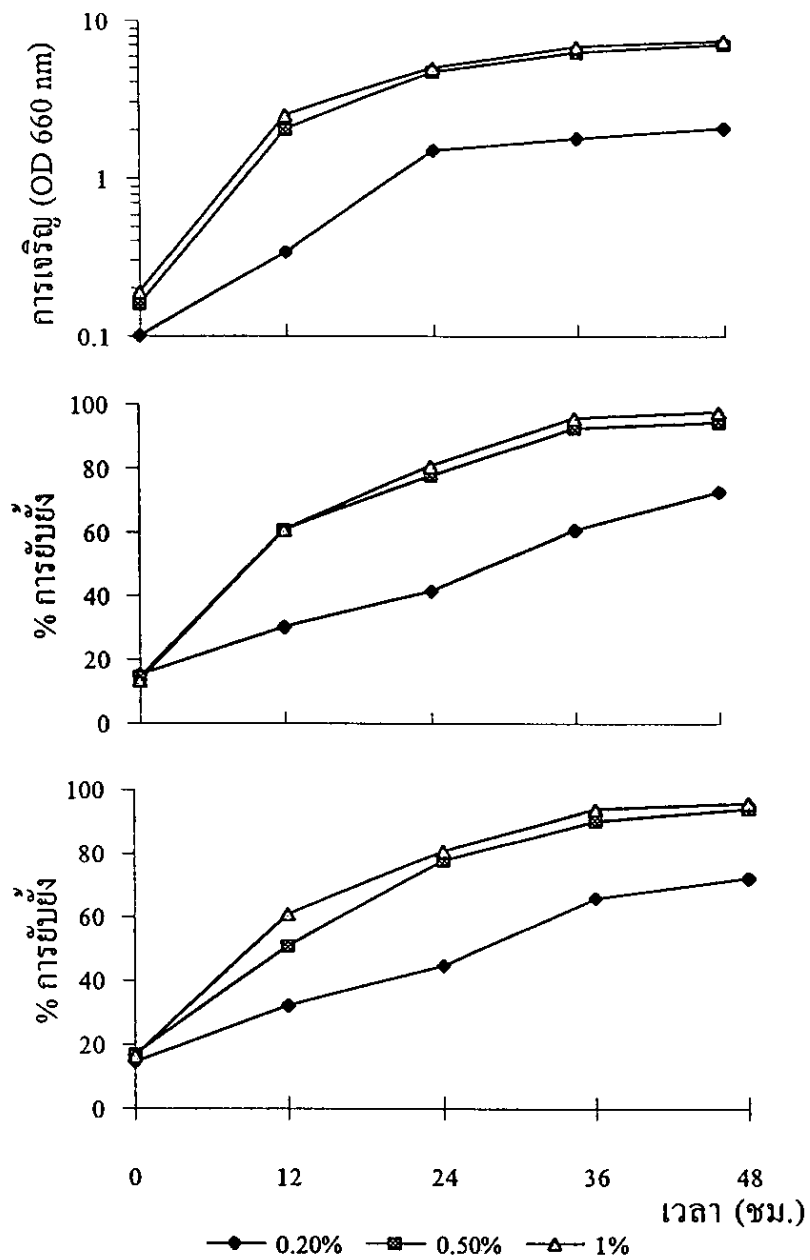
แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตก็คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ urea ส่วน Aharonowitz และ Demain (1979) พบว่าเมื่อใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน หรือร่วมกับ asparagine จะมีผลไปลดการสร้างสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *B. subtilis*

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

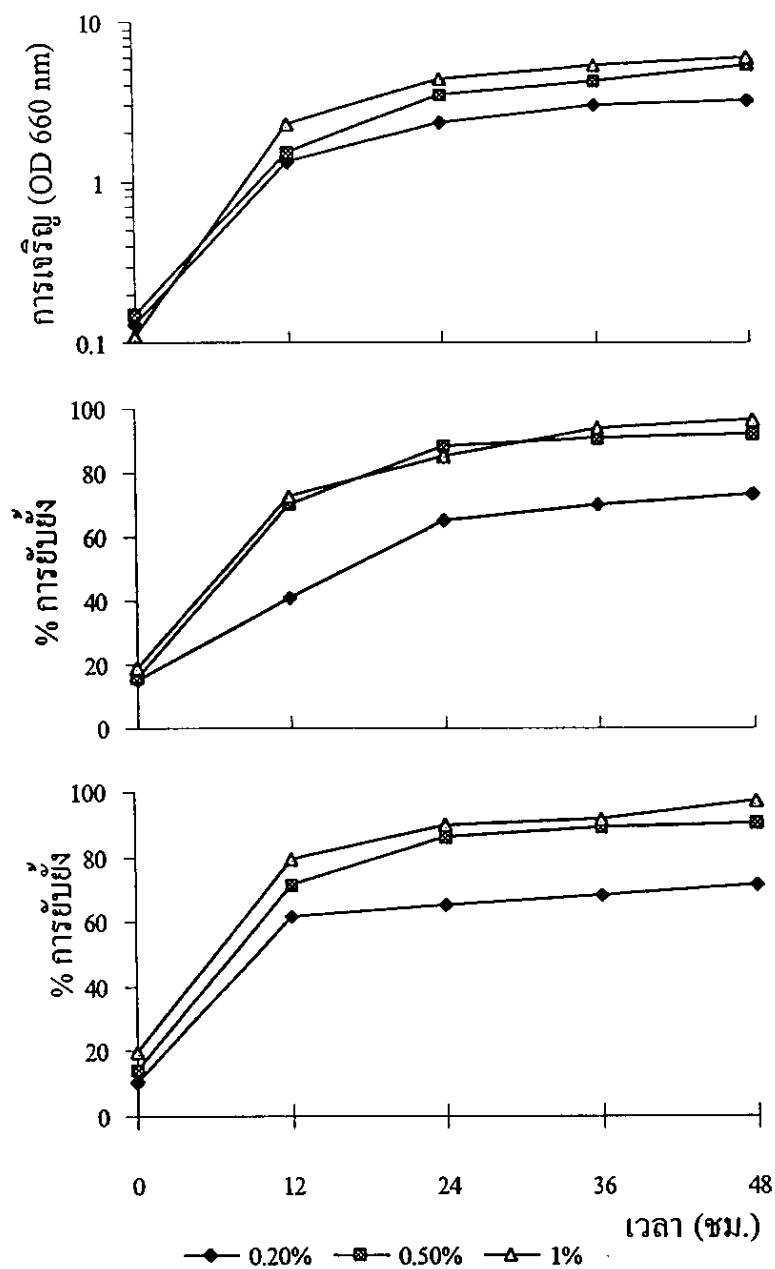
Rytter และคณะ (1989) กล่าวว่าอาหารจะมีผลต่อกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะ และเช่น Pusey และ Wilson (1984) พบว่า Yeast extract ที่ผสมกับอาหาร NB จะเป็นการส่งเสริมให้ *B. subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร NB อย่างเดียว และจะไม่ค่อยพบการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ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

2.3 ผลของการเติมโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย

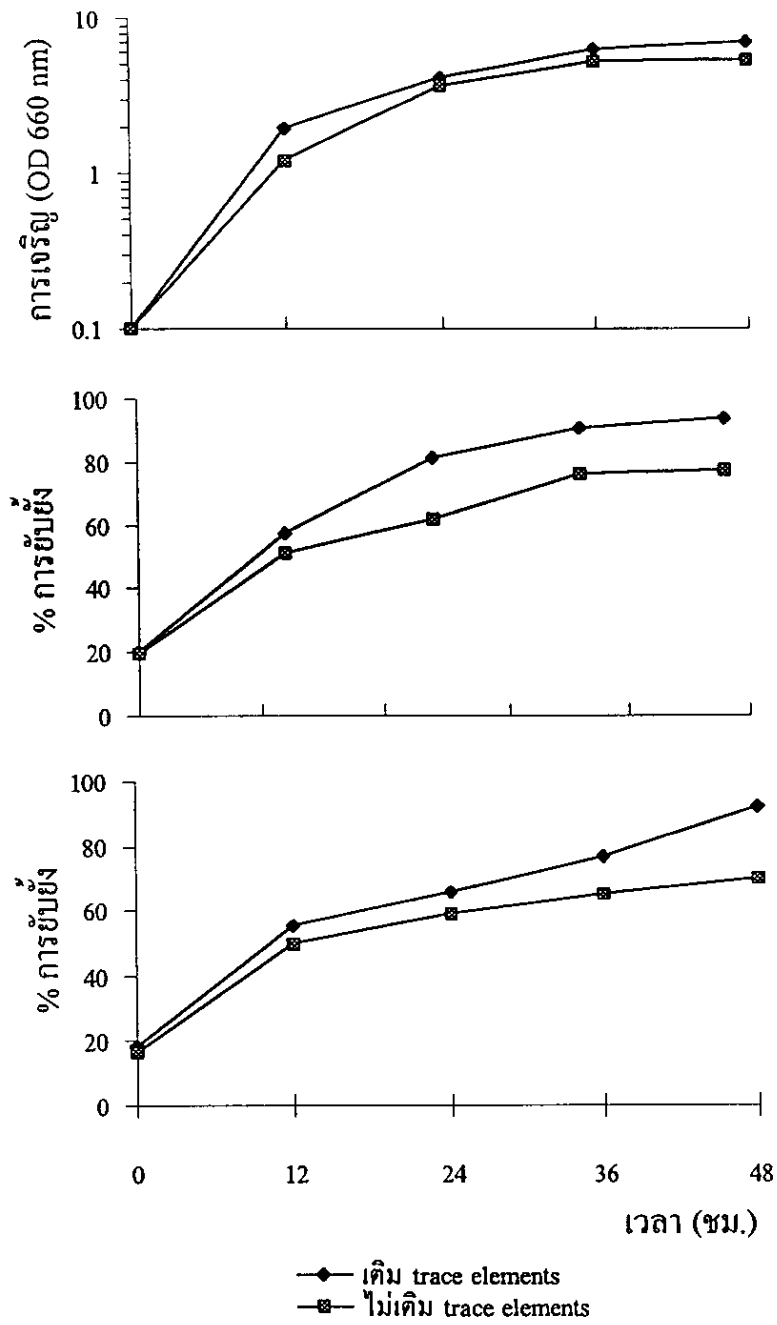
การเปรียบเทียบผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย ในอาหารสูตร Mckeen ซึ่งประกอบด้วย $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ กับอาหารสูตร Mokeen ที่ไม่เติมโลหะเหล่านี้ต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของเชื้อ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



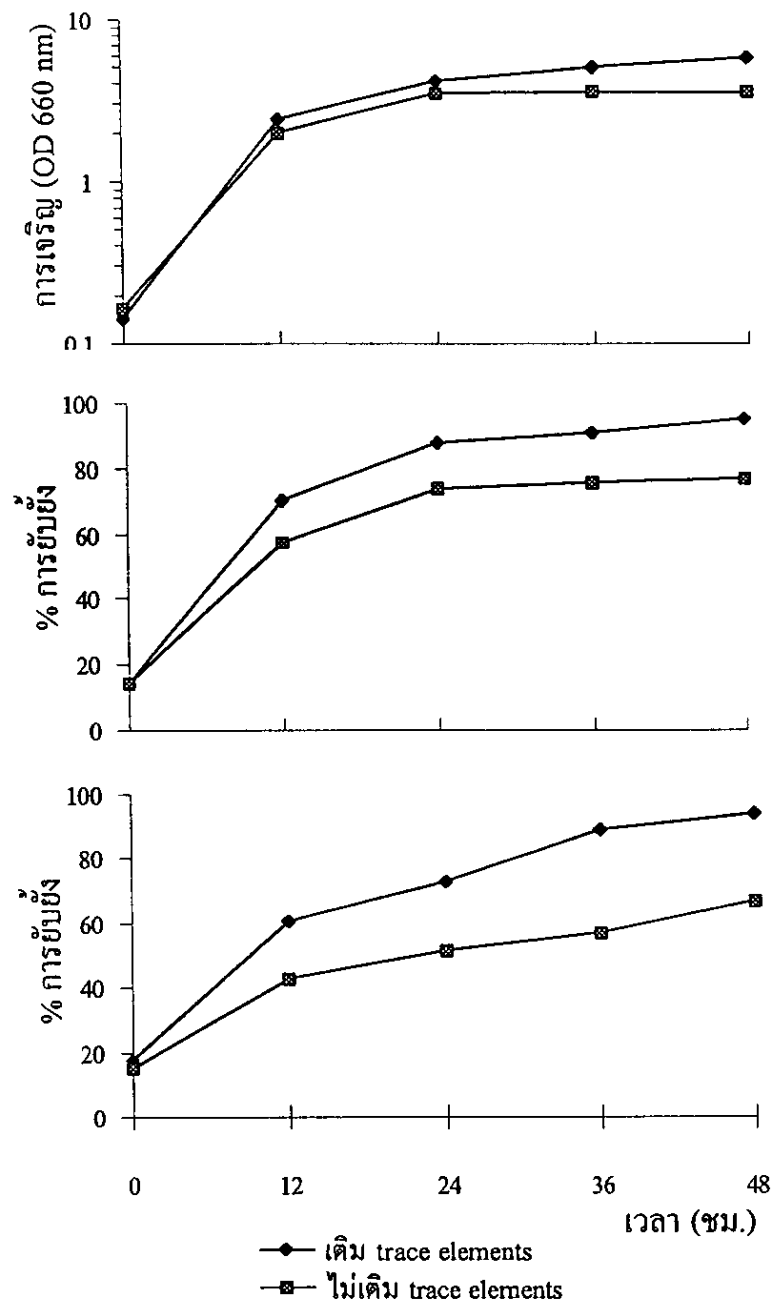
ภาพที่ 12 ผลของ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



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



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



ภาพที่ 15 ผลของโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะ
ต่อเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007

89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เจริญและสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราเหตุโรคข้าวได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร 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) ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสิท โดยเลี้ยงในอาหาร GMP broth พบว่า $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ซึ่งเป็นโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยสิท 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

