บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารต้านเชื้อราจากขยะอินทรีย์

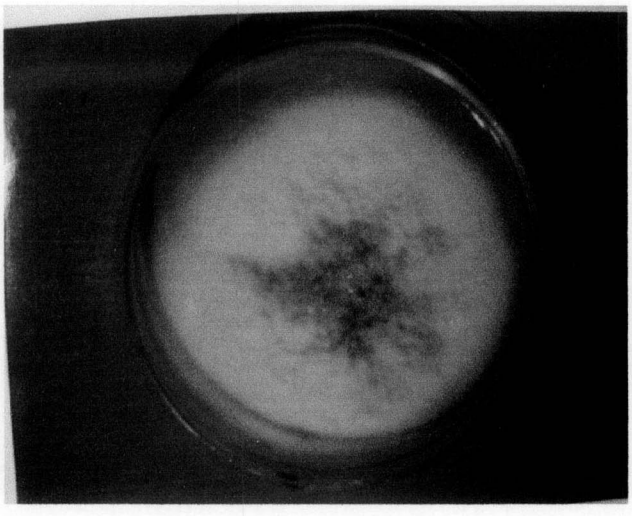
การเก็บตัวอย่างจากจุดกำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น บ้านซำจาน อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น คาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 151 ไอโซเลต เมื่อนำแต่ละไอโซเลตมาทดสอบการต้านเชื้อรา พบว่ามีเพียง 30 isolates (ตารางที่ 1) ที่สามารถแสดงกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่แยกได้มาทดสอบเพื่อดูความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อรา ด้วยวิธี well diffusion จะสังเกตเห็นวงใสรอบๆ หลุม (inhibition zone) ที่หยด supernatant ของเชื้อลงไปจากวิธีดังกล่าวบ่งชี้ว่า **แบคทีเรีย** isolate B11, D168 และ S 32 ที่คัดแยกได้จากจุดกำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น สามารถผลิตสารต้านการเจริญของเชื้อรา ด้วยการแสดงค่าวงใสกว้าง 15 mm, 14 mm และ 16 mm ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงผลของแหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้

ตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลต
1	ที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น (ความลึก 5 นิ้ว) จุดที่ 1	8.3×10^8	6
2	ที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น (ความลึก 5 นิ้ว) จุดที่ 2	5.6×10^9	5
3	ที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น (ความลึก 20 นิ้ว) จุดที่ 1	2.56×10^7	4
4	ที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น (ความลึก 20 นิ้ว) จุดที่ 2	2.89×10^7	3
5	ดินจากที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น	7.5×10^9	5
6	ขยะเหลวจากที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น	2.64×10^{10}	7
รวมจำนวนไอโซเลต			30

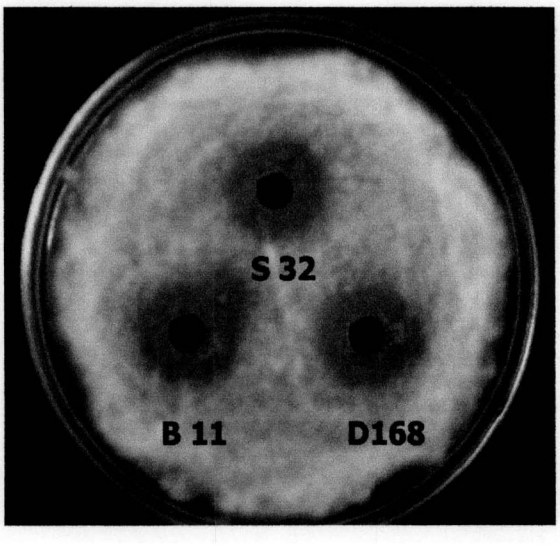
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนไอโซเลตที่มีผลต้านเชื้อราด้วยวิธี spot plate technique

ลำดับตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	หมายเลขไอโซเลต	ความกว้างของ inhibition zone (mm)
1	ที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น (ความลึก 5 นิ้ว) จุดที่ 1	SF 06	6
		SF 25	5
		SF 30	4
		SF 45	7
		SF 53	6
		SF 69	4
2	ที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น (ความลึก 5 นิ้ว) จุดที่ 2	SF 76	5
		SF 79	8
		SF 87	6
		SF 91	9
		SF 103	7
3	ที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น (ความลึก 20 นิ้ว) จุดที่ 1	D 08	4
		D 24	6
		D 34	7
		D 144	5
4	ที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น (ความลึก 20 นิ้ว) จุดที่ 2	D 54	5
		D168	**14**
		D197	8
5	ดินจากที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น	S 06	5
		S 10	6
		S 24	8
		S 32	**16**
		S 44	9
6	ขยะเหลวจากที่กำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น	B 05	7
		B 08	6
		B 11	**15**
		B 20	8
		B 35	10
		B 42	5
		B 55	9



รูปที่ 1 เชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp. *lycopersici* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp. *lycopersici* บนอาหาร Potato Dextrose Agar จากส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต B11, D168 และ S 32 ที่ที่อุณหภูมิ 35°C อายุการเลี้ยงเชื้อที่ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี well diffusion technique (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 Inhibition zone ของเชื้อ *Fusarium oxyspourm* f.sp. *lycopersici* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารออกฤทธิ์ที่มาจากส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต B11, D168 และ S 32 ที่ที่อุณหภูมิ 35°C อายุการเลี้ยงเชื้อที่ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี well diffusion technique

2. ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต B11, S32 และ D168 ที่อุณหภูมิ 35^{0}C และตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง การวิเคราะห์ผลโดยการวัดขนาดของวงใสรอบหลุม (inhibition zone) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต B11, S32 และ D168 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ขนาดกว้างของวงใสที่ 21, 22 และ 19 มม. ซึ่งเป็นวงใสที่มีขนาดกว้างที่สุดของแต่ละไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพของการสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิ 35^{0}และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลต B11, D168 และ S 32 โดยใช้เกณฑ์การวัดขนาดความกว้างของ inhibition zone (mm)

ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ชม.)	ขนาดของ inhibition zone (mm) ที่เชื้อราถูกยับยั้ง		
	Isolate B11	Isolate S32	Isolate D168
24	15	14	14
48	21	22	19
72	19	21	17

ผลจากตารางที่ 3 พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S32 สามารถยับยั้งเชื้ออราได้วงใสสูงเท่ากับ 22 มม. จากเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง จึงนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S32 มาทำการทดลองความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ด้วยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25^0, 30^0, 35^0, 37^0 และ 45^{0}C เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เวลา 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการนำส่วนใสของแต่ละช่วงเวลาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี well diffusion method พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35^0 และเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลต S 32 ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้เกณฑ์การวัดขนาดความกว้างของ inhibition zone (mm)

ระยะเวลาในการพาะเลี้ยงแบคทีเรีย S32	ช่วงอุณหภูมิที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย S32				
	25^{0}C	30^{0}C	35^{0}C	40^{0}C	45^{0}C
6	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
24	5	12	19	11	-
48	7	23	32	20	-
72	4	21	25	18	-

หมายเหตุ (-) หมายถึง ไม่สามารถสังเกตเห็น inhibition zone ได้อย่างชัดเจน

3. การเตรียมตะกอนสารต้านเชื้อรากึ่งบริสุทธิ์

ผลการทดลองจากตารางที่ 2 และ ตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย isolate S32 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคภายใต้การศึกษาได้ดีที่สุด จึงขอคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 มาศึกษาต่อไป

ผลการเตรียมตะกอนของสารละลายออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *Fusarium oxyspourm* f.sp. *lycopersici* crude fungicide จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต S32 ด้วยสาร ammonium sulfate 65% saturation และเก็บตะกอนในรูปแห้งแล้ว ชั่งน้ำหนักตะกอนแห้งได้ 1.16 กรัม ต่ออาหารเหลวในปริมาตร 1 ลิตรเมื่อนำตะกอนแห้งละลายใน 0.85% normal saline solution มาทดสอบประสิทธิภาพอีกครั้ง พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งยังคงอยู่

4. การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างของสารต้านเชื้อรา

4.1 เมื่อนำ crude fungicide หรือ supernatant จากแบคทีเรีย isolate S32 ที่สารต้านเชื้อราแช่ในอ่างปรับอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ เป็นเวลานาน 20 นาที เท่ากันทุกสภาวะ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถการยับยั้งพบว่ายังสามารถสังเกตเห็นลักษณะ Inhibition Zone ได้ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 40^0, 50^0, 60^0 และ 70^0C ขนาดของ Inhibition Zone จะเล็กลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และหาระดับอุณหภูมิสูงกว่านี้จะไม่สามารถสังเกตลักษณะ Inhibition Zone ได้เลย แสดงว่าสารต้านเชื้อรานี้สามารถคงทนอยู่ได้ที่ระดับอุณหภูมิสูงสุด 70^0C เป็นเวลานาน 20 นาที (ตารางที่ 5)

4.2 เมื่อนำตะกอนแห้งที่ได้จากการตะกอน crude fungicide หรือ supernatant ของแบคทีเรีย isolate S32 ที่สร้างสารต้านเชื้อรามาละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างๆกัน เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา พบว่าที่ระดับ pH ในช่วง 5 - 8 จะสังเกตลักษณะ Inhibition Zone ได้ แต่ถ้าที่ระดับ pH สูงหรือต่ำกว่าช่วงนี้จะไม่สามารถสังเกตลักษณะ Inhibition Zone (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยความเสถียรของ crude fungicide จาก S32 ภายใต้สภาวะเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ต่างกัน

อุณหภูมิ (^{0}C)	40	50	60	70	100
Inhibition zone (mm)	24±0.1	21.5±1.5	17±1.2	14.5±1.3	-

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยความความเสถียรของ crude fungicide จาก S32 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่ต่างกัน

pH	4	5	6	7	8	9
Inhibition zone (mm)	-	22±0.9	20±1.07	22±1	20±0.89	-

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici แบบปลูกในกระถาง

การยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici ไม่ให้ก่อโรค tomato wilt สำหรับต้นกล้ามะเขือเทศภายใต้การทดสอบ ด้วยการใช้ส่วนใสของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) แบคทีเรีย isolate S32 รดน้ำต้นกล้าสลับกับการรดน้ำธรรมดา (รูปที่ 3ค) ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ โดยจะเห็นได้ว่า ต้นกล้ามะเขือเทศภายใต้การทดลองที่ปล่อยให้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici บุกรุก จะมีการเจริญที่ช้ามาก สามารถเห็นความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 3ข) ในขณะที่กลุ่มต้นกล้ามะเขือเทศภายใต้การทดลองที่ปล่อยให้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici บุกรุก และได้รับการรดด้วย culture supernatant ของแบคทีเรีย isolate S32 ยังสามารถเจริญได้ตามปกติ แต่อัตราการเจริญยังน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย ส่วนต้นกล้ามะเขือเทศกลุ่มควบคุม สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ (รูปที่ 3ก) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า สารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 ได้มีกสรสร้างและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ จึงพบว่าออกฤทธิ์ได้จากการนำเอา culture supernatant มาใช้รดต้นกล้ามะเขือเทศ

