การจัดจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10

Identification and Study on Characteristics of *Bacillus* sp. Strain N10

คำนำ

Bacillus sp. เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ และเป็น aerobe หรือ facultative anaerobe จีนัส *Bacillus* เป็นจีนัสใหญ่ มีความหลากหลายของสมาชิกในจีนัสอย่างมาก แบคทีเรียในจีนัสนี้สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เพคติน แป้ง โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต บางสปีชีส์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ และบางสปีชีส์สามารถตรึงไนโตรเจน เกิดไนตริฟิเคชัน หรือดีไนตริฟิเคชัน การที่ *Bacillus* sp. สามารถย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์และสามารถสร้างเอนโดสปอร์เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงพบ *Bacillus* sp. ทั่วไปในธรรมชาติ

ในปัจจุบันมีการนำ *Bacillus* sp. มาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเอนไซม์ การผลิตสารปฏิชีวนะ การกำจัดของเสียจากอุตสาหกรรม และในด้านการเกษตร เช่น ควบคุมแมลงและจุลินทรีย์โรคพืช ส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการผลิตฮอร์โมน การตรึงไนโตรเจน หรือละลายแร่ธาตุในดิน เช่น ฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์

Sittidilokratna *et al.* (2007) แยก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 จากปอสา โดยคัดเลือกจากคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์เพคติเนส พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตเอนไซม์ เพคติเนสสูง และเมื่อนำ crude enzyme ไปย่อยเปลือกปอสาแทนการต้มกับด่างให้ผลที่น่าพึงพอใจ

การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ *Bacillus* sp.สายพันธุ์ N10 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส ตลอดจนสามารถผลิตกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆอย่างรวดเร็วและชัดเจนกว่า *Bacillus* สปีชีส์อื่นๆ จากคุณสมบัติต่างๆเหล่านี้ประกอบกับการที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็น facultative anaerobe จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ทั้งในด้านการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น นำไปผสมกับจุลินทรีย์อื่นเพื่อย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร การทำปุ๋ยหมัก การตรึงไนโตรเจน การยับยั้งจุลินทรีย์โรคพืช การผลิตฮอร์โมน การผลิตเอนไซม์ ตลอดจนการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติต่างๆของ

Bacillus sp.สายพันธุ์ N10 จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการเกษตรและอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. จำแนกชนิดและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10

2. เปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 กับ *Bacillus* sp. ที่แยกจากสารเร่งปุ๋ยหมักพด.1

3. ศึกษาวิธีการเพิ่มการสร้างเอนโดสปอร์ในอาหารชนิดต่างๆ

การตรวจเอกสาร

จีนัส *Bacillus*

Bacillus เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ และเป็น aerobe หรือ facultative anaerobe ซึ่งส่วนมากสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางด้านชีวเคมี สรีรวิทยา และมีความต้องการสารอาหารที่หลากหลาย สามารถย่อยสลายสารจากพืชหรือสัตว์ เช่น เซลลูโลส แป้ง เพคติน และอื่นๆ บางชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ บางชนิดสามารถเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน ดีไนตริฟิเคชัน หรือสามารถตรึงไนโตรเจน มีทั้งชนิดที่เป็น acidophile, alkalophile, psychrophile หรือ thermophile

Bacillus มี %G+C content ที่กว้าง คืออยู่ในช่วง 32-69% การจัดหมวดหมู่โดย numerical classification สามารถจัด *Bacillus* 368 สปีชีส์เป็น 79 cluster การจำแนกระดับจีนัสโดยศึกษาคุณสมบัติทาง genotype และ phenotype สามารถตั้งจีนัสใหม่หลายจีนัส ได้แก่ *Amphibacillus, Alicyclobacillus, Paenibacillus, Aneurinibacillus, Brevibacillus, Virgibacillus, Gracilibacillus, Salibacillus, Filobacillus, Geobacillus, Ureibacillus, Jeotgalibacillus* และ *Marinibacillus* (Xu and Côte, 2003)

