ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247364

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีน ในระดับอุตสาหกรรมชุมชนเพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ ต้านเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ

Screening and cultivation of bacteria using wastewater from local community Chinese noodle factories in the production of bioactive metabolites for the control of economical plant pathogenic fungi

โดย

นายประสาท โพธิ์นิ่มแดง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

งานวิจัยภายใต้เงินอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2552
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

600252350 247364

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247364

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนในระดับอุตสาหกรรมชุมชนเพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ

Screening and cultivation of bacteria using wastewater from local community Chinese noodle factories in the production of bioactive metabolites for the control of economical plant pathogenic fungi

โดย

นายประสาท โพธิ์นิ่มแดง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

งานวิจัยภายใต้เงินอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2552
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนในระดับอุตสาหกรรมชุมชน เพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ

Screening and cultivation of bacteria using wastewater from local community Chinese noodle factories in the production of bioactive metabolites for the control of economical plant pathogenic fungi

โดย

นายประสาท โพธิ์นิ่มแดง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

งานวิจัยภายใต้เงินอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2552

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

คำนำ

งานวิจัยนี้จะเกี่ยวข้องกับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจโดยคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชน ทั้งนี้ได้เน้นแสวงหาแบคทีเรียที่สามารถเจริญในแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งข้าวเจ้าและสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบเหี่ยวในมะเขือเทศ (tomato wilt) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราในสกุล *Fusarium* spp. โดยคาดหวังจะนำไปใช้ควบคุมเชื้อราในตระกูล *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici ด้วยการวางแผนการใช้สารละลายที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคที่ผลิตได้ใช้จุ่มแช่ตั้งแต่การเพาะชำเมล็ดจนเป็นต้นอ่อนพร้อมการฉีดพ่นบนใบต้นมะเขือเทศ และราดต่อไปอย่างสม่ำเสมอจนผลิตผลพร้อมเก็บ การวิจัยได้ดำเนินมาจนได้สารละลายที่สามรถยับยั้งเชื้อราในสกุล *Fusarium* spp. จากหลายแหล่ง เช่น เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าในต้นหน่อไม้ฝรั่งและจากโรครากเน่าของต้นปทุมมา ทั้งนี้ผู้วิจัยวางแผนจะทำการระเหิดแห้งให้เป็นผง ละลายกลับลงในน้ำโดยต้องทราบความเข้มข้น ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในระดับห้องปฏิบัติการอีกครั้ง ก่อนจะวางแผนทดสอบการยับยั้งการทดลองในเรือนกระจก ก่อนนำลงไปใช้ในแปลงจริง

นายประสาท โพธิ์นิ่มแดง

30 สิงหาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้านายประสาท โพธิ์นิ่มแดง ผู้วิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา รวมไปถึงเจ้าหน้าที่สายสนับสนุนของภาควิชา ฯ ท่านคณบดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักงานบริหารงานวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยขอนแก่น และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้อำนวยความสะดวกด้านงบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจในการนำมาทดสอบความไวต่อสารออกฤทธิ์ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการอนุเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์ค่า COD ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นผ่านท่านรองอธิการบดีฝ่ายวิจัยในการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2552 มา ณ ที่นี้ด้วย

นายประสาท โพธิ์นิ่มแดง

30 สิงหาคม 2553

บทคัดย่อ

247364

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเสียโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชน พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici (Fol) และ *Colletotrichum anthracnose* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ ในระดับห้องปฏิบัติการ ในขั้นต้นสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีข้าวจ้าวเป็นแหล่งคาร์บอนได้จำนวน 250 ไอโซเลท เมื่อใช้เทคนิคของ dual culture technique ควบคู่กับ well diffusion technique สำหรับการตรวจวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช พบว่ามีเพียง 11 ไอโซเลท ที่สามารถแสดงกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici และมีเพียง 3 ไอโซเลท คือ isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici และ *Colletotrichum anthracnose* ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี และการหาค่า % similarity เทียบเคียงกับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ต่างก็เป็นแบคทีเรีย Gram positive มีการสร้าง endospores ภายในเซลล์ การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการคำนวณค่าทาง % similarity ของทั้ง 3 ไอโซเลตมีค่าเท่ากับ 91% เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ผลการเทียบเคียงนี้สามารถคาดได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 น่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน จึงควรถูกจัดให้อยู่ในสกุล (Genus) *Bacillus* และ specific epithet เป็น *subtilis* ด้านของการนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้ใหม่ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชนในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ของน้ำเสียทั้งก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($\approx$27-29^{0}C) เป็นเวลา 7 วัน มีความสามารถในการลดค่า COD ได้เพียง 68 เปอร์เซ็น หมายความว่ายังมีค่า COD เหลือในปริมาณสูงถึง 10,176 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับค่า COD ของน้ำเสียมาตรฐานระดับอุตสาหกรรม ซึ่งระบุว่ามีค่า COD ของน้ำทิ้งมีค่าสูงสุดต้องไม่เกิน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร การบำบัดครั้งนี้จึงถือได้ว่ายังต้องมีการศึกษาความเป็นได้ต่อไป ทั้งด้านการใช้เชื้อแบคทเรียและเวลาการเพาะเลี้ยง