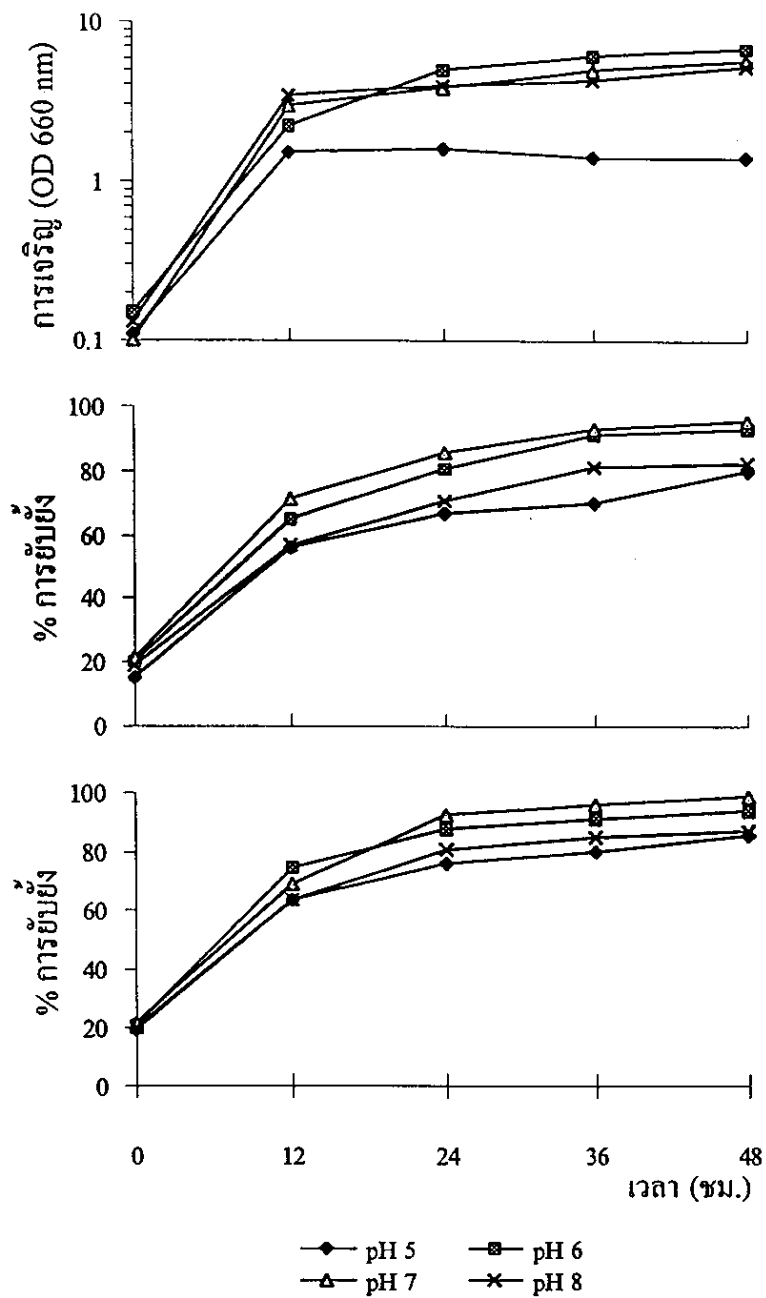
สุชาดา คุชชัยสิทธิ์ (2535) เลี้ยงเชื้อ *subtilis* B31 ในอาหารเหลวที่ขาดแร่ธาตุ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2SO_4 และ $NaCl$ ผลปรากฏว่าถ้าขาดเกลือซัลเฟตของแมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และ โพแทสเซียม มีผลให้ไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะหรือผลิตได้ในปริมาณที่น้อยหรือทำให้ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเปลี่ยนแปลงไปโดยทำให้มีการผ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

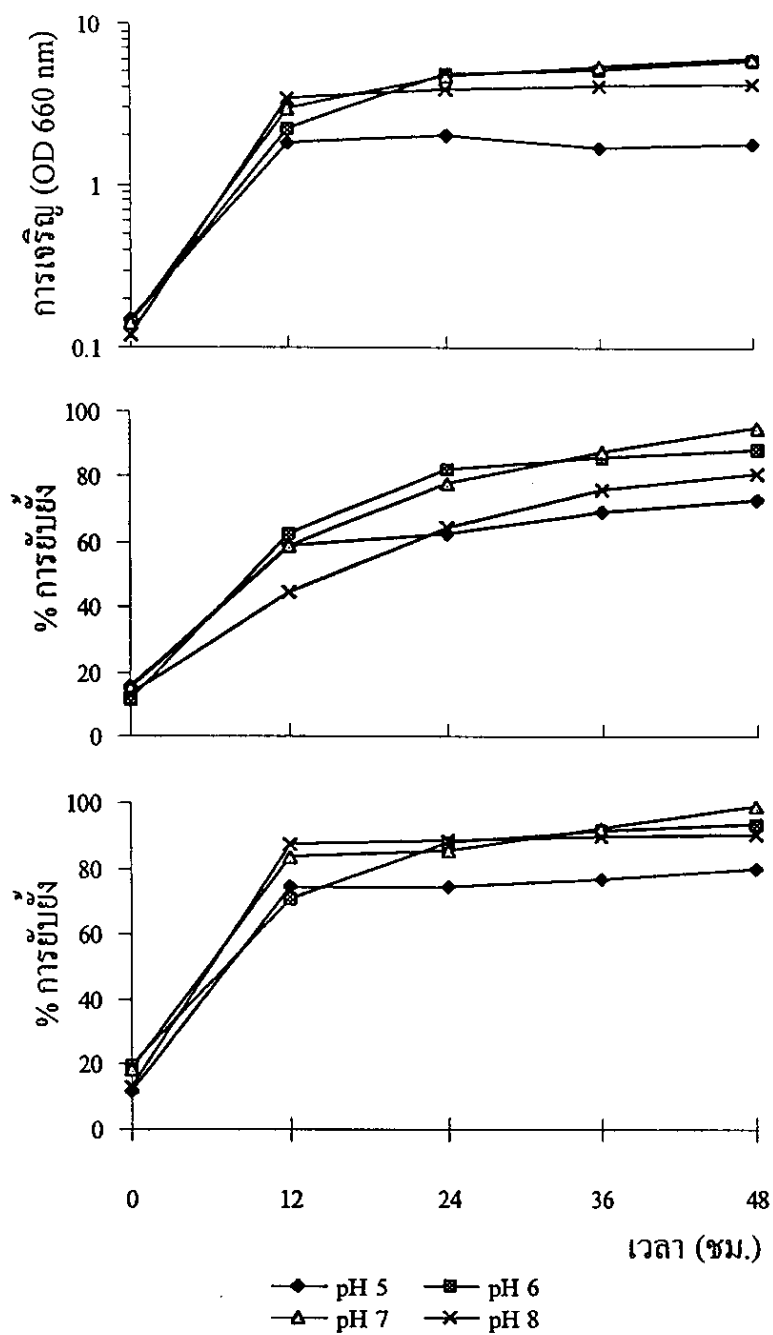
สมใจ ศิริโชค (2537) กล่าวว่าโดยทั่วไปมักจะพบโลหะที่ต้องการในปริมาณน้อยเจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำแฉ่ำข้าวโพด และฟาร์มาซีเดีย (ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองได้จากเอมบริโอของเมล็ดฝ้ายที่บดละเอียด) ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อ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

2.4 ผลของพีเอชเริ่มต้น

นอกจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีพีเอชต่างๆ 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 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 25, 26, 27 และ 28) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดย *B. subtilis* NSRS 89-24 สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* และ *R. solani* ได้สูงสุดร้อยละ 95.6 และ 98.5 ตามลำดับ และ *Bacillus* sp. LN 007 สร้างสารยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 95.0 และ 98.7 ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Leifert และคณะ (1995) ที่ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* CL27 และ *B. pumilus* CL45 เพื่อต่อต้านเชื้อ *Botrytis cinerea* พบว่าการผลิตสารปฏิชีวนะจะขึ้นอยู่กับสัณฐานที่ใช่ส่วนการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะก็จะขึ้นอยู่กับพีเอชและความเข้มข้นของสารอาหาร มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวว่าพีเอชจะมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ (Sumino *et al.*, 1993; Bernheimer and Avigad, 1970; Sen and Swaminathan, 1997; Haavik, 1974 a,b)



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



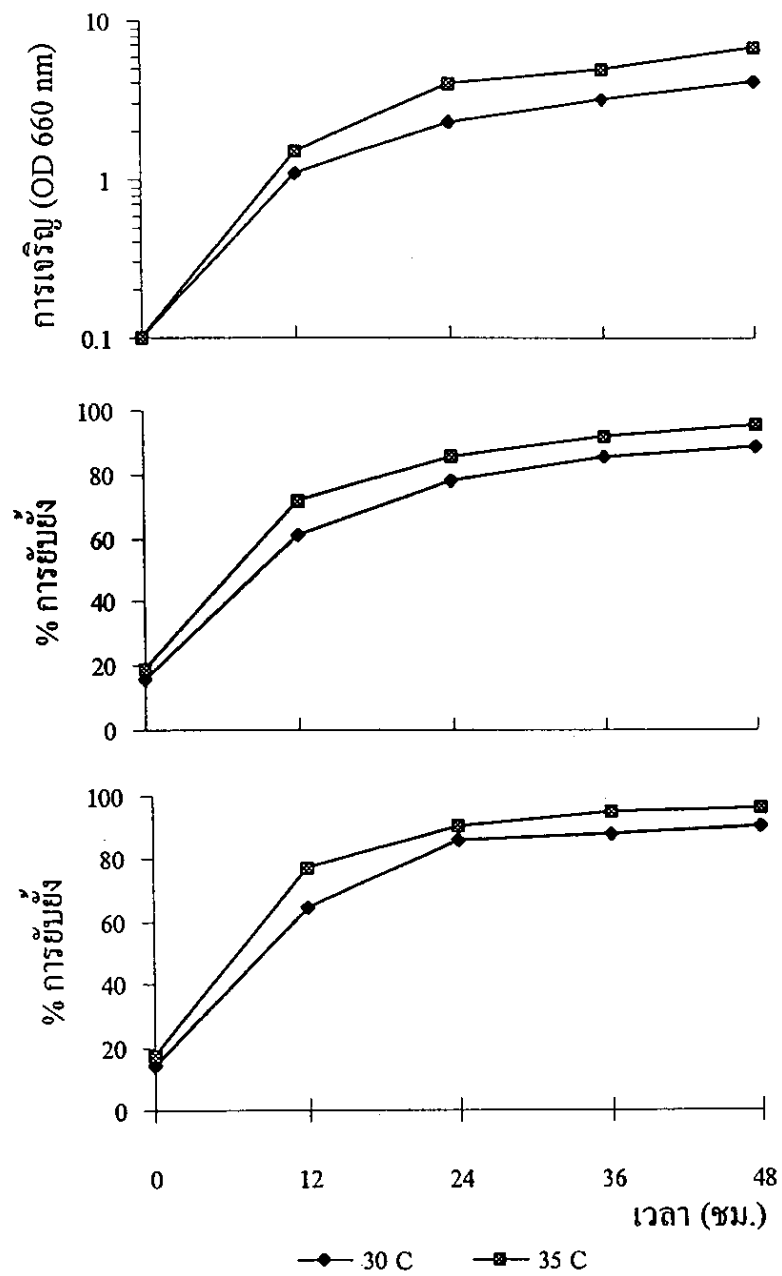
ภาพที่ 17 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา
ของ *Bacillus* sp. LN 007

2.5 ผลของอุณหภูมิ

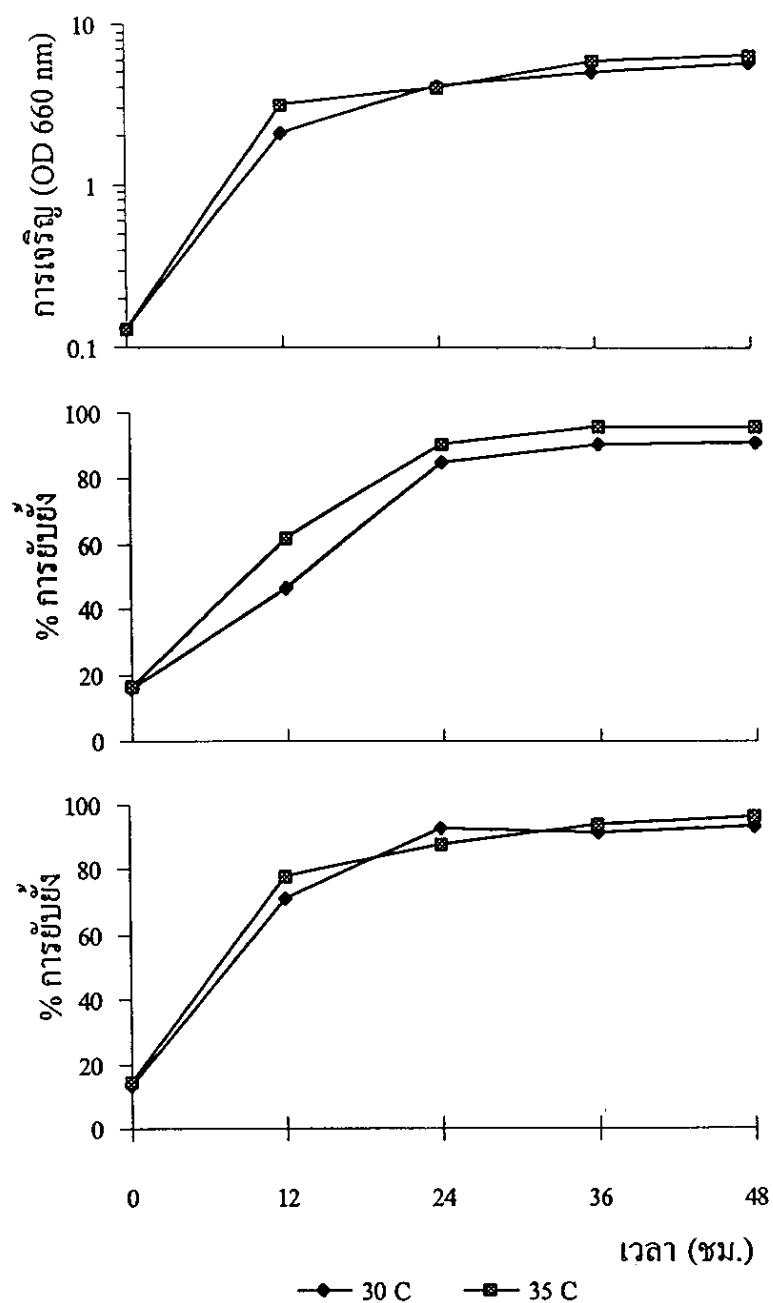
ผลของอุณหภูมิต่อการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 18) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 19) เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีที่อุณหภูมิ 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 Cameoto (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 แต่ไม่เปลี่ยนขนาดของพลาสติก และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ 50 100 และ 150 มิลลิลิตร ต่อพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าปริมาตรของอาหารที่แตกต่างกันในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว กล่าวคือ เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ เจริญและสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในพลาสติกขนาด 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