Paenibacillus polymyxa

Paenibacillus เป็นจีนัสที่เคยจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* เนื่องจากมีรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ และเป็น facultative anaerobe ที่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส ต่อมาเมื่อมีการศึกษาลำดับของ 16S rRNA gene จึงถูกเปลี่ยนเป็น *Paenibacillus* โดยในกลุ่มนี้มีแบคทีเรียหลายสปีชีส์ในจีนัส *Bacillus* sp. ที่ถูกเปลี่ยนจีนัส *Paenibacillus* ได้แก่ *P. polymyxa, P. alvei, P. gordonae, P. larvae, P. pulvifaciens, P. macerans, P. azotofixans, P. pabuli, P. macquariensis, P. amylolyticus* และ *P. validus* (Ash *et al.*, 1993) ต่อมามีรายงานว่าจำแนก *B. lautus* และ *B. peopriaerius* อยู่ในจีนัส *Paenibacillus* ด้วย ดังนั้นข้อมูลปัจจุบันจีนัสนี้มี 13 สปีชีส์ (Shida *et al.*, 1997) โดยกำหนดให้ *Paenibacillus polymyxa* เป็น type species ของ *Paenibacillus* sp. และ type strain ของ *P. polymyxa* คือ ATCC842 (DSM 36, NCIB 8158, NCTC 10343)

คุณสมบัติหลักของแบคทีเรียในจีนัส *Paenibacillus* คือเซลล์รูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก แกรมลบ หรือแกรม variable เป็น strictly aerobe หรือ facultative anaerobe เคลื่อนที่โดย peritrichous flagella สร้างเอนโดสปอร์รูปวงรี ทำให้vegetative cell โป่ง ไม่สร้าง pigment บนผิวหน้าอาหาร NA ส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส ค่าพีเอชในอาหาร VP น้อยกว่า 6.0 ไม่ผลิต hydrogen sulfide บางสปีชีส์สร้างสาร indole สามารถผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ย่อยสลายเคซีนและแป้ง และผลิตกรดจากน้ำตาลหลายชนิด สามารถเจริญที่พีเอชเท่ากับ 5.6 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเจริญดีที่พีเอชเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญใน NB ที่มี NaCl 10% แบคทีเรียหลายสปีชีส์ในจีนัสนี้ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ บางสปีชีส์สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น alginate, chondroitin, chitin, curdlan รวมทั้งโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ แต่การผลิตเอนไซม์ออกซิเดส การทดสอบ VP การรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ การย่อยสลายยูเรียและไทโรซีนมีความแปรผัน และมี G+C content 45-54 mol% (Shida *et al.*, 1997)

Claus and Berkeley (1986) อธิบายคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาของ *P. polymyxa* ได้ดังนี้ เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน ขนาดกว้าง 0.6–0.8 ไมโครเมตร ยาว 2.0-3.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก เป็น facultative anaerobe ที่เจริญดีมากในสภาวะไม่มีออกซิเจน สร้างเอนโดสปอร์รูปวงรี ทำให้เซลล์โป่ง โคโลนีบน Nutrient agar ใส มักพบการเคลื่อนที่แบบ amoeboid โคโลนีบนอาหารแข็งที่มีน้ำตาลกลูโคสมีลักษณะเจริญทับถมกัน เป็นเมือกและผิวหน้ามีลักษณะด้าน

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีให้ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลสเป็นบวก สามารถเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน สามารถผลิตสาร acetoin จาก butylene glycol fermentation ส่วนมากมีค่าพีเอชใน VP broth ต่ำกว่า 6.0 สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลหลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แมนนิทอล และผลิตแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส ย่อยเคซีน เจลาติน และแป้ง สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ ไม่สามารถใช้ซิเตรต ไม่สลายไทโรซีน ไม่เกิดการดึงหมู่อะมิโนจากฟีนิลอะลานีน ไม่มีเอนไซม์เลซิติเนส ไม่ผลิตสาร indole จากทริปโตฟาน แต่เกิด dihydroxy acetone เจริญที่พีเอช 6.8 และ 5.7 ไม่เจริญในสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 5%, 7% และ 10% เจริญที่อุณหภูมิ 5, 10, 30 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 50, 55 และ 65 องศาเซลเซียส

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลายเพคตินและโพลีแซคคาไรด์ในเนื้อเยื่อพืช แต่ย่อยเซลลูโลสน้อย หรือไม่ย่อยเลย สามารถสังเคราะห์ลีแวนจากน้ำตาลซูโครส แต่การที่แบคทีเรียชนิดนี้มีแคปซูลที่หนา ดังนั้นสารลีแวนจึงไม่สามารถแพร่ผ่านออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย 2 กลุ่ม ได้แก่ polymyxin-colistin-circulin family, polypeptins, jolipeptin, gavaserine และ saltavalin ที่มี 2,4-diaminobutyric acid ส่วนฮอร์โมนพืชที่แบคทีเรียนี้ผลิตคือออกซินและไซโตไคนิน

