บทที่ 4

ผลการทดลอง

(Results)

1. การเพิ่มประชากรของแบคทีเรียและการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชจากจากน้ำเสียโรงงานผลิตแป้งขนมจีน

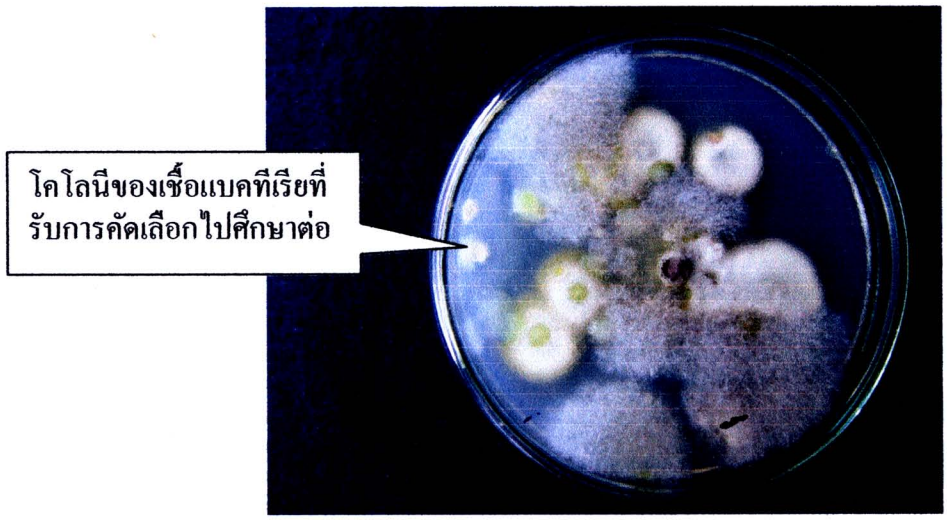
การเก็บตัวอย่างจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชนที่โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่ตำบลแก่งละว้า อำเภอชนบท จังหวัดขอนแก่น และบ้านหนองกุง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น คาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชในกลุ่ม *Fusarium oxysporum* และ *Colletotrichum* sp. การเพิ่มจำนวนประชากรแบคทีเรียจากน้ำเสียจากโรงงานผลิตขนมจีนด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Rice Starch Broth (RSB) แบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35^{o}C ตามด้วยการทำ serial dilution และตามด้วยการทำ spread plate technique สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เห็นการสร้าง clear zone บน Rice Starch Agar plate ได้ทั้งหมด 250 isolates (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ตามด้วยการทำ single colony isolation (รูปที่ 2) เมื่อนำแต่ละ isolate มาทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา พบว่ามีเพียง 11 isolates (ตารางที่ 2) ที่สามารถแสดงกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อราด้วยเทคนิคทาง dual culture technique (รูปที่ 3)

ตารางที่ 1 แสดงผลของแหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แหล่งที่	แหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย CFU/ml	จำนวนไอโซเลท
1	โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่ตำบลแก่งละว้า อำเภอชนบท จังหวัดขอนแก่น	7.3×10^{9}	145
2	โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่บ้านหนองกุง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น	5.6×10^{9}	105
รวมจำนวนไอโซเลท			250