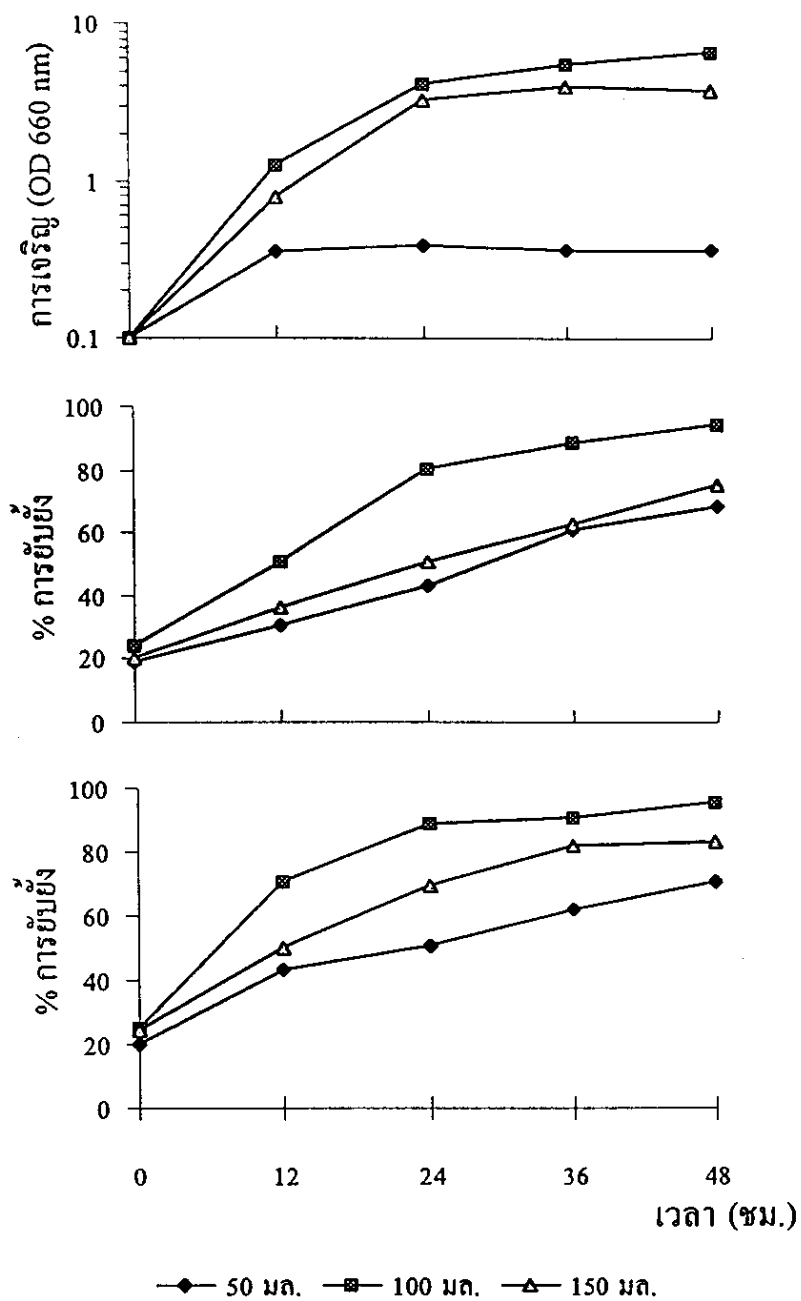


ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ
B. subtilis NSRS 89-24



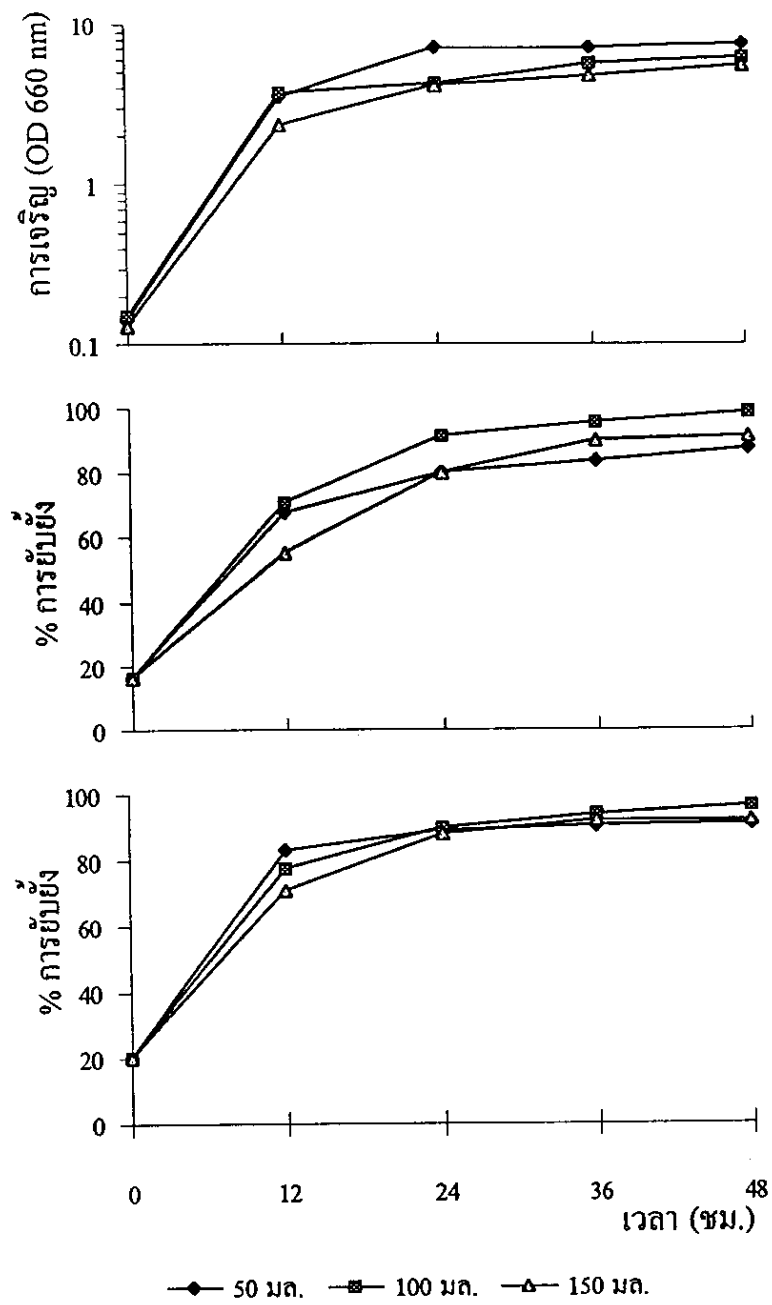
ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ

Bacillus sp. LN 007



ภาพที่ 20 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ

B. subtilis NSRS 89-24



ภาพที่ 21 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราของ

Bacillus sp. LN 007

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

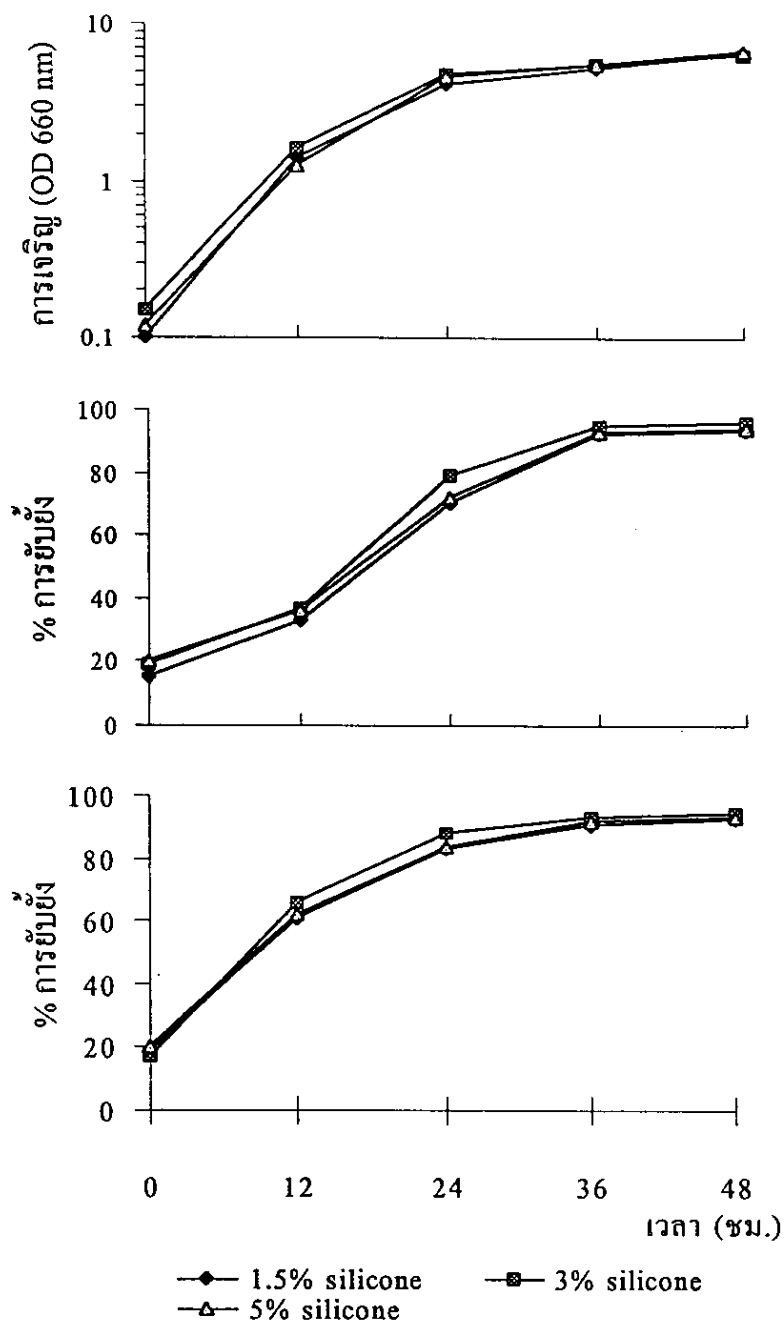
2.7 สารกำจัดฟอง

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 silocone 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 กุชัยสิทธิ์ (2535) พบว่า สารกำจัดฟองทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการกำจัดฟองแตกต่างกัน โดยที่แต่ละชนิดมีความสามารถในการกำจัดฟองได้คืบตามลำดับคือ silicone > antispumin > PG-2000 และการใช้ silicone เชื้อจะยังคงผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี ส่วนการใช้ antispumin จะทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะลดต่ำลง ในขณะที่การใช้ PG-2000 จะทำให้เชื้อไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะ

3. ชนิดของ complex medium ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา

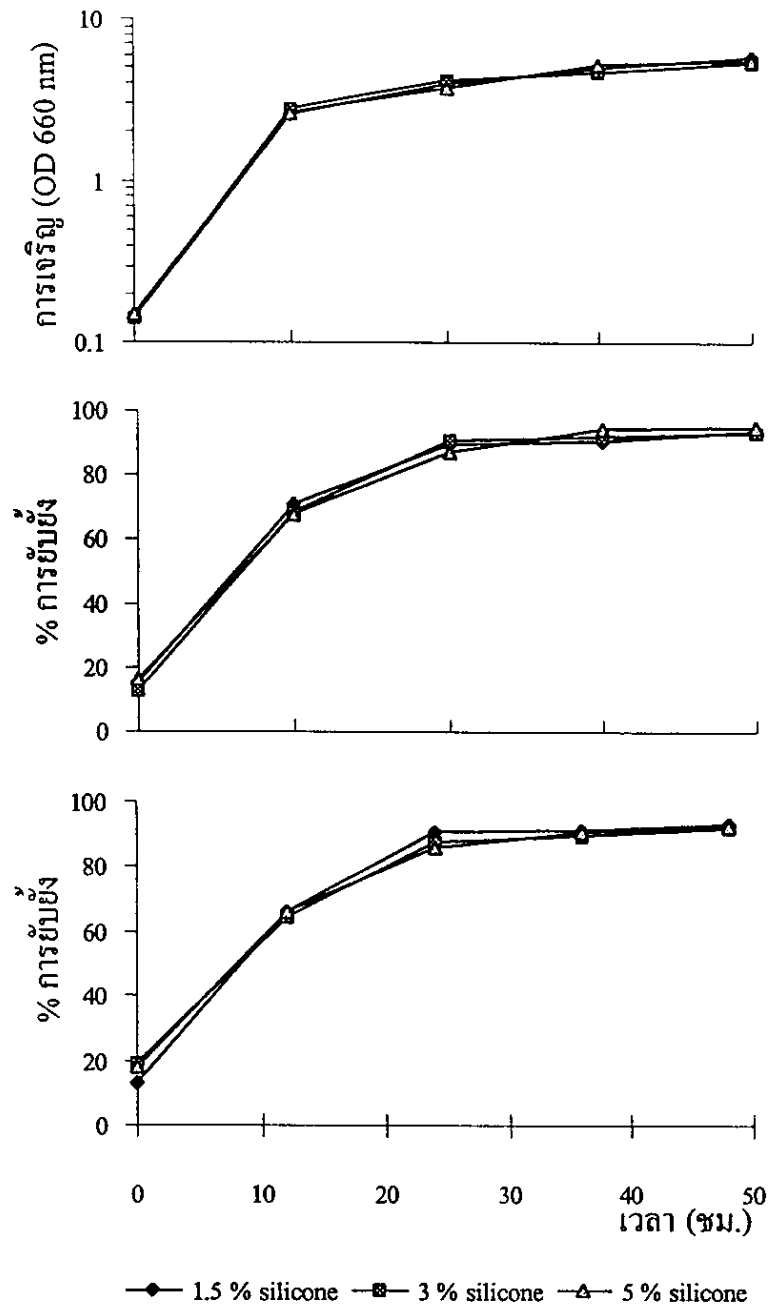
3.1 การใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน

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

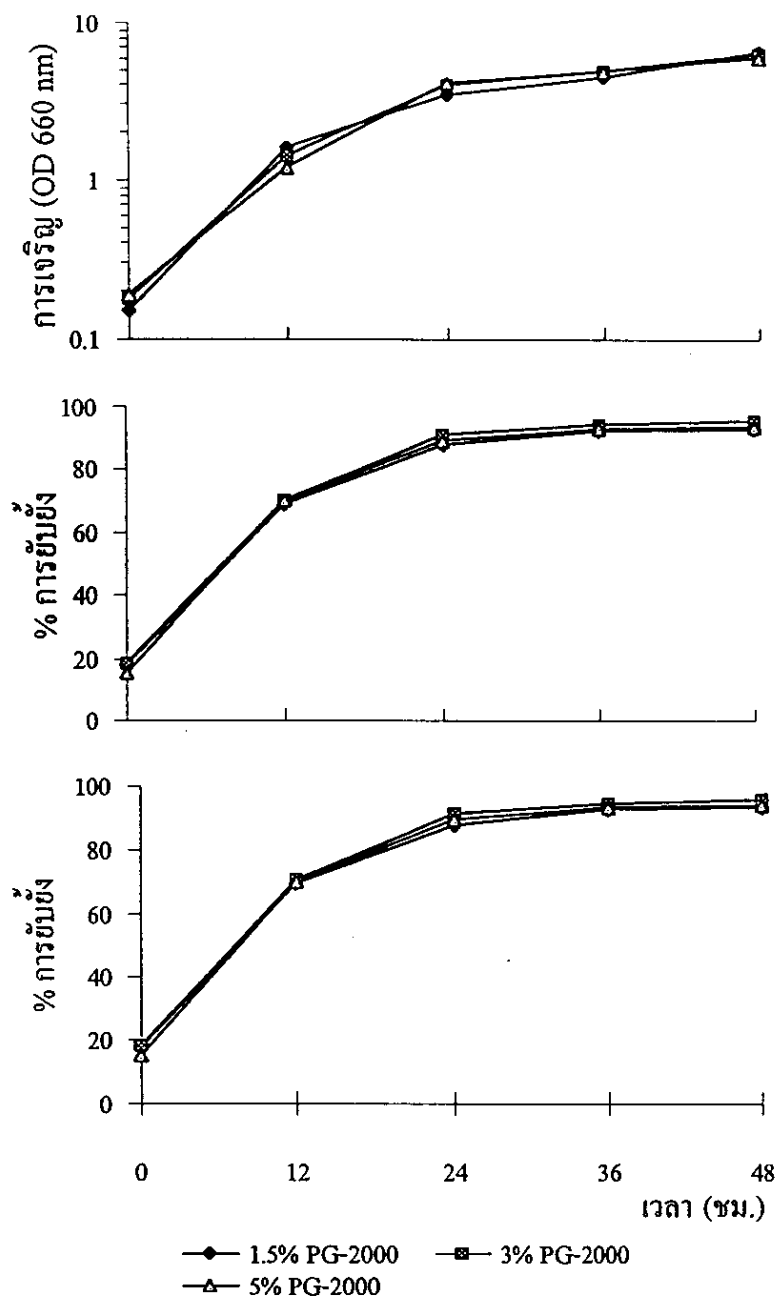


ภาพที่ 22 ผลของ silicone ต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ

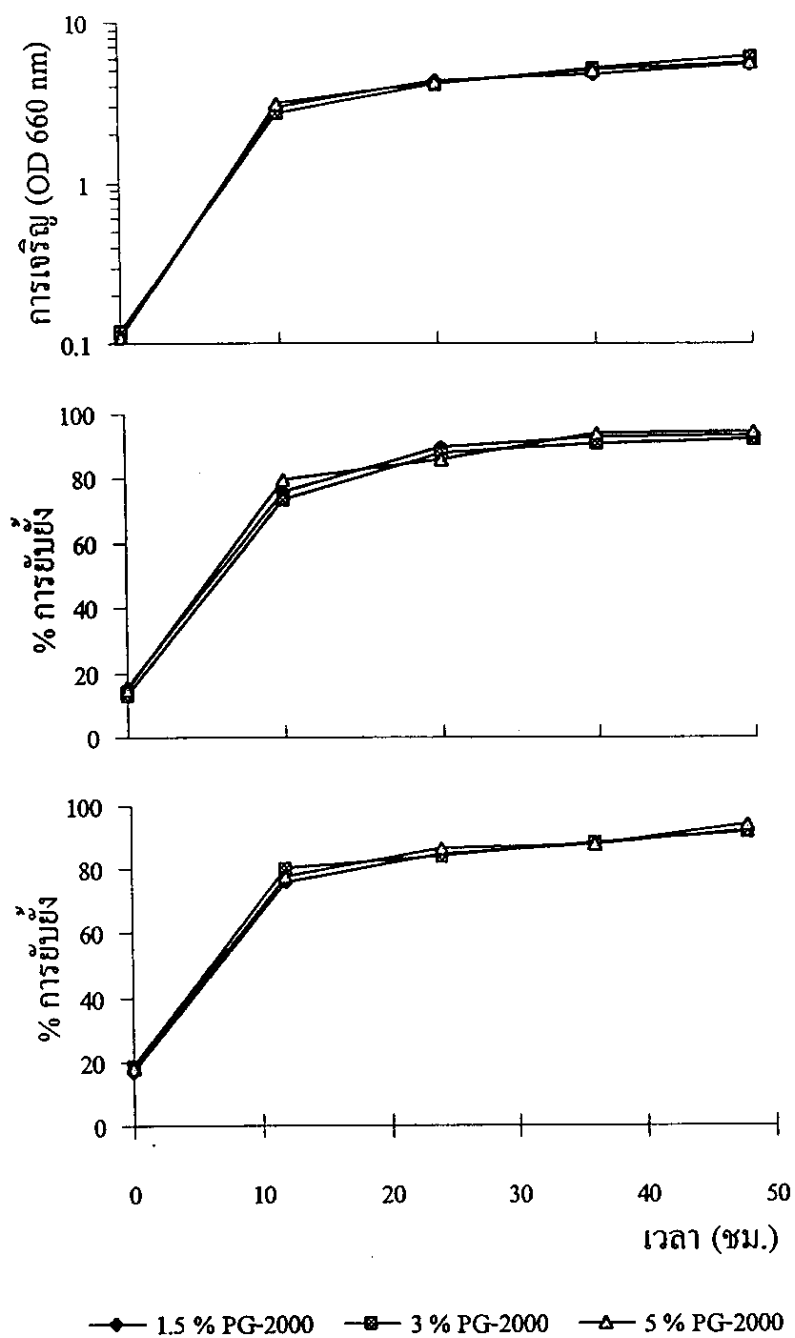
B. subtilis NSRS 89-24



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



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



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

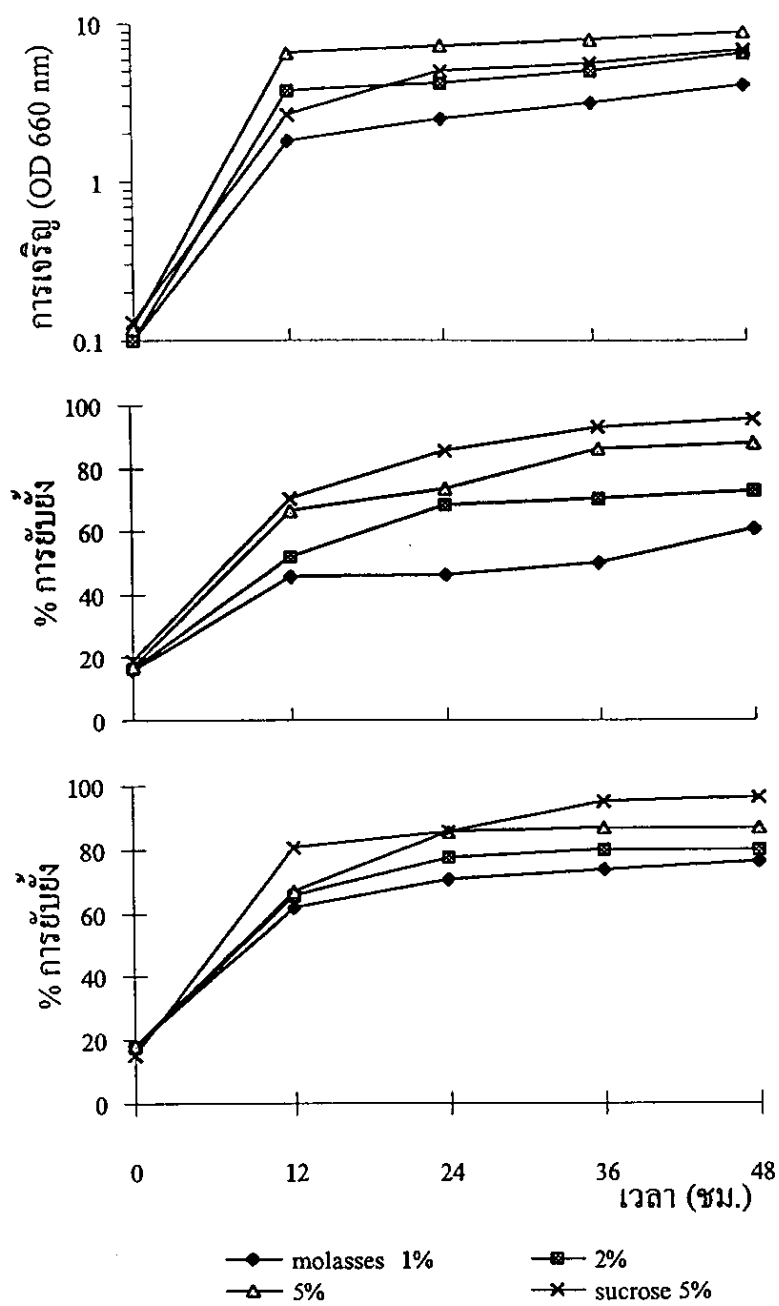
การทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 (ภาพที่ 26) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 27) เจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดีที่สุดเมื่อใช้โมลาสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนซูโครส โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 45, 46, 47 และ 48) และสารที่ผลิตได้จาก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

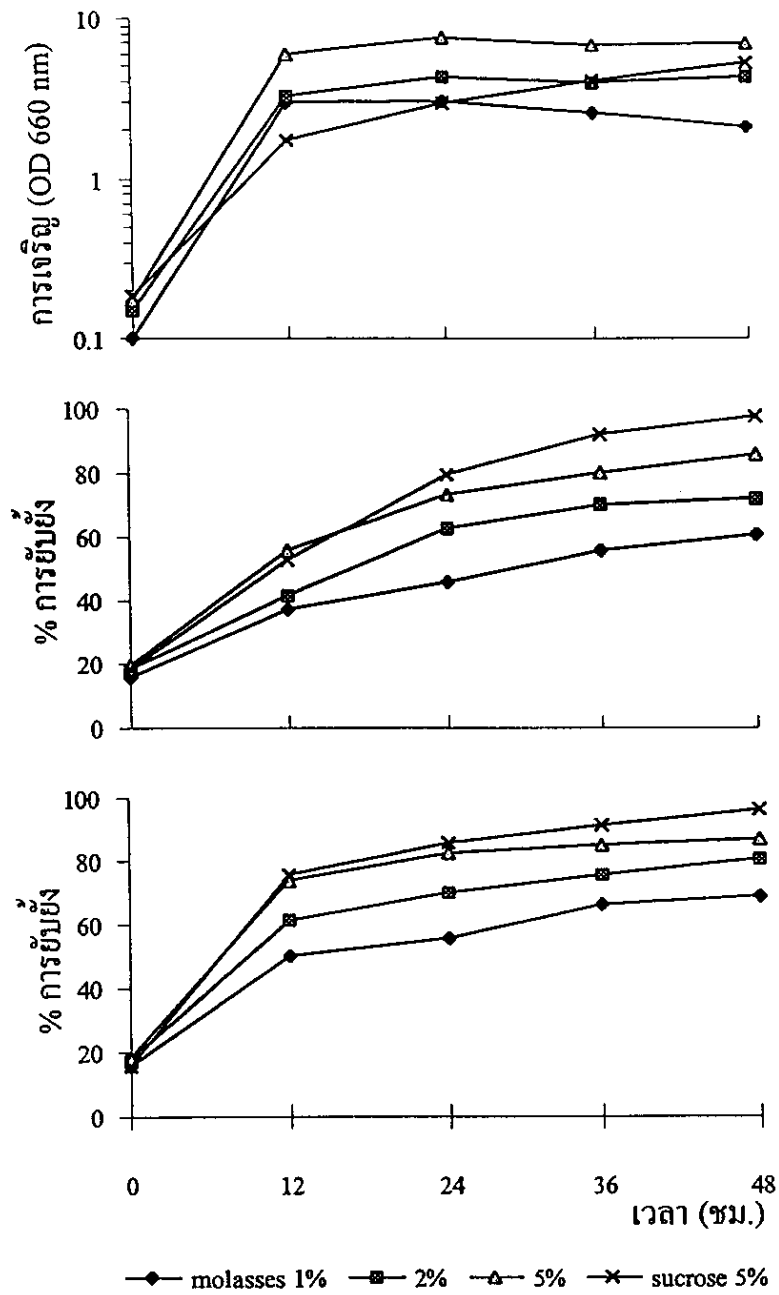
น้ำตาลทั้งหมด	58 %
สารที่ละลายได้ทั้งหมด	83 %
แมกนีเซียม	300.916 (มก./ล)
แมงกานีส	4.581 (มก./ล)
เหล็ก	29.494 (มก./ล)

3.2 การใช้น้ำแฉะจากการทำเต้าหู้เป็นแหล่งไนโตรเจน

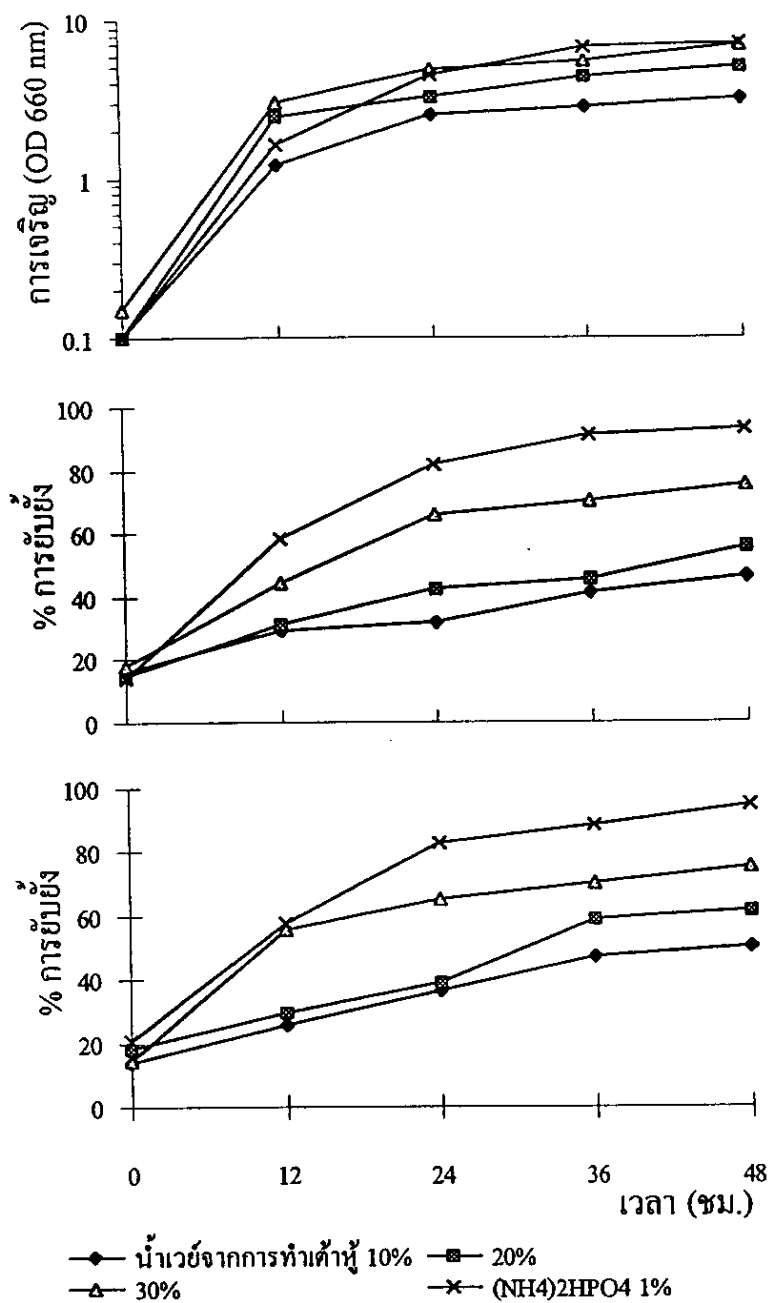
การทดลองใช้น้ำแฉะจากการทำเต้าหู้แทน $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ร้อยละ 1.0 ในอาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุงที่มีซูโครสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำแฉะจากการทำเต้าหู้ (ไนโตรเจน 0.074 % และ โปรตีน 0.42%) ร้อยละ 10 20 และ 30 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่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