การทดสอบการตรึงไนโตรเจนโดยใช้อาหาร Minimal medium ที่มีแหล่งคาร์บอน พลังงาน แอมโมเนียม-ไนโตรเจน และไบโอติน พบว่าการตรึงไนโตรเจนเกิดในสภาวะไร้ออกซิเจนการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชนั้น แบคทีเรียได้รับสารอาหารจากรากพืชเพื่อใช้ในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืช

Mol % G+C ของ DNA อยู่ในช่วง 41.0–51.4 (Tm) ใน 12 สายพันธุ์ และจาก phenetic characteristic แสดงให้เห็นว่า *P. polymyxa, P. macerans* และ *P. circulans* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน

P. polymyxa เป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารซับซ้อนเพื่อการเจริญ รวมทั้งต้องการกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิด ดังนั้นจึงไม่ค่อยพบ *P. polymyxa* ในดินที่มีสารอาหารน้อย และมักพบบ่อยในซากพืช ปุ๋ยหมัก ดินบริเวณรอบๆรากพืช มีรายงานว่าสามารถแยก *P. polymyxa* จากธรรมชาติโดยพบในดินบริเวณรอบๆรากพืช เช่น ข้าวสาลี (*Triticum durum*) ข้าวไรย์ (*Lolium perene* L.) white clover (*Trifolium repens* L.) ข้าวโพด (*Zea mays*) (da Mota *et al.*, 2002) *P. polymyxa* จัดเป็น plant growth promoting rhizobacteria ที่สามารถยับยั้งโรคพืช สนับสนุนการเจริญของพืช ผลิตสารปฏิชีวนะ ผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ และผลิตฮอร์โมนพืช

การแยก *P. polymyxa* จากธรรมชาติสามารถทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติการตรึงไนโตรเจน ส่วนการจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เป็นการทดสอบคุณสมบัติการหมักคาร์โบไฮเดรต ได้แก่กลีเซอรอล, ดี(+)-ไซโลส, แอล(+)-อะราบิโนส, แอล(+)-แรมโนส และทรีฮาโลส การใช้ซิเตรตและซัคซิเนต โดยใช้ API 50CH kits (da Mota *et al.*, 2002; von der Wied *et al.*, 2000) และการทดสอบการย่อยเจลาติน กิจกรรมของเอนไซม์ nitrate reductase การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการผลิต acetoin โดยใช้ API 20B (Mavingui *et al.*, 1992)

การผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์โดย *Bacillus* sp. และการนำไปใช้

การผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์เป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของ *Bacillus* sp. ซึ่งมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทั้งด้านอุตสาหกรรมและการเกษตร เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องหนัง สิ่งทอ การกำจัดของเสีย การผลิตอาหารสัตว์ ปุ๋ยหมัก รวมถึงการผลิตเอนไซม์ในเชิงการค้า และทางด้านการแพทย์ การผลิตเอนไซม์โดย *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่มักเป็นชนิดที่ขับออกนอกเซลล์ จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เพราะสามารถควบคุมให้ได้ผลผลิตปริมาณมาก เพาะเลี้ยงให้เพิ่มจำนวนมาก ทำการปรับปรุงพันธุกรรมง่าย และ *Bacillus* sp. มีความหลากหลายทางชีวเคมี ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตนั้นมักทนอุณหภูมิสูงและมีกิจกรรมในช่วงพีเอชที่กว้าง (Banik and Prakash, 2004; Patel *et al.*, 2005)

การผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์โปรตีเอสมีความสำคัญในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมอาหาร การสังเคราะห์สารอินทรีย์และการสังเคราะห์เปปไทด์ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมผงซักฟอกและสิ่งทอ การย่อยสลายเจลาตินบนแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ การบำบัดน้ำเสีย การกำจัดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม เป็นต้น (Chauhan and Gupta, 2004; Joo and Chang, 2005; Olajuyigbe and Ajele, 2005)

นักวิจัยหลายคณะศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยง *Bacilllus* sp. ทั้งอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยง พีเอช และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ *Bacilllus* sp. ผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงสุด เช่น Matta and Punj (1998) รายงานว่า *B. polymyxa* B-17 ซึ่งแยกจากน้ำนมดิบ เป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิต่ำ แต่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TDYA ส่วน Patel *et al*. (2005) พบว่า *B. pseudofirmus* สายพันธุ์ Ve-1 แยกจากดินบริเวณชายฝั่งทะเลในประเทศอินเดีย ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุดในการเจริญระยะต้น stationary phase เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี cassamino acid และเจลาติน นอกจากนี้ Prakasham *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดย *Bacillus* sp. จากการหมักแบบ solid state และรายงานว่าการหมักกากถั่วเขียวให้ผลผลิตของเอนไซม์สูงสุด คือ 9,550 หน่วยต่อกรัมชีวมวล