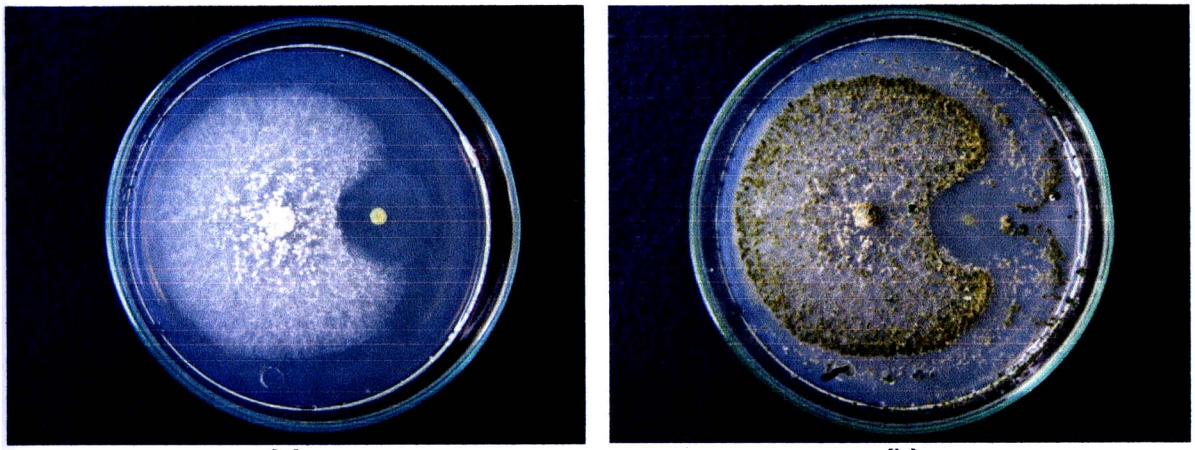
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่มีผลต้านเชื้อราด้วยวิธี dual culture technique

แหล่งที่	แหล่งเก็บตัวอย่าง	หมายเลขไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท
1	โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่ตำบลแก่งละว้า อำเภอชนบท จังหวัดขอนแก่น	WWPB 06	6
		WWPB 25	
		WWPB 30	
		WWPB 45	
		WWPB 53	
		WWPB 69	
2	โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่บ้านหนองกุง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น	WWPB 76	5
		WWPB 79	
		WWPB 87	
		WWPB 91	
		WWPB 103	
รวมจำนวนไอโซเลท			11



รูปที่ 1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Rice Starch Agar

รูปที่ 2 Single colony isolation ของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Rice Starch Agar (RSA)



(a) (b)

รูปที่ 3 วิธี dual culture technique สำหรับคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน (a) แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* ; (b) แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum anthracnose*

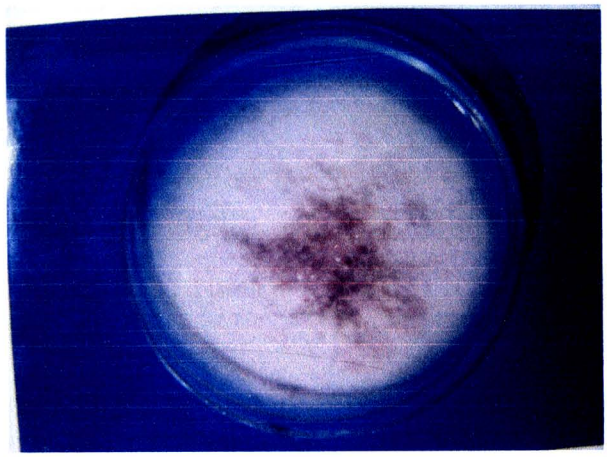
2. การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารต้านเชื้อรายับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี
Well Diffusion Technique (Mckeen, 1986)

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่แยกได้ ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35^{0}C อายุการเลี้ยงเชื้อที่ 72 ชั่วโมง นำส่วนใส (culture supernatant) มาทดสอบเพื่อดูความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici (รูปที่ 4) และ *Colletotrichum anthracnose* (รูปที่ 5) ด้วยวิธี well diffusion จะสังเกตเห็นวงใสรอบๆ หลุม (inhibition zone) ที่หยด supernatant (รูปที่ 6) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทภายใต้การทดสอบลงไป เมื่อคำนวณหาค่า Percentage Fungal Inhibition (PFI) (ตารางที่ 3) เพื่อบ่งชี้ความสามารถของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในการต้านการเจริญของเชื้อรา ตามค่า PFI (%) บ่งชี้ว่า แบคทีเรีย isolates WWPB25, WWPB30, WWPB76 และ WWPB79 มีค่า PFI เท่ากับ 60, 54, 62 และ 54 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 6) พร้อมได้ถูกคัดเลือกไปศึกษาต่อ