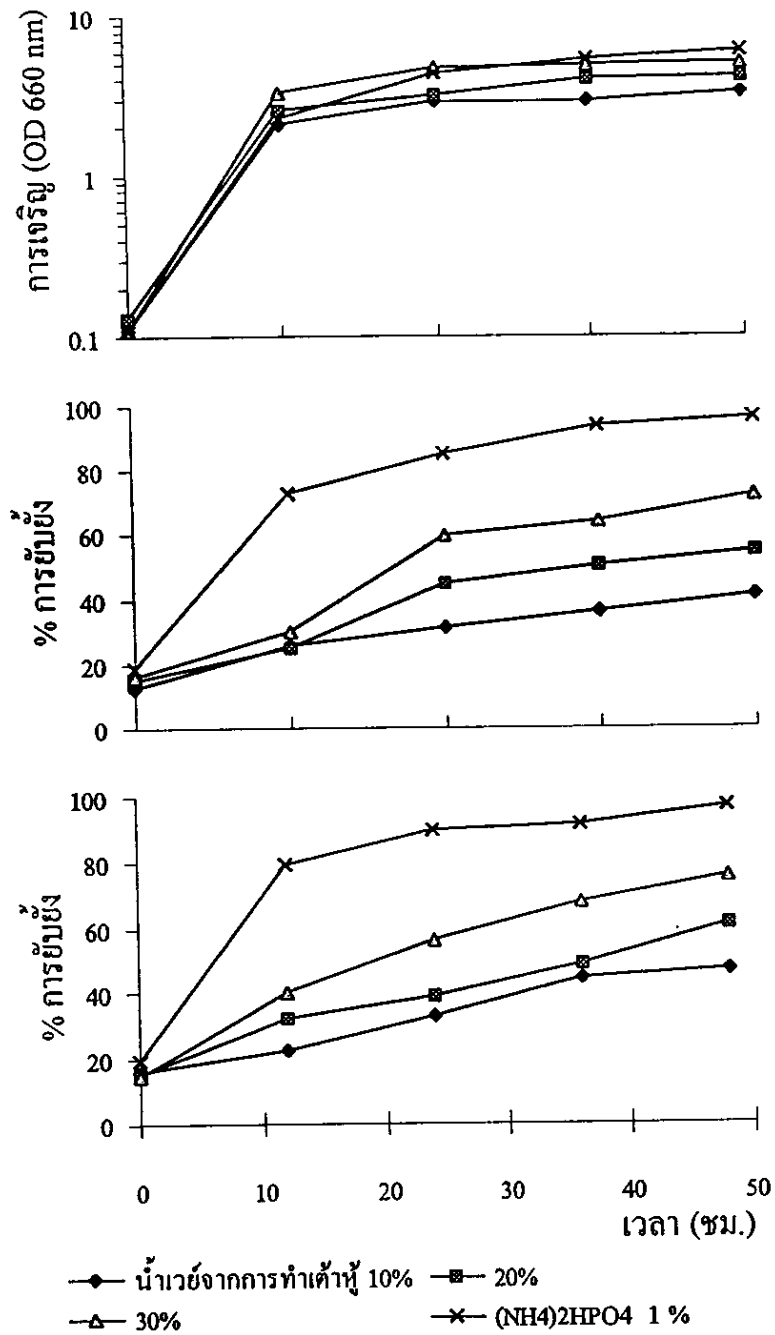
ภาพที่ 26 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา
 ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 27 ผลของโมลาสและซูโครสต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 28 ผลของน้ำเวย์จากการทำน้ำเต้าหู้และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 29 ผลของน้ำเวียงจากการทำน้ำเต้าหู้และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 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 เอี่ยมพรรัตน์ (2531) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* KUBA 8612 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะนั้นจะขาดกลูโคสและ L-asparagine ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนไม่ได้ แต่สามารถใช้กากถั่วเขียวเป็นแหล่งไนโตรเจนแทน L-asparagine

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

ข. การผลิตสารปฏิชีวน์ต่อเชื้อราจาก *Bacillus* โดยการเลี้ยงในถังหมักขนาด 3 ลิตร

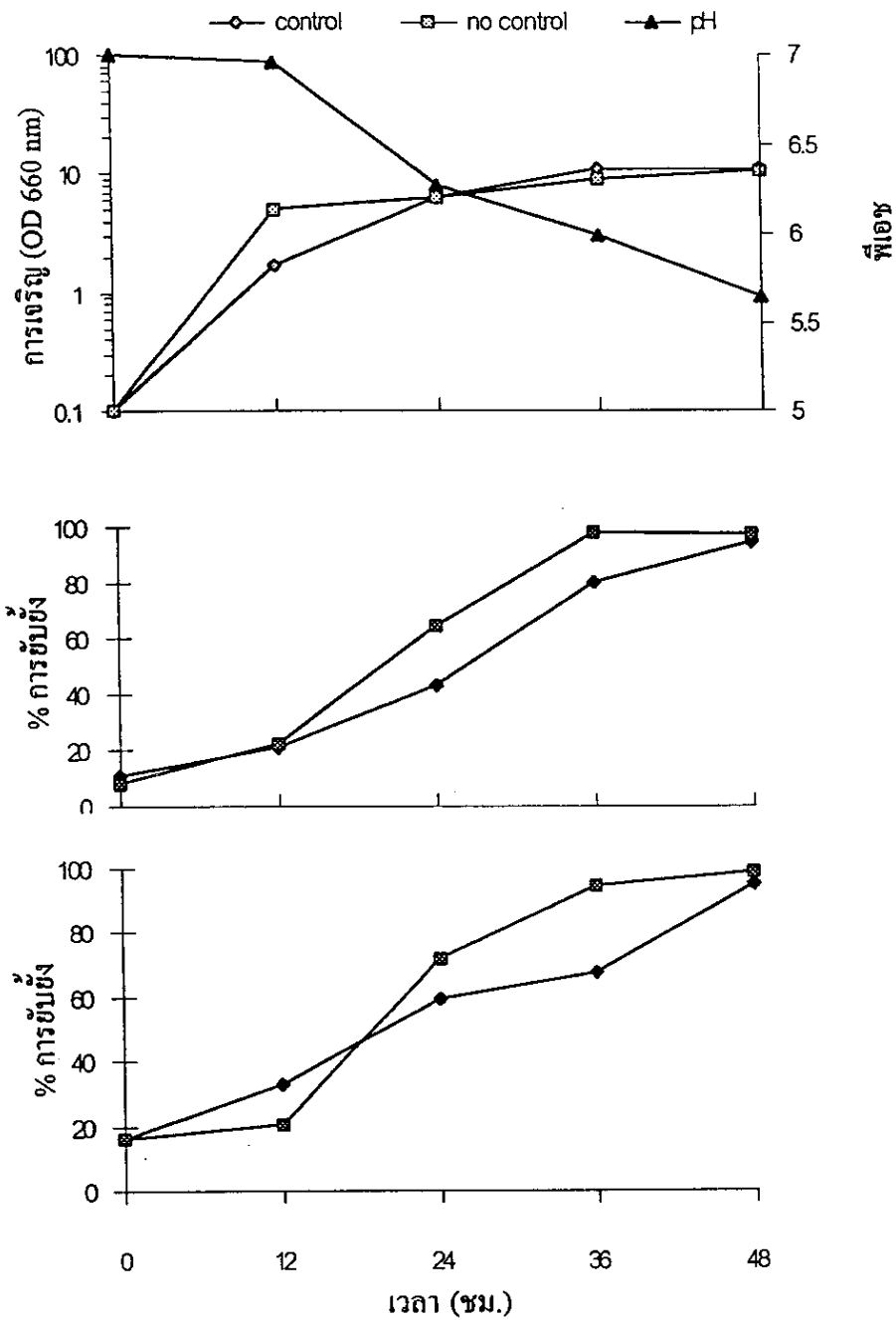
ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชเริ่มต้น และความเข้มข้นของอัตราอาหารและอัตราการใช้อากาศ รวมทั้งจลนพลศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* สองสายพันธุ์ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเหลว (ซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาบนเครื่องเขย่า) ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร Mckeen ที่ปรับปรุง ประกอบด้วย sucrose 50.0 ก/ล, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 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

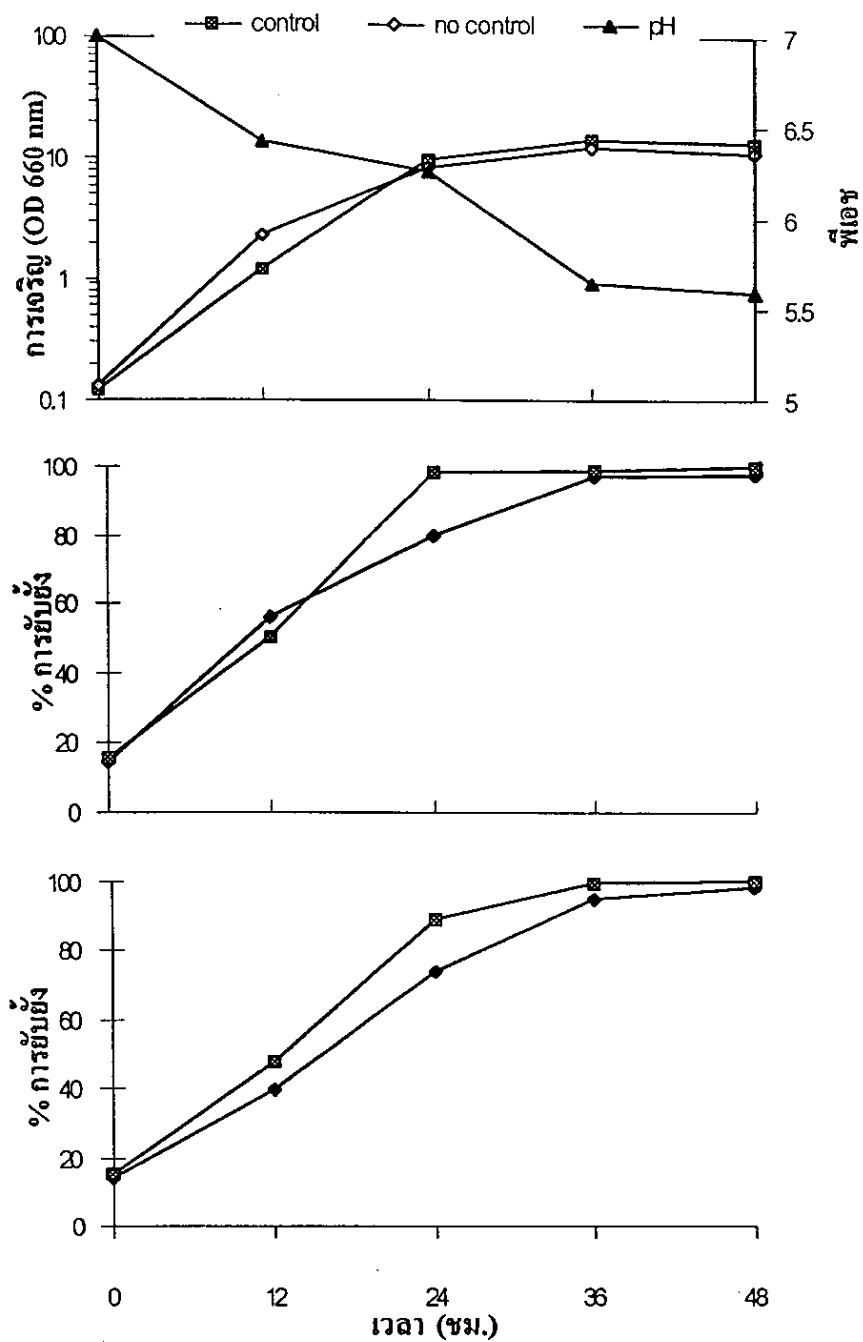
เปรียบเทียบผลการผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (ภาพที่ 30) และ *Bacillus* sp. LN 007 (ภาพที่ 31) เมื่อมีการควบคุมและไม่ควบคุมฟิเอชเริ่มต้น โดยใช้อาหารที่มีฟิเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1.0 VVM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อไม่มีการควบคุมฟิเอช เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีรวมทั้งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราได้ดีกว่าเมื่อควบคุมฟิเอชและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 53, 54, 55 และ 56) โดยสารที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* NSRS 89-24 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