ในปี 2001 Johnvesley and Naik 2001 ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JB-99 ที่แยกจากกากน้ำตาล แบคทีเรียชนิดนี้ชอบอุณหภูมิสูงและสภาวะที่เป็นด่าง เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ที่มีพีเอชเท่ากับ 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส กล่าวว่าแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์คือกรดซิตริก soluble starch น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลราฟฟิโนส โซเดียมไนเตรต และโพแทสเซียมไนเตรต ต่อมาในปี 2002 Johnvesley *et al.* ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JB-99 รายงานว่ากากถั่วเขียวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหมาะสมที่สุดในการหมักแบบ submerge มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงสุดเท่ากับ 12,430 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก ใช้เพื่อย่อยคราบสกปรกที่เป็นสารประเภทโปรตีน เช่น คราบเลือด คราบเหงื่อ คราบนม ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำความสะอาดให้กับผงซักฟอก ทำความสะอาดง่ายและลดเวลาในการซัก *Bacillus* sp. หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เช่น *B. mojavensis* (Beg and Gupta, 2003), *B. cereus* (Banik and Prakash, 2004), *B. clausii* (Joo and Chang, 2006) และ*B. subtilis* (Yang *et al.*, 2000) เป็นต้น

Bacillus sp. สายพันธุ์ I-312 แยกจากโคลนบริเวณปากอ่าวและน้ำทะเลบริเวณ Songdo ในเมือง Inchon ประเทศเกาหลี ซึ่งเป็นบริเวณที่มีมลภาวะสูง ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส 42,520 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่พีเอช 11.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และทนต่อ SDS และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จึงเหมาะสำหรับเติมในผงซักฟอก (Joo and Chang, 2005) เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *B. clausii* สายพันธุ์ I-52 ซึ่งเสถียรในสารองค์ประกอบของผงซักฟอกหรือผงซักฟอกที่ขายตามท้องตลาด เมื่อผสมเอนไซม์นี้ลงในสารองค์ประกอบของผงซักฟอกหรือผงซักฟอกที่ขายตามท้องตลาด พบว่ามีประสิทธิภาพการกำจัดคราบโปรตีนดีเช่นกัน (Joo and Chang, 2006) ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์ I18, L18 และ L21 ซึ่งแยกจากของเสียในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง ผลิตเอนไซม์ซีรีนอัลคาไลน์โปรตีเอส 160-222 หน่วยต่อมิลลิลิตร crude enzymeจากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ทนต่อสารฟอกขาว มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 11.0 (Genckal and Tari, 2006)

การใช้วิธีทางเคมีโดยใช้กรดหรือด่างเพื่อกำจัดโปรตีนจากของเสียประเภทเปลือกของสัตว์ทะเล และการเตรียมไคติน เป็นการเพิ่มมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม และเพิ่มค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารพิษเหล่านี้ การใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์เพื่อดึงโปรตีนออกจากสารประกอบไคตินจึงช่วยลดปัญหาดังกล่าว ดังที่ Yang *et al.* (2000) รายงานว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ Y-108 ผลิตนิวทรัลโปรตีเอสที่สามารถย่อยโปรตีนจากเปลือกกุ้งและปูในกระบวนการเตรียมไคติน ให้ผลดีกว่าการใช้กรดทั้งในด้านความสามารถในการดึงโปรตีนออก ช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมจากของเสียในการทำปฏิกิริยาทางเคมี

การสังเคราะห์เปปไทด์ในอุตสาหกรรมต้องเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายที่มี water content ต่ำ การใช้เอนไซม์โปรตีเอสที่ความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์จึงเป็นข้อได้เปรียบ เนื่องจากการสังเคราะห์เปปไทด์โดยการใช้เอนไซม์โปรตีเอสให้ผลผลิตที่สูงการใช้วิธีทางเคมี ในปี 2006 Wang and Yeh แยก *B. subtilis* สายพันธุ์ TKU007 จากดินในประเทศไต้หวันเพื่อใช้ย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของของเสียที่เป็นเปลือกของสัตว์ทะเล เช่น เปลือกกุ้ง เปลือกปู กระดองปลาหมึก เป็นต้น แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกกุ้ง 1.5% มีกิจกรรมเท่ากับ 0.35 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและไคโตซาเนส เอนไซม์โปรตีเอสมีกิจกรรมสูงที่พีเอช 7.0-11.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และทนต่อ Tween20, Tween40, Triton x-100 และ SDS