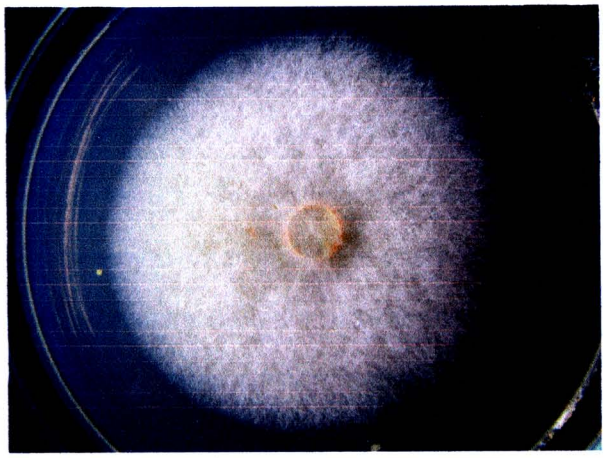
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แสดงค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในรูปของค่า Percentage fungal inhibition (%) คำนวณจากวิธี well diffusion technique (ดูภาคผนวก จ)

แหล่งที่	แหล่งเก็บตัวอย่าง	หมายเลขไอโซเลท	Percentage fungal inhibition (%)
1	โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่ตำบลแก่งละว้า อำเภอชนบท จังหวัดขอนแก่น	WWPB 06	15
		WWPB 25	**60**
		WWPB 30	**54**
		WWPB 45	10
		WWPB 53	16
		WWPB 69	26
2	โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่บ้านหนองกุง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น	**WWPB 76**	**62**
		WWPB 79	**54**
		WWPB 87	21
		WWPB 91	17
		WWPB 103	24

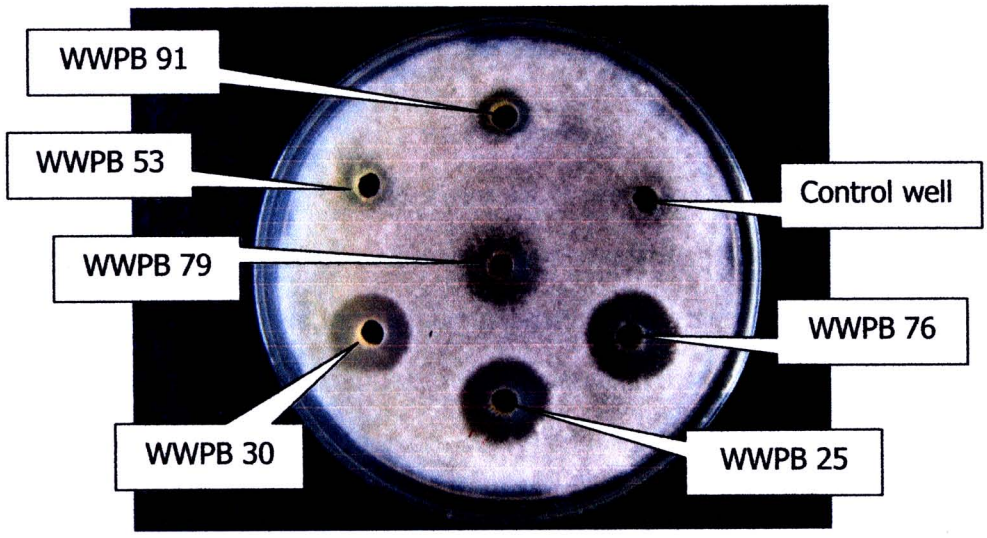
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 4 เชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp. *lycopersici* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar



รูปที่ 5 เชื้อรา *Colletotrichum anthracnose* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar



ผลการเปรียบเทียบสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp. lycopersici และ เชื้อรา *Colletotrichum anthracnose* บนอาหาร Potato Dextrose Agar ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ เพราะว่าแบคทีเรียไอโซเลท WWPB 25, WWPB 30, WWPB 76 และ WWPB 79 ต่างมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp. *lycopersici* และ เชื้อรา *Colletotrichum anthracnose* ได้ทั้ง 2 ชนิดของเชื้อราก่อโรคพืช (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 79 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย isolate อื่น ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงเลือกจะศึกษาเพียง 3 isolates คือ WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่า Percentage Fungal Inhibition (%) สำหรับสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp. lycopersici และ เชื้อรา *Colletotrichum anthracnose*

แหล่งที่	หมายเลขไอโซเลท	Percentage fungal inhibition (%)	
		F. oxyspourm f.sp. *lycopersici*	*C. anthraxnose*
1	WWPB 06	15	0
	WWPB 25	**60**	**57**
	WWPB 30	**54**	**61**
	WWPB 45	10	15
	WWPB 53	16	7
	WWPB 69	26	16
2	**WWPB 76**	**62**	**61**
	WWPB 79	**54**	**43**
	WWPB 87	21	15
	WWPB 91	17	0
	WWPB 103	24	3

หมายเหตุ แหล่งที่ 1: โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่ตำบลแก่งละว้า อำเภอชนบท จังหวัดขอนแก่น
แหล่งที่ 2: โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่บ้านหนองกุง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

3. ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียตามเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ที่อุณหภูมิ 35^0C และตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง การวิเคราะห์เปรียบเทียบผลโดยการทำ well diffusion technique สำหรับต้านเชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp.lycopersici เพื่อคำนวณค่า percentage fungal inhibition (%) พบว่าเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลท คือ 72 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทคือ WWPB 25 คือ , WWPB 30, WWPB 76 และ WWPB 79 วิเคราะห์ได้ค่า percentage fungal inhibition เท่ากับ 58%, 60%, 61% และ 55% ตามลำดับ (ตารางที่ 5, ภาคผนวก จ)

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพของการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิ 35^0C และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลท WWPB 25, WWPB 30, WWPB 76 และ WWPB 79 โดยใช้เกณฑ์การวัดค่า Percentage Fungal Inhibition (%)

หมายเลขไอโซเลท	ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	Percentage fungal inhibition (%) $I = [(C-T)/C]x100$
WWPB 25	24	0
	48	43
	72	**58**
	96	58
WWPB 30	24	0
	48	47
	72	**60**
	96	59
WWPB 76	24	0
	48	43
	72	**61**
	96	60

4. การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืช

เมื่อนำสารออกฤทธิ์ หรือ supernatant จากแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราแช่ในอ่างปรับอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ เป็นเวลานาน 30 นาที เมื่อนำไปทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp.lycopersici ด้วยวิธี well diffusion technique พร้อมการคำนวณค่า percentage fungal inhibition (%) ผลการทดสอบพบว่ายังสามารถสังเกตเห็นลักษณะ Inhibition Zone ได้ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 40^0, 50^0, 60^0, 70^0C และ 90^0C ขนาดของ Inhibition Zone จะเล็กลงเมื่อ

อุณหภูมิสูงขึ้น ส่งผลให้ค่า percentage fungal inhibition ลดค่าลงด้วย และในระดับอุณหภูมิสูงกว่านี้จะไม่สามารถสังเกตลักษณะ Inhibition Zone ได้เลยจนไม่สามารถคำนวณค่า percentage fungal inhibition แสดงว่าสารต้านเชื้อรานี้สามารถคงทนอยู่ได้ที่ระดับอุณหภูมิสูงสุด 70^{0}C เป็นเวลานาน 30 นาที (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเสถียรต่อความร้อนของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชจากแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท

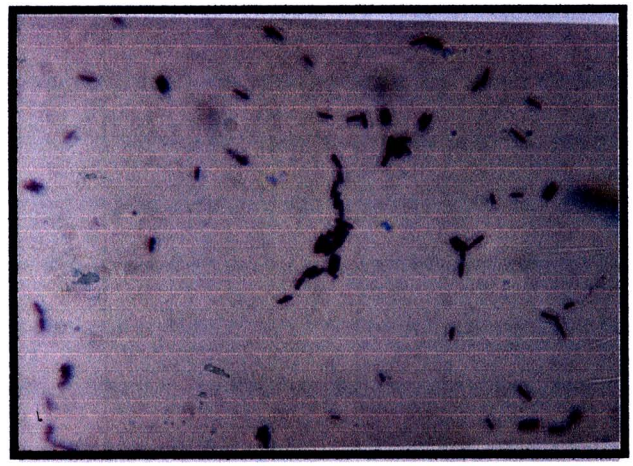
แบคทีเรีย Isolate No.	อุณหภูมิ (^{0}C)				
	40	50	60	70	90
	ค่า percentage fungal inhibition I = [(C-T)/C]x100				
WWPB 25	65	60	47	33	0
WWPB 30	67	62	50	29	0
WWPB 76	65	60	47	26	0

6. การศึกษาลักษณะและเทียบเคียงบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียเป้าประสงค์

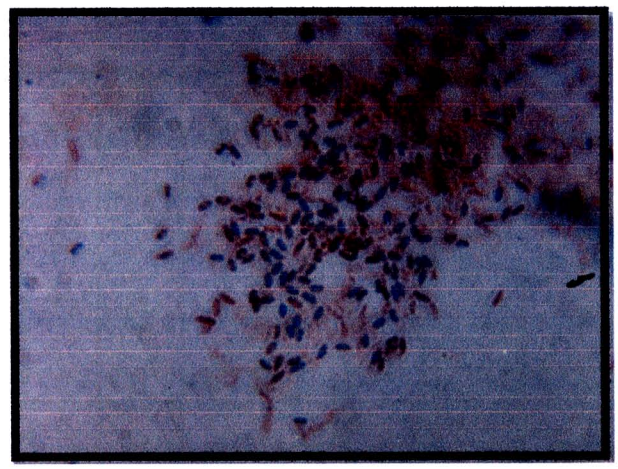
ผลการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 คล้องจองตามหนังสือ Bergey Mnaual of Determinative Bacteriology พบว่าแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ล้วนแล้วเป็นแบคทีเรีย Gram positive มีรูปร่างเป็นท่อนยาว (รูปที่ 7) มีการสร้าง endospores (รูปที่ 8) เมื่อเทียบเคียงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 เทียบเคียงได้กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis* โดยคำนวณจากค่า % similarity พบว่า แบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 มีค่า % similarity เท่ากับ 91% (ตารางที่ 7) เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและค่า % similarity ทางชีวิเคมี สามารถที่จะคาดคะเนได้ว่า แบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ถูกจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Bacillus* และ specific epithet เป็น *subtilis*.

สรุปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 isolates เมื่อผ่านการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีและเทียบเคียงทาง % similarity กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis* แบคทีเรียทุก isolate มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ดังนั้นจะนำเพียงเชื้อแบคทีเรีย isolate เดียวมาศึกษาต่อ

subtilis แบคทีเรียทุก isolate มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ดังนั้นจะนำเพียงเชื้อแบคทีเรีย isolate เดียวมาศึกษาต่อ



รูปที่ 7 แสดงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย isolates WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนยาวและเป็นแบคทีเรีย Gram positive



รูปที่ 8 แสดงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย isolates WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ที่สร้าง endospores

ตารางที่ 7 แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 เมื่อเทียบเคียงกับคุณสมบัติทาง ชีวเคมีของเชื้อ *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 WWPB 25	+	+	+	+	+	+	-	-	A	A	A	
Isolate WWPB 30	+	+	+	+	+	+	-	-	A	A	A	
Isolate WWPB 76	+	+	+	+	+	+	-	-	A	A	A	