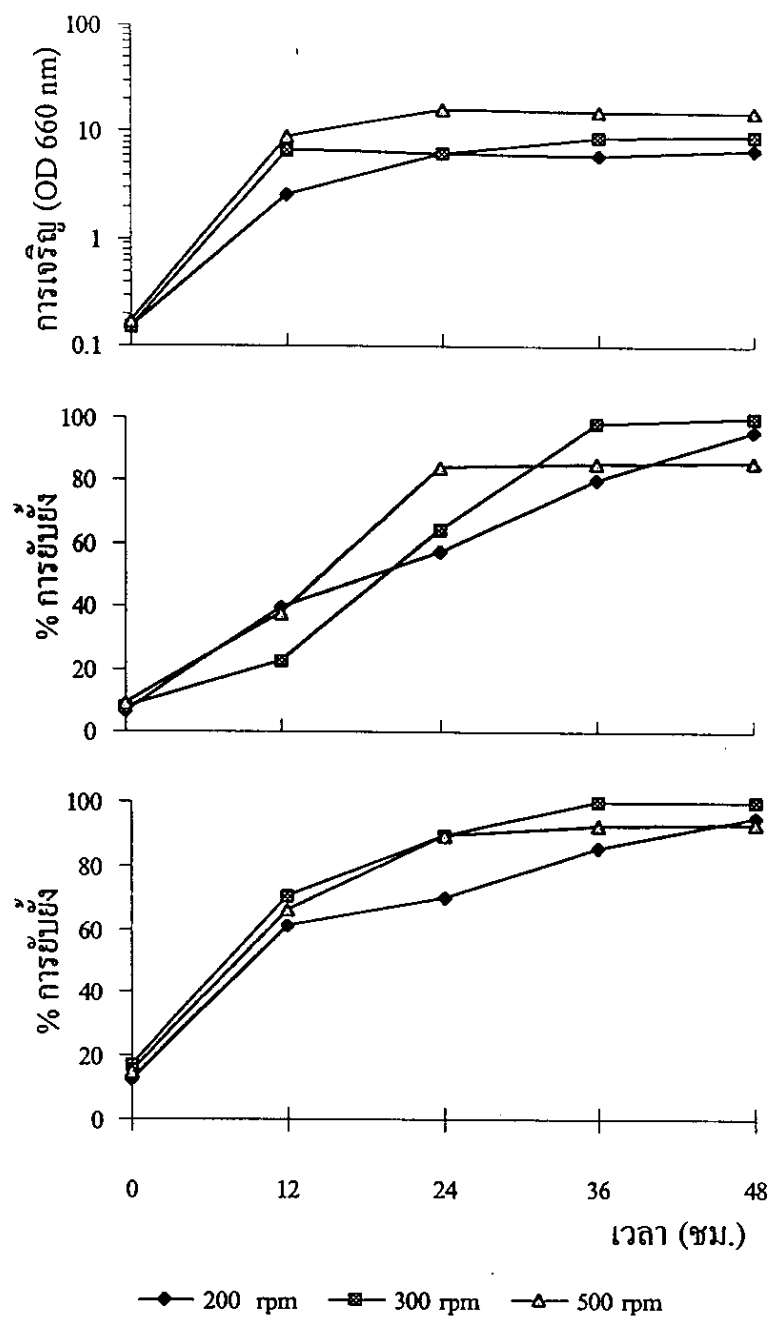
การเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนที่ 200 300 และ 500 รอบต่อนาที โดยควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 VVM และไม่มีการควบคุมฟิเอชเริ่มต้น พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ดี และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 57, 58, 59 และ 60) โดยสารที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 (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



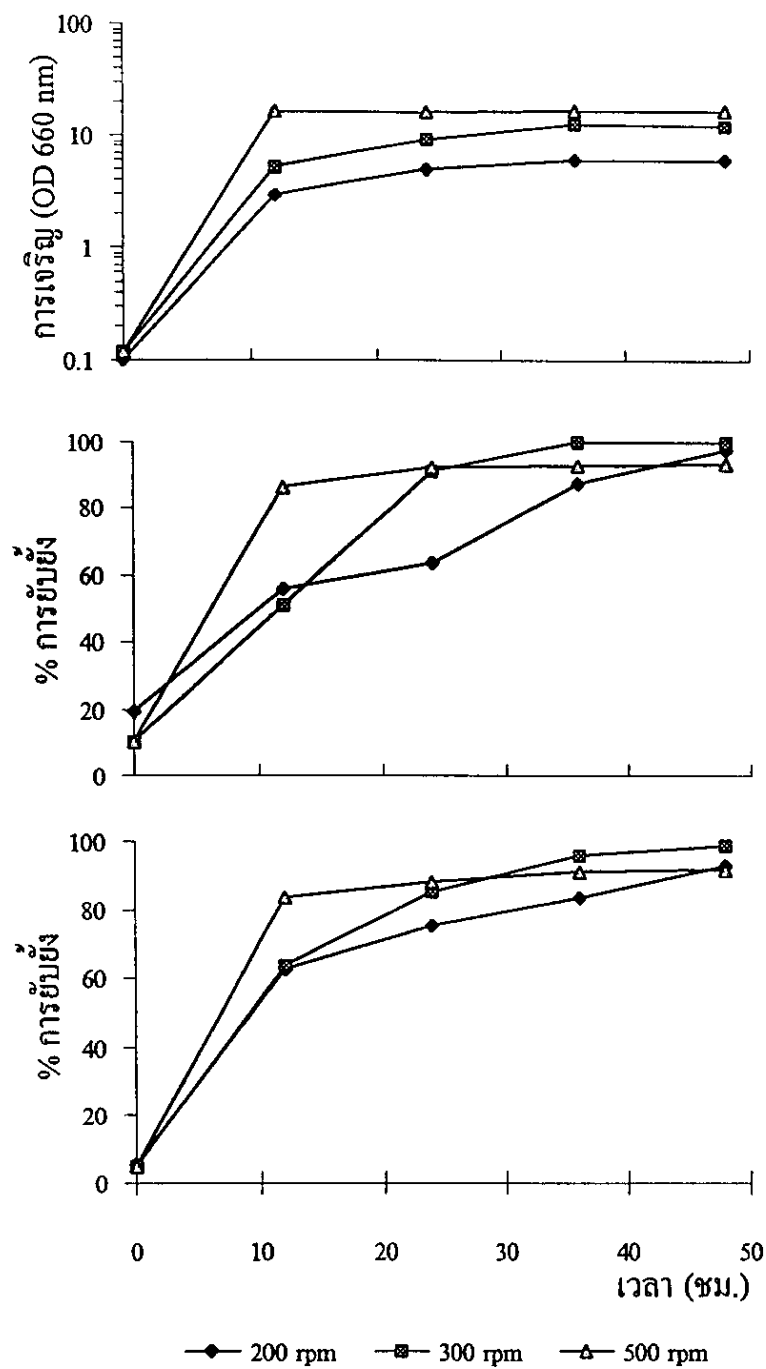
ภาพที่ 30 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS 89-24



ภาพที่ 31 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราของ *Bacillus* sp. LN 007



ภาพที่ 32 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* NSRS 89-24



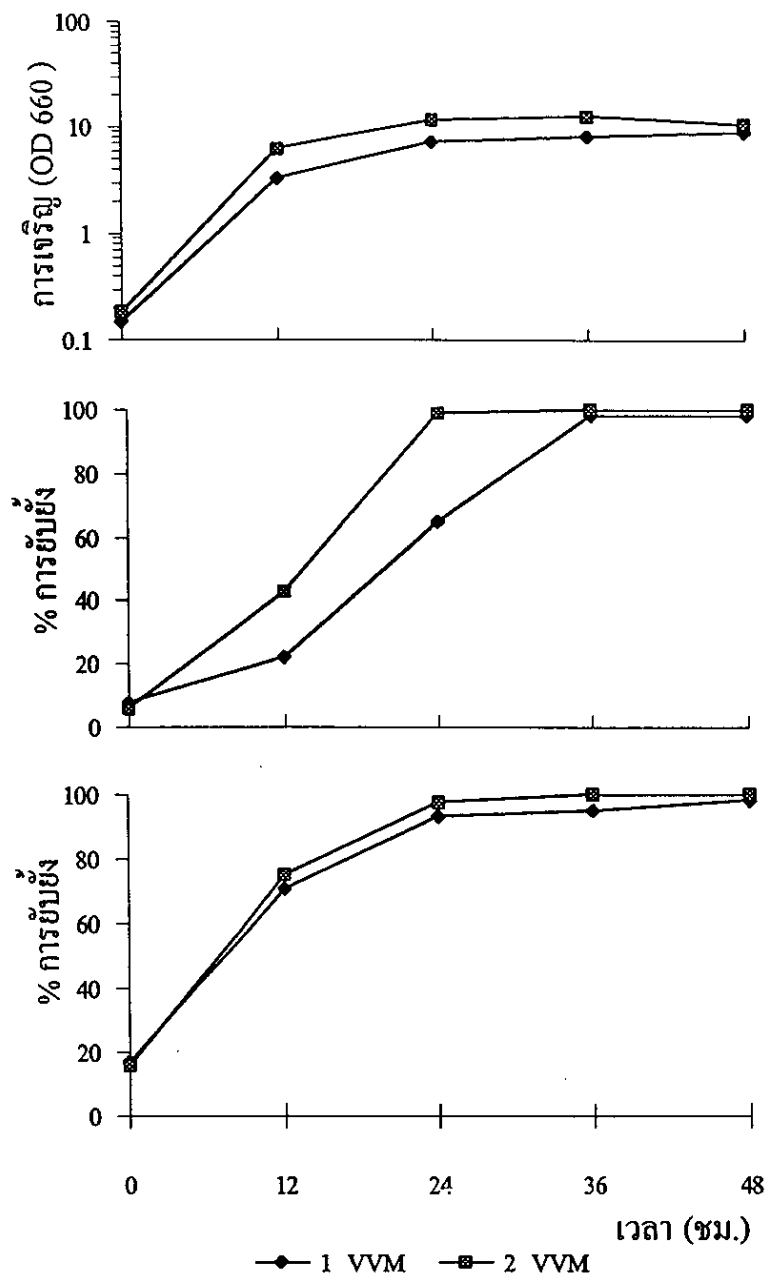
ภาพที่ 33 ผลของอัตราความเร็วต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา
 ของ *Bacillus* sp. LN 007

3. ผลของอัตราการให้อากาศ

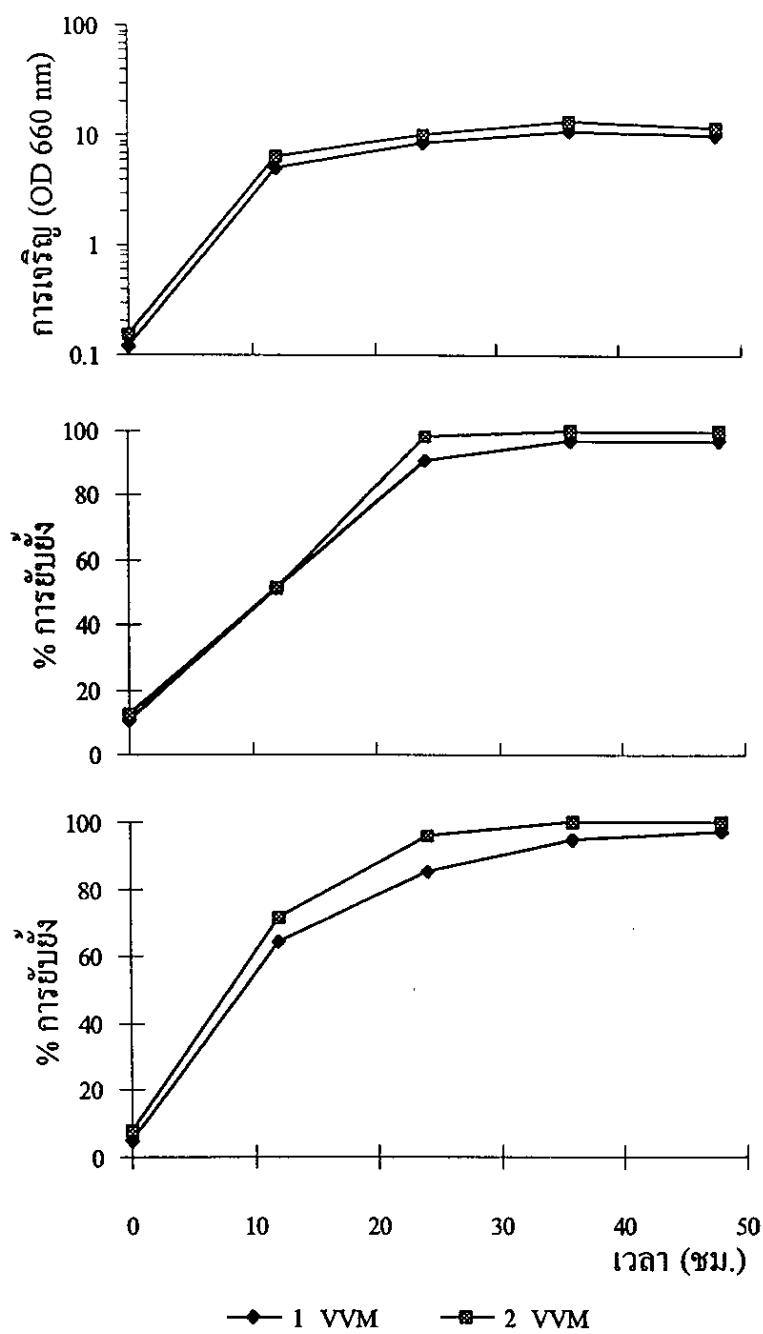
การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในถังหมักที่มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอช เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบอัตราการให้อากาศระหว่าง 1 และ 2 VVM ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการให้อากาศ 2 VVM เชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์เจริญและผลิตสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราได้ดี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

สุชาดา กุชัยสิทธิ์ (2535) ผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* B31 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ คือ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0-1.25 VVM และอัตราการกวน 100-150 รอบต่อนาที ส่วน Sen และ Swaminathan (1997) ผลิต Surfactin จาก *B. subtilis* DSM 3256 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Surfactin คือ อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียสใช้อัตราการกวน 140 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.75 VVM



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

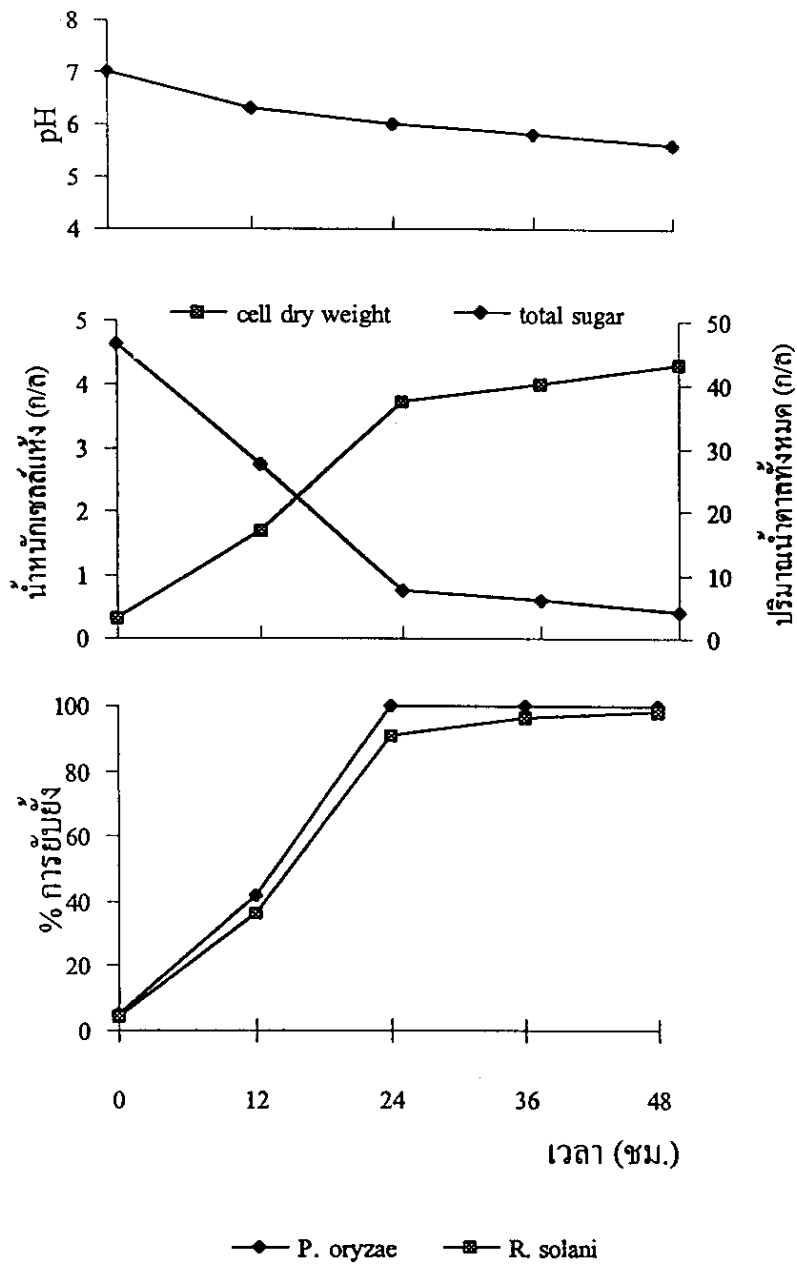


ภาพที่ 35 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา
ของ *Bacillus* sp. LN 007