ประสาท โพธิ์ชัยแดง
ทร ๐๕๕๑
๕๖ ๒๕

Abstract

247364

This study involved isolation of bacteria contaminated in starchy wastewater from local community Chinese noodle factories which was expected to possess the ability of producing secondary metabolites against the growth of economical plant pathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici (Fol) and *Colletotrichum anthracnose*. The isolation medium used was solely rice starch as carbon source with minimal dose of growth promoting ingredients, with the hope to produce antifungal substance controlling the spread of *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici (FOL) and Colletotrichum anthracnose at laboratory level. At first instance 250 bacterial colonies were seen on Rice Starch Agar. Using dual culture technique together with well diffusion technique, 11 putative bacterial isolates shown to possess antifungal properties against *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici. However, only 3 bacterial isolates showed potential properties in controlling the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici and *Colletotrichum anthracnose*, these were bacterial isolates WWPB 25, WWPB 30 and WWPB 76. Study on morphology supplemented with biochemical tests and calculated for percentage similarity against known bacterial strains of *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* and *Bacillus subtilis.* Results showed that all bacterial isolates WWPB 25, WWPB 30 and WWPB 76 revealed to be Gram positive, endospore formers, having 91% similarity after comparison of biochemical tests. Commulative results of all 3 bacterial isolates could tentatively place them in the Genus *Bacillus* and specific epithet of *subtilis*. Applying of newly isolated *Bacillus subtilis* as a biological starchy wastewater treatment, using a mean of Chemical Oxygen Demand (COD) as an indication of starchy reduction of influence and effluence after culturing with shaking at room temperature for 7 days. COD reduction was at 68%, and the effluence still contained COD value at 10,176 mg/L which was much higher that the allowed COD value of not more than 400 mg/L for effluence from industries. Starchy wastewater treatment for this study was not acceptable must be further studies to improve the protocol for effective wastewater treatment.

สารบัญเรื่อง
Table of Contents

หน้า

คำนำ (Preface) i

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ii

บทคัดย่อ iii

Abstract iv

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ 1 แสดงผลของแหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 20

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่มีผลต้านเชื้อราด้วยวิธี dual culture technique 21

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แสดงค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในรูปของค่า Percentage fungal inhibition คำนวณจากวิธี well diffusion technique 23

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่า Percentage Fungal Inhibition (%) สำหรับสารออกฤทธิ์จาก แบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp. lycopersici และ เชื้อรา *Colletotrichum anthracnose* 25

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพของการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิ 35^0 C และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลท WWPB 25, WWPB 30, WWPB 76 และ WWPB 79 โดยใช้เกณฑ์การวัดค่า Percentage Fungal Inhibition (%) 26

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเสถียรต่อความร้อนของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชจากแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท 27

ตารางที่ 7 แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 เมื่อเทียบเคียงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus lycheniformis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis* 29

ตารางที่ 8 แสดงค่า COD ทั้งก่อนและหลังการย่อยสลายแป้งด้วยเชื้อ แบคทีเรีย isolate WWPB 76 (*Bacillus subtilis*) 30

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

รูปที่ 1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Rice Starch Agar 21

รูปที่ 2 Single colony isolation ของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Rice Starch Agar (RSA) 22

รูปที่ 3 วิธี dual culture technique สำหรับคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชบ่มที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน (a) แสดงการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* ; (b) แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum anthracnose* 22

รูปที่ 4 เชื้อรา *Fusarium oxyspourm* f.sp. *lycopersici* ที่เจริญบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar 24

รูปที่ 5 เชื้อรา *Colletotrichum anthracnose* ที่เจริญบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar 24

รูปที่ 6 การทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราเชื้อ *Fusarium oxyspourm* f.sp. lycopersici โดยใช้ culture supernatant จากแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ 24

รูปที่ 7 แสดงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย isolates WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนยาวและเป็นแบคทีเรีย Gram positive 28

รูปที่ 8 แสดงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย isolates WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ที่สร้าง endospores 28

	หน้า
คำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)	viii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนิการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก (อาหารเลี้ยงเชื้อ)	44
ภาคผนวก ข (อาหารที่ใช้จำแนกแบคทีเรีย)	45
ภาคผนวก ค (สีย้อมและน้ำยาเคมี)	47
ภาคผนวก ง (การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมี ในการจำแนกแบคทีเรียระดับสกุล)	48
ภาคผนวก จ (ตาราง Percentage Fungal Inhibition)	50
ภาคผนวก ฉ (การคำนวณค่า % Similarity และค่า COD)	53

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

(List of Symbols and Abbreviations)

มล.	= มิลลิลิตร
ซม.	= เซนติเมตร
g	= gram
µl	= microlitre
L	= litre
min	= minute
ml	= millilitre
ng	= nanogram
nm	= nanometer
nmole	= nanomolar
rpm	= revolution per minute