Bacillus sp. สายพันธุ์ TKU004 ซึ่งแยกจากดินในประเทศไต้หวันโดย Wang *et al.* (2006) เป็น *Bacillus* อีกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเปลือกของสัตว์ทะเล การผลิตเอนไซม์โดยใช้กระดองปลาหมึกเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนผลิตเอนไซม์เมทัลโลโปรตีเอส 0.06 หน่วยต่อมิลิลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์สูงสุดในช่วงปลายระยะ stationary phase และดึงโปรตีนออกจากกระดองปลาหมึกถึง 73% ภายใน 3-5 วัน อุณหภูมิและพีเอชเหมาะสมกับเอนไซม์ชนิดนี้คืออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 6-8

ในอุตสาหกรรมเครื่องหนังใช้เอนไซม์โปรตีเอสในหลายขั้นตอน เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีความสำคัญในขั้นตอนการกำจัดขนออกจากแผ่นหนัง การใช้ปูนขาวและโซเดียมซัลไฟด์ที่ใช้กำจัดขนจากแผ่นหนังก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม และส่งผลต่อสุขภาพของแรงงานในโรงงานอุตสาหกรรมเครื่องหนัง ดังนั้น Nilegaonkar *et al.* (2007) จึงศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *B. cereus* สายพันธุ์ MCM B-326 เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง พบว่า

แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส 126.87 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

<u>การผลิตเอนไซม์อะไมเลส</u>

แป้งเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทโพลีแซคคาไรด์ที่สะสมอยู่ในหัวและเอนโดสเปิร์มของพืช ประกอบด้วยโมเลกุล2 ชนิด คือ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน โมเลกุลทั้ง 2 ชนิดมีหน่วยย่อยคือ น้ำตาลแอลฟา-ดี-กลูโคส โครงสร้างของอะไมโลสประกอบด้วยน้ำตาลแอลฟา-ดี-กลูโคสต่อกัน เป็นสายด้วยพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิค อะไมโลสมีน้ำหนักโมเลกุลที่เบากว่าอะไมโลเพคติน ส่วนอะไมโลเพคตินมีลักษณะโครงสร้างที่เป็นกิ่ง น้ำตาลแอลฟา-ดี-กลูโคสตรงบริเวณกิ่งต่อกัน ด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิค

Ajayi and Fagade (2006) ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Bacillus* spp. พบว่า *B. polymyxa* สายพันธุ์ WBP มีอัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งข้าวโพดต่ำ แต่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูง ส่วน *B. circulans* สายพันธุ์ SBC และสายพันธุ์ WBC มีอัตราการเจริญสูงและสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ *B. macerans* สายพันธุ์ SBM และ MBM, *B. coaggulans* สายพันธุ์ WBC, *B. licheniformis* สายพันธุ์ SBL และ WBL, *B. circulans* สายพันธุ์ SBC, *B. megaterium* สายพันธุ์ SBG และ *B. polymyxa* สายพันธุ์ WBP ผลิตเฉพาะเอนไซม์เบตาอะไมเลส ส่วน *Bacillus* spp. สายพันธุ์อื่นๆผลิตทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเบตาอะไมเลสในปริมาณที่แตกต่างกัน

เอนไซม์เบตาอะไมเลสบริสุทธิ์จาก *B. polymyxa* สายพันธุ์ ATCC 8523 สามารถย่อยสลายอะไมโลเพคตินจากหัวมันฝรั่ง และมีกิจกรรมเท่ากับเอนไซม์เบตาอะไมเลสจากมันฝรั่ง สามารถเปลี่ยนอะไมโลเพคตินเป็นน้ำตาลมอลโตส 60% เมื่อเติมเอนไซม์พัลลูลาเนสลงไปทำให้เอนไซม์เบตาอะไมเลสจากเชื้อสายพันธุ์ ATCC 8523 เปลี่ยนอะไมโลเพคตินเป็นน้ำตาลมอลโตส 100% (Mashall, 1974) ส่วน *B. polymyxa* สายพันธุ์ NRRL B-367 ผลิตเอนไซม์เบตาอะไมเลสดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี soluble starch 8% และ corn steep 4% แต่ไม่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและพัลลูลาเนส (Hensley *et al.*, 1980)

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ CUMC305 มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และพีเอช 9.0 และมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง เอนไซม์นี้เสถียรที่ช่วงพีเอช 7.0-9.0 ซับสเตรตที่เอนไซม์นี้สามารถย่อยสลาย ได้แก่ soluble starch อะไมโลส อะไมโลเพคติน และไกลโคเจน แต่อัตราการย่อยสลายแตกต่างกันตามชนิดของซับสเตรต (Krishnan and Chandra, 1983)