หมายเหตุ : + = positive; - = negative; A = acid; A/G = acid and gas

* % Similarity เป็นการคำนวณ % Similarity ระหว่างแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis* ตามลำดับ แสดงวิธีการคำนวณ % Similarity และการแปรผลในภาคผนวก จ

7. ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานทำแป้งขนมจีนด้วยการการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสร้างสารชีวภาพออกฤทธิ์หมักแบบกะ (batch fermentation)

ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ของน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชน หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (≈27-29^{0}C) เป็นเวลา 7 วัน โดยกำหนดสถาวะการบำบัดน้ำเสีย แสดงผลการบำบัดตามตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้แบคทีเรีย isolate WWPB 76 เพื่อการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตขนมจีนโดยไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปรากฏว่าสามารถลดค่า COD ได้ถึง 68 เปอร์เซ็น เมื่อเทียบกับค่า COD ของน้ำเสียเริ่มต้น ในกรณีเดียวกันเมื่อใช้แบคทีเรีย isolate WWPB 76 (*Bacillus subtilis*) เพื่อการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตขนมจีนโดยผ่านการฆ่าเชื้อ ปรากฏว่าสามารถลดค่า COD ได้เพียง 50 เปอร์เซ็น มีความเป็นไปได้สูงที่มีเชื้อที่ปนเปื้อนมาในน้ำเสียช่วยย่อยสลายเนื้อแป้ง ส่งผลให้ค่า COD ลดลงมากกว่าใช้แบคทีเรีย isolate WWPB 76 เพียงลำพัง

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76 (*Bacillus subtilis*) ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำทิ้งจะสามารถลดค่า COD ได้ถึง 68 เปอร์เซ็น แต่ในความเป็นจริงก็ยังมีเนื้อแป้งข้าวจ้าวคงเหลือเป็นค่า COD สูงถึง 10,176 mg/L ซึ่งยังมีค่าสูงกว่าค่า COD มาตรฐานถึง 25 เท่าตัวตามค่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ถ้ามีการยืดเวลาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย isolate WWPB 76 (*Bacillus subtilis*) ต่อออกไป อาจส่งผลให้ค่า COD ลดต่ำลงไปอีกได้

ตารางที่ 8 แสดงค่า COD ทั้งก่อนและหลังการย่อยสลายแป้งด้วยเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76 (*Bacillus subtilis*)

ตัวอย่างภายใต้การศึกษา	ค่า COD (mg/L)	% COD* reduction
น้ำเสีย (ปลอดเชื้อ) ชุดควบคุม	31,519[a]	0
น้ำเสีย (ไม่ปลอดเชื้อ)	17,121[b]	46
น้ำเสีย (ไม่ปลอดเชื้อ + 0.2% glucose และ 0.2% peptone)	19,740[b]	37
น้ำเสีย (ปลอดเชื้อ + 0.2% glucose และ 0.2% peptone)	33,410[b]	0 (-6)
น้ำเสีย (ไม่ปลอดเชื้อ + เชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76)	10,176[b]	68
น้ำเสีย (ปลอดเชื้อ + เชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76)	15,650[b]	50
น้ำเสีย (ไม่ปลอดเชื้อ + 0.2% glucose และ 0.2% peptone + เชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76)	12,560[b]	60
น้ำเสีย (ปลอดเชื้อ + 0.2% glucose และ 0.2% peptone + เชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76)	13,760[b]	56

ค่า COD ตามมาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรมต้องไม่เกิน 400 mg/L
(ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่3 (พ.ศ. 2539)

การคำนวณ % COD* reduction = [(a-b/a)x100]

a = ค่า COD ของน้ำเสีย (ปลอดเชื้อ) ชุดควบคุม

b = ค่า COD ของน้ำเสียทุกสภาวะการบำบัด