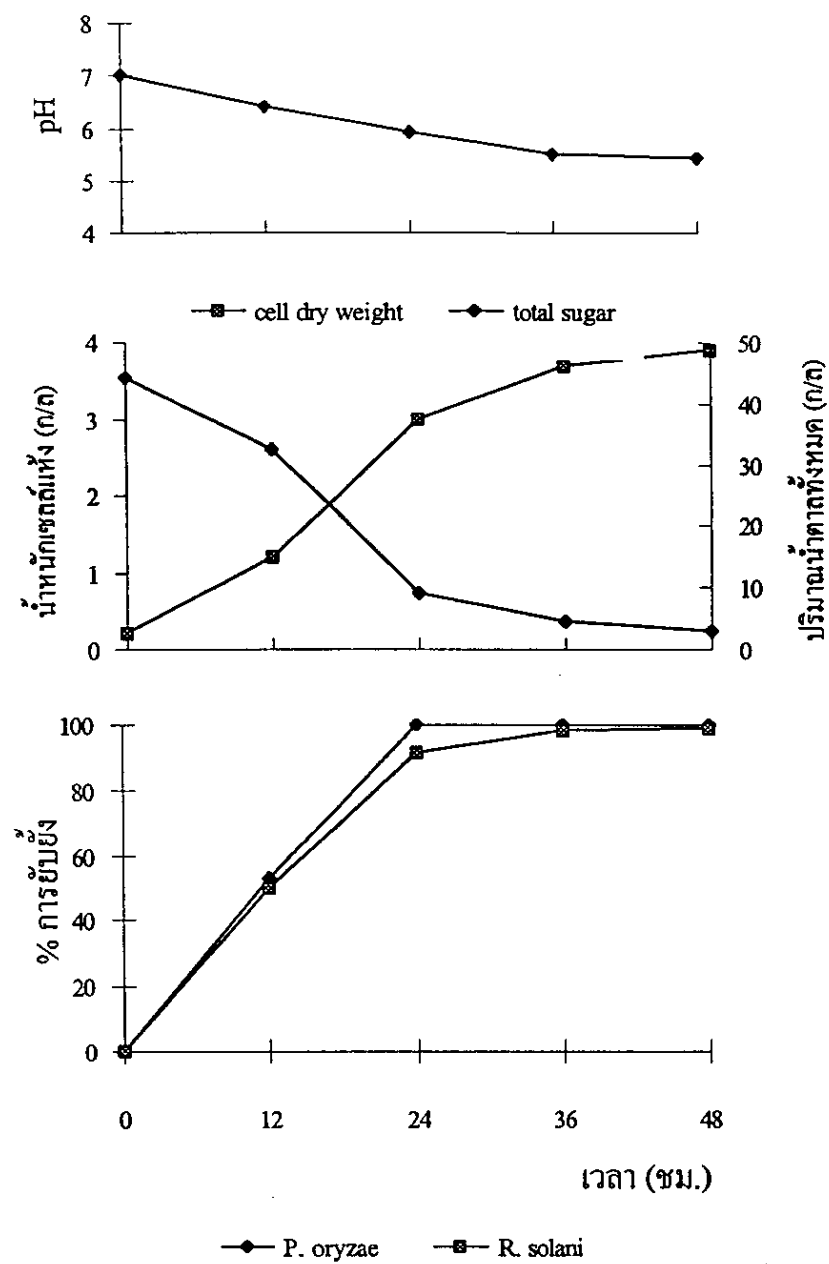
4. จลนพลศาสตร์ของการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ *Bacillus* สองสายพันธุ์

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) และมีสภาวะที่เหมาะสมจากการเลี้ยงเชื้อในฟลาสกับบนเครื่องเขย่า (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 ฟีเอช และการ
สร้างสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญ
ในอาหารสูตร 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%)

การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในการผลิตอสังขัตยอุตสาหกรรม 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 โดยที่มีน้ำตาลเหลืออยู่ 35 กรัมต่อลิตร สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบว่ายับยั้งได้ 60-63 % เมื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

- ดวงพร คันธ โชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร.
- ธีร โชติ มณี โชติ. 2537. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของหัวเชื้อ *Bacillus subtilis*. ปัญหา พิเศษ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประไพศรี สมใจ. 2538. การผลิตสารชีวภาพมีฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคพืชจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร.
- สมใจ เอี่ยมพรรณ์. 2531. ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่แยกได้และผลของ สารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพมหานคร.
- สายสนม เอนกผลิน. 2535. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา สาเหตุโรคพืชบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุชล แก้วพรหม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุชาดา คูชัยสิทธิ์. 2535. การผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Bacillus subtilis*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรณ์. 2532 ก. การผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในอาหาร สัตว์และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็น โรคในสัตว์เศรษฐกิจ : การควบคุม การผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยสารอาหารคาร์บอน. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 22 (1) : 1-18.
- อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรณ์. 2532 ข. การผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในอาหาร สัตว์และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็น โรคในสัตว์เศรษฐกิจ : การควบคุม การผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยสารอาหารไนโตรเจน. 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. Virginia. 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 fermentation. *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% + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1% โดยเติมและไม่เติมแร่ธาตุตามสูตร Mckeen ผลการทดลองดังแสดง

ในรูปที่ 1 *Bacillus* NSRS -89-24 สามารถเจริญในอาหารทั้ง 2 ชนิดได้ดี โดยการเจริญในอาหารที่ไม่เติมแร่ธาตุจะดีกว่าเมื่อเติมแร่ธาตุเล็กน้อยมี OD_{660} สูงสุดเป็น 7.47 เมื่อเลี้ยงได้ 36 ชม.

สำหรับการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวพบว่าเมื่อ *Bacillus* NSRS -89-24 เจริญได้ 36 ชม. ในอาหารที่มีแร่ธาตุจะยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้ 81.30 % แต่อาหารที่ไม่มีแร่ธาตุยับยั้งได้ 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 % ให้อากาศ 1 VVM ที่อุณหภูมิ 35 °C ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่า *Bacillus* NSRS 89-24 เจริญได้สูงสุดที่ 36 ชม. โดยมีค่า OD_{660} 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 พบว่าการเจริญสูงที่สุดมี OD_{660} 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_{660} เป็น 4.62 เมื่อตรวจเช็คการปนเปื้อนพบว่าการปนเปื้อนเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 48 ชม.เช่นกัน เมื่อนำน้ำหมักมาทดสอบการยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้สูงสุดเป็น 56 % (ที่ 18 ชม.)

2.การเตรียมสูตรเชื้อ

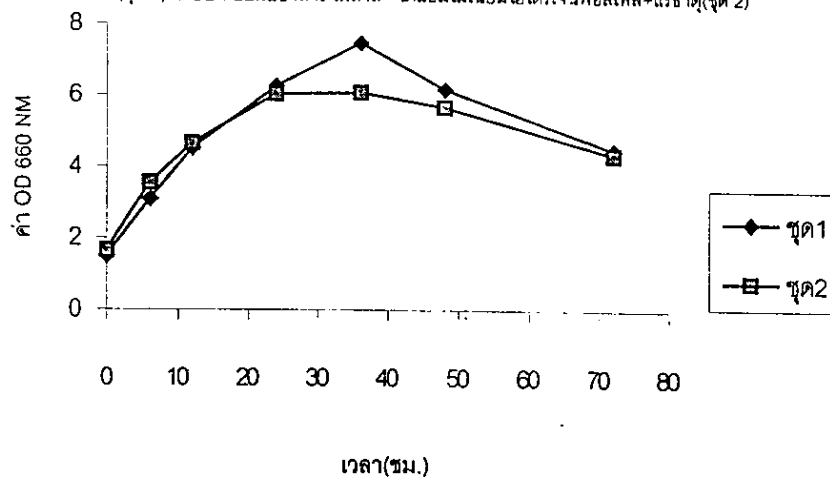
2.1 สูตรแห้งและสูตรน้ำ

ได้ทดสอบสูตรแห้งที่เตรียมโดยมี CMC 5% และ 10% (ของอาจารย์ขวัญจิต 1 และ 2) ในการเกาะติดใบเปรียบเทียบกับสูตรน้ำ (CMC 1%) โดยตรวจหาเชื้อที่เวลา 30 นาที และ 7 วันหลังการฉีดต้นข้าว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าในสูตรแห้งความสามารถในการเกาะติดไม่แตกต่างกัน แต่ในสูตรน้ำที่มีการเติม CMC 5% มีการเกาะติดใบดีกว่าเมื่อใช้ CMC 1 %

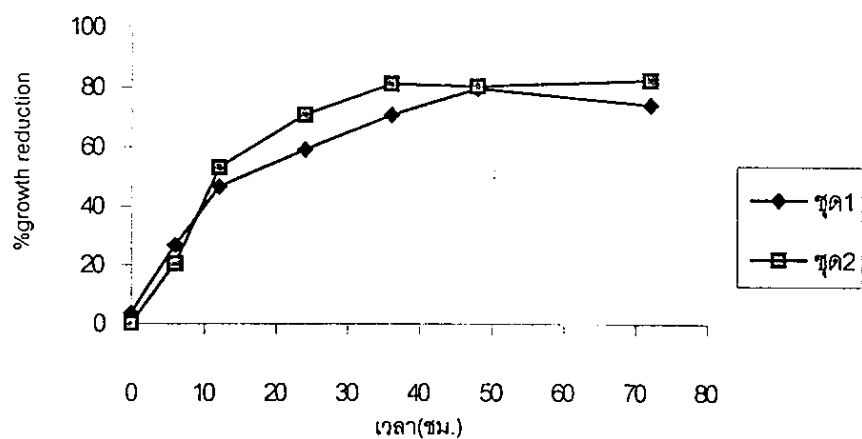
2.2 การเจริญของเชื้อจากสูตรแห้งและสูตรน้ำ

ได้ทดลองใช้สูตรแห้งและสูตรน้ำเจือจางโดยใช้ 1 กรัม หรือ 1 มล. ผสมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มล. แล้วดูด 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%

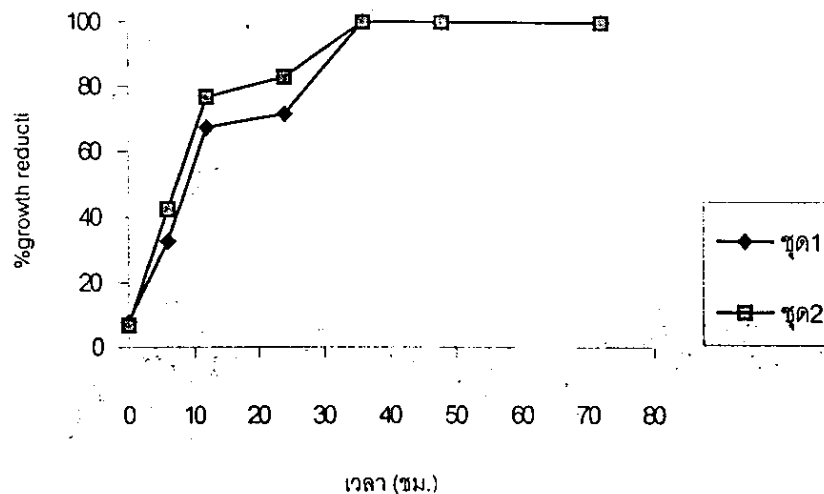
รูปที่ 1.1 การเจริญของเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 ในอาหาร โมลัส+ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(จุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร โมลัส+ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต+แร่ธาตุ(จุด 2)

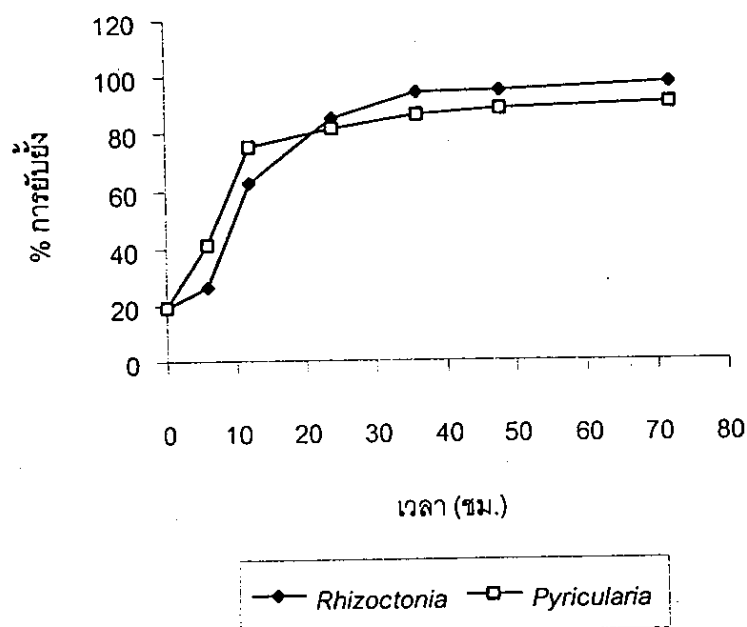
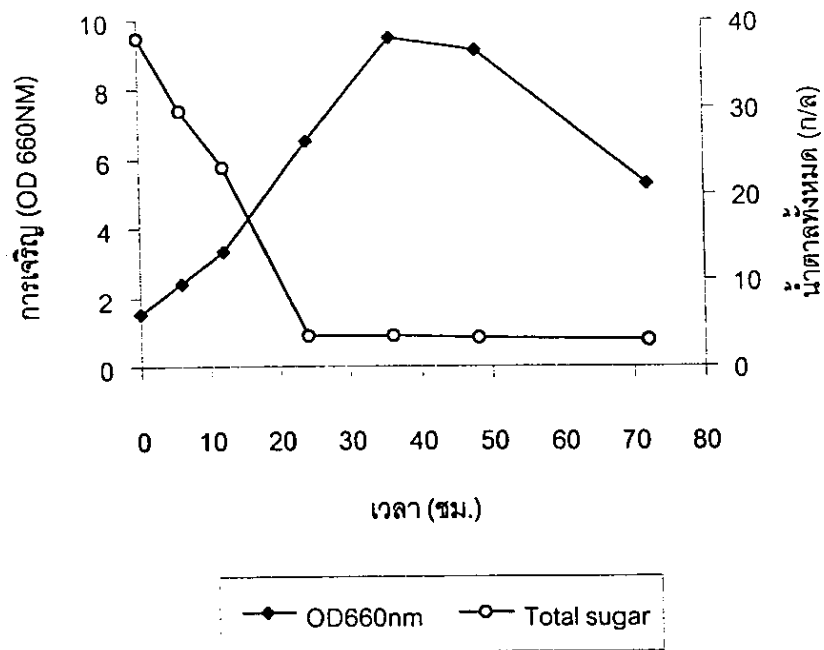