B. subtilis สายพันธุ์ 65 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งย่อยแป้งดิบได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาณเล็กน้อย แต่เมื่อผสมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ 65 กับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Endomycopsis* ส่งเสริมการย่อยแป้งดิบจากมันฝรั่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Hayashida *et al.*, 1988)

ในปี 1999 Hamilton *et al.* แยก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ IMD 435 จากวัสดุเพาะเห็ด เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลแลคโตสและ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ IMD 435 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุด แต่ชีวมวลจากการใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนน้อยกว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็น soluble starch และเบตาไซโคลเด็กซ์ตริน การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเริ่มต้นในระยะ log phase ของการเจริญ ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 32 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 41 ซึ่งอยู่ในระยะ stationary phase ของการเจริญ อุณหภูมิและพีเอชเหมาะสมสำหรับเอนไซม์คือ 65 องศาเซลเซียสและ 6.0 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนี้ย่อยสลาย soluble starch และแป้งข้าวโพดดิบ ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตส

Teodoro *et al.* (2000) รายงานว่า *Bacillus* sp. จากดิน สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทนอุณหภูมิสูง แบคทีเรียชนิดนี้เจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.0 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.0 แต่สามารถทนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสโดยมีกิจกรรม 100%

ในปี 2004 Konsula and Liakopoulou-Kyriakides แยก *B. subtilis* จากน้ำนมแกะ และรายงานว่าแบคทีเรียนี้สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทนอุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส และที่

พีเอช 6.5 crude enzyme และเอนไซม์บริสุทธิ์สามารถย่อยแป้งหลายชนิดโดยที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แต่การย่อยแป้งมันฝรั่งให้ผลดีกว่าแป้งชนิดอื่น

Sodhi *et al.* (2005) พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ PS-7 ซึ่งแยกจากน้ำพุร้อนในประเทศอินเดีย ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากการหมักแบบ solid state มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 และทนอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส แต่ต้องเติมแคลเซียมไอออนลงในสารละลายเอนไซม์ เมื่อผสมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนี้กับเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ใช้ในการค้าจะมีผลส่งเสริมกันในการย่อยแป้งในข้าวมอลท์เพื่อหมักเอธานอล

B. subtilis สายพันธุ์ JS-2004 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทนอุณหภูมิสูง แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 44.84 หน่วยต่อมิลลิลิตรเมื่อแบคทีเรียมีอายุ 48 ชั่วโมงซึ่งอยู่ในช่วงต้นของระยะ stationary phase และเป็นช่วงที่มีจำนวนเซลล์สูงสุด การเติมแคลเซียมที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดที่พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เสถียรที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง เนื่องจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ JS-2004 เป็นเอนไซม์ทนอุณหภูมิสูงจึงเหมาะสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแป้งและอุตสาหกรรมอาหาร (Asgher *et al.*, 2007)

การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. licheniformis* จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น รำข้าวสาลี กากเมล็ดดอกทานตะวัน กากเมล็ดสำลี กากถั่วเหลือง แกลบข้าวเจ้า หรือรำข้าวเจ้าโดยหมักแบบ solid state พบว่ารำข้าวสาลีเหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ส่วนการใช้ soluble starch 1% แทนแป้งจากลูกเดือยและลดความเข้มข้นของ Nutrient Broth จาก 1% เหลือ 0.5% เพิ่มการผลิตเอนไซม์เป็น 2 เท่า (Haq *et al.*, 2003) ส่วน *B. subtilis* ที่แยกจากน้ำพุร้อนในประเทศตุรกี ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทนอุณหภูมิสูงจากการหมักแบบ solid state โดยใช้รำข้าวสาลีและแกลบข้าวเจ้า ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 159,520 และ 21,760 หน่วยต่อกรัมตามลำดับ

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูโลสเป็นสารคาร์โบไฮเดรต มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิค ในแต่ละสายลูกโซ่เซลลูโลสจะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและภายนอกโมเลกุล ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเส้นใย โดยประกอบด้วยลักษณะที่เป็นผลึก (crystalline) และไม่เป็นผลึก (amorphous)

ขนาดของเซลลูโลสแสดงในรูปของจำนวนน้ำตาลกลูโคสต่อ 1 โมเลกุลของเซลลูโลส (degree of polymerization) เซลลูโลสแสดง degree of polymerization อยู่ในช่วง 10,000–15,000 ซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งของเซลลูโลส เซลลูโลสเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงย่อยสลายยากเมื่อเทียบกับแป้ง