รูปที่ 3ก

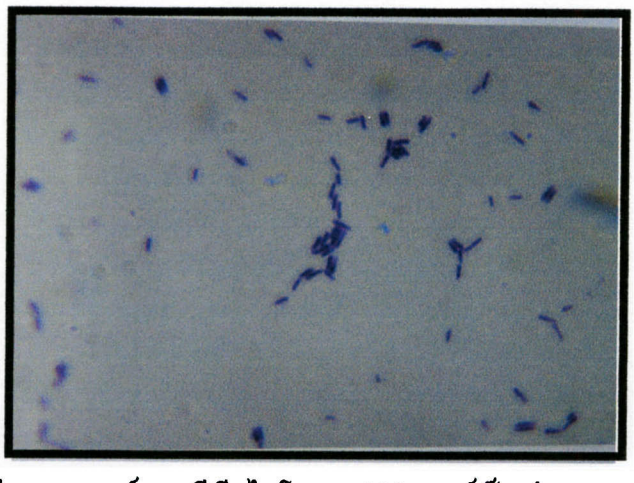
รูปที่ 3ข

รูปที่ 3ค

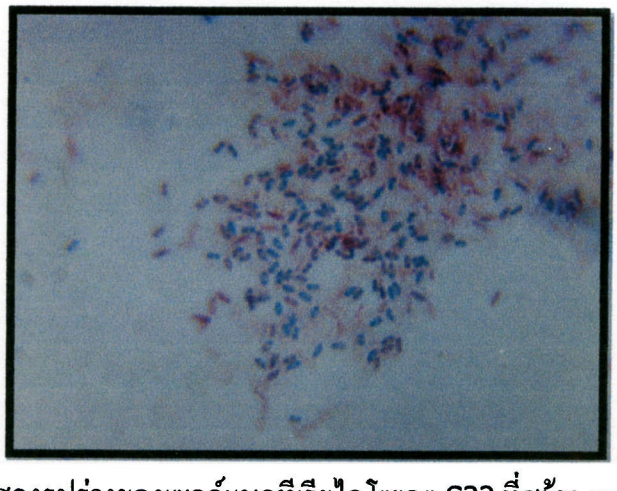
รูปที่ 3 ผลการทดลองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค tomato wilt ของต้นกล้ามะเขือเทศ ด้วยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici (Fol); รูปที่ 3ก : ต้นกล้ามะเขือเทศกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคและรดน้ำธรรมดา; รูปที่ 3ข : ต้นกล้ามะเขือเทศกลุ่มภายใต้การทดลองและได้รับเชื้อรา Fol; รูปที่ 3ค : ผลเปรียบเทียบการเจริญของต้นกล้ามะเขือเทศที่ได้รับได้รับเชื้อรา Fol และได้รับการรดน้ำด้วย culture supernatant จากแบคทีเรีย isolate S32 (รูปด้านซ้าย) กับต้นกล้าที่ได้รับเชื้อรา Fol และไม่ได้รับการรดน้ำด้วย culture supernatant (รูปด้านขวา)

6. การศึกษาลักษณะและเทียบเคียงบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียเป้าประสงค์

การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 ตามหนังสือ Bergey Mnaual of Determinative Bacteriology พบว่าแบคทีเรีย isolate S32 เป็นแบคทีเรีย Gram positive มีรูปร่างเป็นท่อนยาว (ดังรูปที่ 4) มีการสร้าง endospores (ดังรูปที่ 5) เมื่อเทียบเคียงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 เทียบเคียงได้กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis* โดยคำนวณจากค่า % similarity พบว่าแบคทีเรีย isolate S32 มีค่า % similarity เท่ากับ 91% (ตารางที่ 7) เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและค่า % similarity ทางชีวิเคมี สามารถที่จะคาดคะเนได้ว่าแบคทีเรีย isolate S32 ถูกจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Bacillus* และ specific epithet เป็น *subtilis*.



รูปที่ 4 แสดงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต S32 เซลล์เป็นท่อนยาวและเป็นแบคทีเรีย Gram positive



รูปที่ 5 แสดงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต S32 ที่สร้าง endospores

ตารางที่ 7 แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 เมื่อเทียบเคียงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis*

	คุณสมบัติทางชีวเคมี											
เชื้อแบคทีเรีย	Motility	Starch	Nitrate	Gelatin	Citrate	Catalasse	Lactose	Glucose	Xylose	Manitol	Arabinose	% Similarity*
B. lycheniformis	±	+	+	+	+	+	A	A	A	A	A	82
B. polymyxa	+	+	+	+	±	+	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	55
B. subtilis	±	+	+	+	+	+	-	A	A	A	A	91
Isolate S32	+	+	+	+	+	+	-	-	A	A	A	

หมายเหตุ : + positive

\- negative

A acid

A/G acid and gas

* % Similarity เป็นการคำนวณ % Similarity ระหว่างแบคทีเรีย isolate S32 กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis* ตามลำดับ

แสดงวิธีการคำนวณ% Similarity และการแปรผลในภาคผนวก จ