รูปที่ 1.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในอาหาร โมลัส+ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(จุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร โมลัส+ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต+แร่ธาตุ(จุด 2) ของเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24

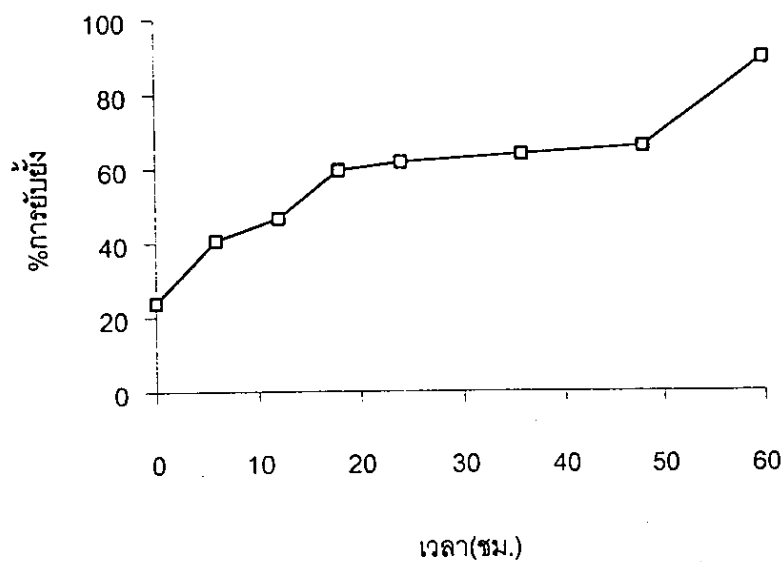
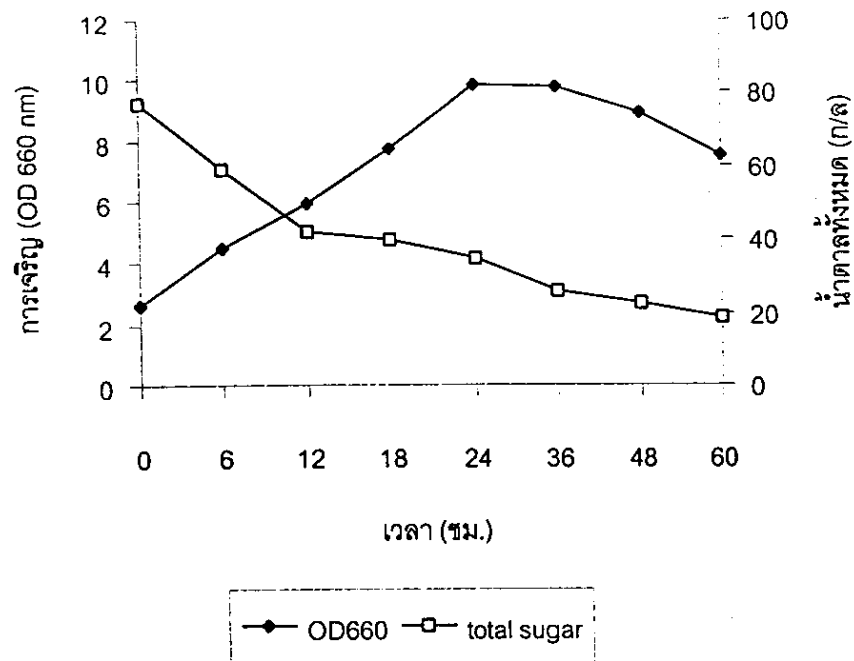


รูปที่ 1.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในอาหาร โมลาส+ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(ชุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร โมลาส+ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต+แร่ธาตุ(ชุด 2) ของเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24

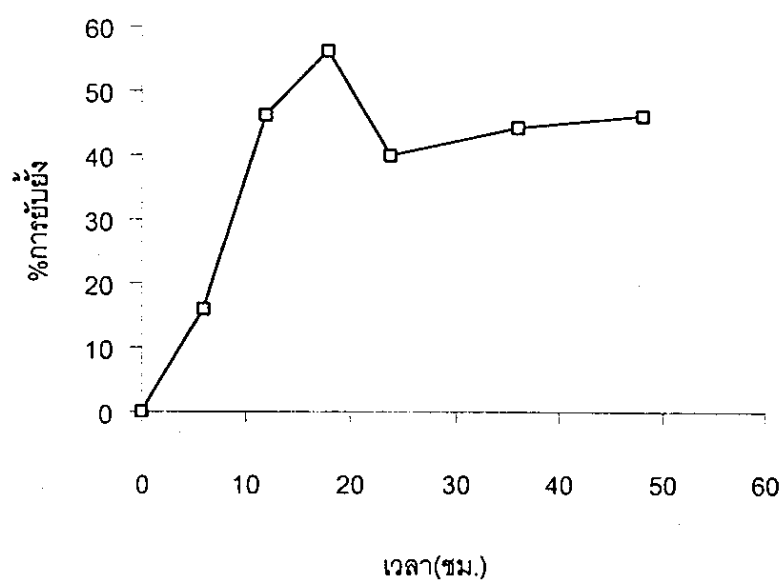
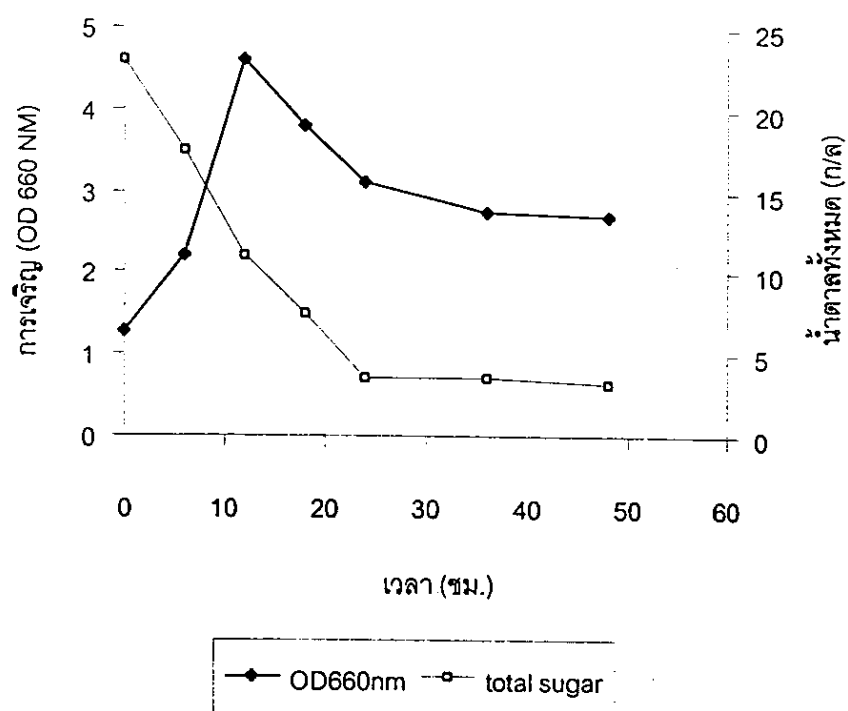




ภาพที่ 38 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในถังหมักขนาด 10 ลิตร (อาหารประกอบด้วยโมลาส 5% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1%)



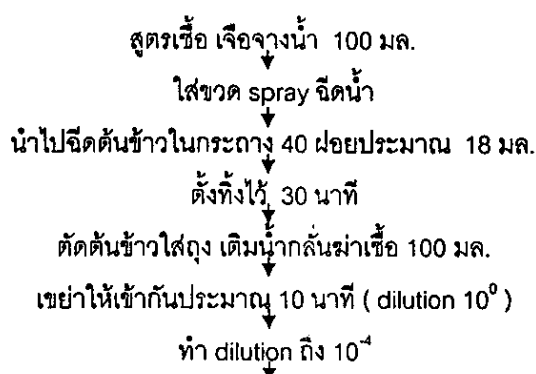
ภาพที่ 39 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด การเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตร (อาหารประกอบด้วยโมลาส 10% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1%)



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

วิธีการทดสอบฉีดต้นข้าว 17/1/41

- สูตร 1. Bacillus (ขั้วญาติ 1) ซั่ง 1 กรัมละลายน้ำ 100 มล.
- สูตร 2. Bacillus (ขั้วญาติ 2) ซั่ง 1 กรัมละลายน้ำ 100 มล.
- สูตร 3. เซลล์เปือก Bacillus MK007 + น้ำกลั่น -CMC 1% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.
- สูตร 4. เซลล์เปือก Bacillus MK007 + culture broth + CMC 1% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.
- สูตร 5. เซลล์เปือก Bacillus MK007 + น้ำกลั่น -CMC 5% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.
- สูตร 6. Bacillus MK 007 (ขั้วญาติ 1) ซั่ง 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 (ขั้วญาติ 1)	4×10^7	2.6×10^7	4.3×10^5
2 (ขั้วญาติ 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 สูตรน้ำกลั่นCMC 5%	1×10^7	1.7×10^7	4.6×10^5
6 (ขั้วญาติ 1) 0.4กรัม	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. สูตรแห้งขั้วญาติ 1
2. สูตรแห้งขั้วญาติ 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 ₆₆₀			
	ขั้วจุด 1	ขั้วจุด 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

ข้อมูลจากคุณสมบัติ 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 แต่ผลการทดลองคือเชื้อไม่เจริญและได้ให้ทางผมทดสอบว่าจะมีผลมาจากโมลาสที่ใช้และน้ำมันพืชหรือไม่ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 สรุปได้ว่าโมลาสและน้ำมันพืชที่ใช้ทดลองไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* MK007

จากข้อมูลที่ได้รับเกี่ยวกับการใช้ถังหมัก 1000 ลิตร ใช้โมลาสมี

reducing sugar	20 กรัม/ลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	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. สภาวะที่เลี้ยง

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 คย. (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 ลิตรจนถึงการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่วันที่ 0 - 24 ชม. พบว่ามีเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 เจริญเพียงอย่างเดียวแต่ที่เวลา 48 ชม. มีเชื้อปนเปื้อนและไม่พบ B-24 และเมื่อนำตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. ไปผ่านความร้อนที่ 80° นาน 30 นาทีพบว่าไม่มีเชื้อเจริญเช่นเดียวกัน ลักษณะโคโลนีของเชื้อปนเปื้อน รูปร่างกลม สีครีมขุ่น มีเมือกเยิ้ม กลิ่นเปรี้ยว

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

เนื่องจากตรวจไม่พบเชื้อปนเปื้อนที่เวลา 0 และ 24 ชม. ของการเพาะเลี้ยงแสดงว่ามีการปนเปื้อนในระหว่างการหมักคาดว่าน่าจะมาจากอากาศเข้าถัง

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. สภาพการเลี้ยงเช่นเดียวกับ *Bacillus* NSRS 89-24

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

เวลาเก็บ ดย. (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 VVM ความเร็วในการกวน 200 rpm อุณหภูมิ 35⁰ซ ที่เอชเริ่มต้น 7 เลี้ยง 72 ชม.

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

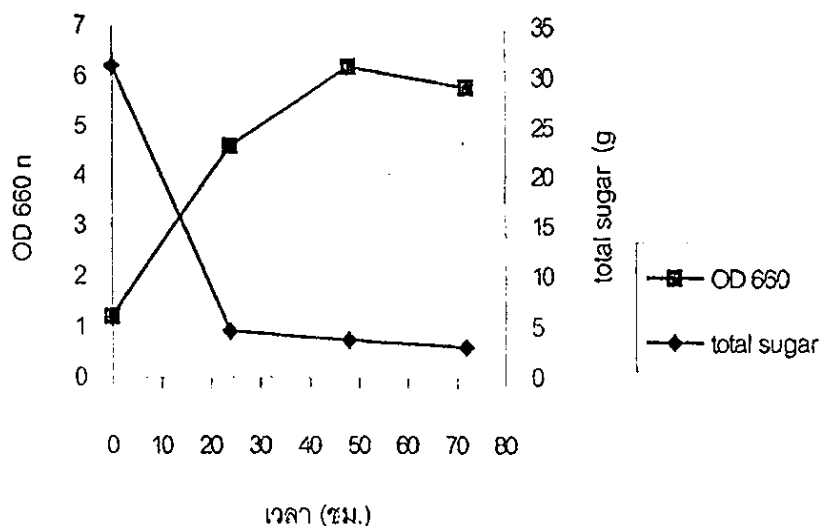
เวลา (ชม.)	OD ₆₆₀	pH	total sugar	เชื้อก่อนให้ความร้อน	เชื้อหลังให้ความร้อน	%growth reduction	cell dry weight g/l
0	1.2	7.0	31.0	-	-	13.2	
24	4.6	6.3	4.6	5.0x10 ⁸	3.8x10 ⁶	76.27	
48	6.2	6.0	3.7	7.8x10 ⁸	6.0x10 ⁸	88.12	
72	5.8	5.9	3.0	7.0x10 ⁸	6.3x10 ⁸	94.06	

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 35⁰ซ



5/5/41

การเลี้ยง *Bacillus* MK 007 ใน Shaker โดยใช้สูตรอาหาร

1. Molasses 5 % + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% (ใช้โมลาสของอาจารย์วิจิตร)
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

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