โดยทั่วไป *Bacillus* sp. ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือผลิตเพียงเล็กน้อย แต่มีรายงานว่า *Bacillus* sp. บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ DLG ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆเป็นองค์ประกอบ สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อย trinitrophenyl carboxymethyl cellulose ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่โครงสร้างไม่เป็นผลึก แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นผลึก และสามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณสูงในอาหารที่มีน้ำตาลเซลโลไบโอสหรือกลูโคส การผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase สภาวะเหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือพีเอช 4.8 และอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส (Robson and Chambliss, 1984)

Bacillus sp. สายพันธุ์ CH43 และสายพันธุ์ HR68 จากน้ำพุร้อนในประเทศซิมบับเว มีสภาวะเหมาะสมที่พีเอช 5.0-6.5 และอุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ทั้ง 2 นี้มีกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ซับสเตรตที่เหมาะสมกับเอนไซม์ทั้ง 2 นี้คือเบตากลูแคน และ carboxymethyl cellulose เอนไซม์จากสายพันธุ์ HR68 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่มีโครงสร้างที่เป็นผลึก เช่น กระดาษกรองและ avicel (Mawadza *et al.*, 2000)

เอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์จาก *B. circulans* สายพันธุ์ KSM-N257 ซึ่งมีกิจกรรมของ endo-1,4-β-glucanase มีสภาวะเหมาะสมในการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose ที่พีเอช 8.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และย่อยสลาย lichenan เหมือนกับเอนไซม์ lichenanase จาก *B.*

circulans สายพันธุ์ WL-12 แต่ไม่สามารถย่อยสลาย laminarin, curdran และไซแลน (Hakamada *et al.*, 2002)

Heck *et al.* (2002) รายงานว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ BL62 จากดินและน้ำบริเวณแม่น้ำอะเมซอนเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกากถั่วเหลือง โดยการหมักแบบ solid state สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรม 1.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนภายในเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน Zhang *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตมัลติเอนไซม์จากเชื้อผสมของ *Bacillus* sp. ชอบด่าง 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JCM9141 ซึ่งผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์อะไมเลส และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JCM9156 ซึ่งผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์เซลลูเลส พบว่าการใช้เชื้อผสมมีผลให้การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์เซลลูเลส ข้อดีการใช้เชื้อผสมคือสามารถย่อยสลายทั้งแป้งและเซลลูโลสที่ละลายน้ำ

<u>การผลิตเอนไซม์ไซลาเนส</u>

ไซแลนเป็นกลุ่มหลักของเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสต่อเป็นสายยาวด้วยพันธะเบตา-1,4 อาจเป็นโซ่ตรงที่มีเฉพาะน้ำตาลไซโลสหลายๆ โมเลกุล หรือมีสาขาที่เป็นโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ เช่นแอล-อะราบิโนฟิวราโนส ซึ่งเชื่อมต่อกับน้ำตาลดี-ไซโลสที่ตำแหน่ง O-3 และกรด D-glucuronic หรือกรด 4-O-methyl glucuronic ซึ่งเชื่อมกับน้ำตาลไซโลสที่ตำแหน่ง O-2 ในพืชแต่ละชนิดมีไซแลนที่มีโครงสร้างหลักเหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่ชนิด จำนวน และตำแหน่งของหน่วยข้างเคียง

เอนไซม์ไซลาเนสผลิตจากราและแบคทีเรีย การผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จากรามีการศึกษากันมาก แต่การผลิตเอนไซม์จากรามีข้อจำกัดคือเอนไซม์มีพีเอชเหมาะสมอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่า 5.5 จึงเป็นปัญหาต่ออุตสาหกรรมบางชนิด เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งมีพีเอชเหมาะสมในช่วงที่เป็นกลางถึงด่าง แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี

เอนไซม์ไซลาเนสมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมกระดาษ สามารถย่อยสลายเยื่อกระดาษได้ลิกนิน ซึ่งเป็นการลดปริมาณการใช้คลอรีนและสารฟอก และมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เป็น food additive สำหรับสัตว์ปีกเพื่อเพิ่ม feed efficiency การเติมเอนไซม์ไซลา เนสลงใน

แป้งสาลีเพื่อเพิ่มการเกิด dough และเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์ขนมอบ หรือเติมลงในเครื่องดื่ม เช่น น้ำผลไม้และไวน์เพื่อทำให้เครื่องดื่มมีความใส

ในปี 1993 Morales *et al.* รายงานว่า *B. polymyxa* สายพันธุ์ CECT 153 ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ไซลาเนส 3 ชนิด ได้แก่ $X_{34}C$, $X_{34}E$ และ X_{22} เอนไซม์ทั้ง 3 นี้มีพีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน $X_{34}E$ สามารถทนอุณหภูมิสูงสุด และเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถย่อยสลาย oat spelt xylan และ birch wood xylan แตกต่างกัน ต่อมาในปี 1995 Morales *et al.* ศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *B. polymyxa* สายพันธุ์ CECT 153 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีอุณหภูมิและพีเอชเหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียสและ 6.5

Pham et al (1998) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *B. polymyxa* สายพันธุ์ CECT 153 ผลิตเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 24 นาโนคาทาลต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์สูงสุดจากการหมักฟาง และพบว่า yeaset extract เป็นแหล่งไนโตรเจนเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

B. circulans สายพันธุ์ AB 16 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนสภาวะด่างและอุณหภูมิสูงจากการหมักฟางข้าว ช่วงพีเอชเหมาะสมสำหรับเอนไซม์นี้คือ 6.0-7.0 แต่เสถียรในช่วงพีเอชที่กว้างตั้งแต่ 5.0-9.0 อุณหภูมิเหมาะสมคือ 80 องศาเซลเซียส ฟางข้าวเป็นวัสดุเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ มีกิจกรรมเท่ากับ 20.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเอนไซม์นี้ไปฟอกเยื่อกระดาษจากไม้ยูคาลิปตัส พบว่าสามารถลดปริมาณการใช้คลอรีน 20% โดยที่ความขาวของกระดาษเท่าเดิม (Dhillon *et al.*, 2000)

B. firmus ที่แยกจากบ่อบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะด่างและใช้ birch wood xylan เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว crude enzyme มีกิจกรรม 1.75 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์บริสุทธิ์มี 2 ชนิดที่กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน คือ ขนาด 45 กิโลดาลตัน และ 23 กิโลดาลตัน เอนไซม์ไซลาเนสที่มีขนาด 45 กิโลดาลตัน มีกิจกรรม 34.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์ไซลาเนสที่มีขนาด 23 กิโลดาลตัน มีกิจกรรม 3.67 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์บริสุทธ์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีกิจกรรมในช่วงพีเอช 4.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่พีเอชที่เหมาะสำหรับ เอนไซม์ไซลาเนสที่มีขนาด 45 กิโลดาลตัน คือ 6.0-8.0 ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสที่มีขนาด 23 กิโลดาลตันมีพีเอชเหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0-7.0 เอนไซม์ทั้ง 2

ชนิดนี้เมื่อย่อยสลาย birch wood xylan ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส ไซโลไตรโอส และไซโลเฮกโซส และเมื่อนำเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมาผสมกันจะย่อยสลายสับสเตรทได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลสและไซโลไบโอส (Tseng *et al.*, 2002)

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *B. pumilus* จากการหมักวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธี submerged fermentation และ solid state fermentation พบว่าการหมักแบบ solid state ให้ผลดีกว่ามาก และรำข้าวสาลีเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ด้วยการหมักแบบ solid state มากที่สุด มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 35,156 IU/gds ในขณะที่ oat spelt xylan เหนี่ยวนำให้ *B. pumilus* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากการหมักแบบ submerged สูงสุดคือ 580 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Poorna and Prema, 2006) การนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อกำจัดขยะประเภทกระดาษ กล่องกระดาษ และกระดาษเหลือทิ้งจากสำนักงาน พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *B. pumilus* ย่อยกระดาษจนเส้นใยมีลักษณะที่เปื่อยยุ่ยมากกว่ากระดาษที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์อย่างเห็นได้ชัด การย่อยขยะประเภทกระดาษโดยเอนไซม์ไซลาเนสทำให้เส้นใยของกระดาษเกิดการพองตัวจึงสะดวกต่อการนำไป recycle (Poorna and Prema, 2007)

การหมักกากถั่วเหลืองแบบ solid state โดย *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์ พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ BL53 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออื่น คือ 5.19 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เอนไซม์จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ BL53 มีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ใช้ในการค้าประมาณ 4-5 เท่า (Heck *et al.*, 2002)

<u>เอนไซม์ไคติเนส (Chitinase)</u>

สารประกอบไคตินเป็นสารอินทรีย์ประเภทโพลีแซคคาไรด์ชนิดที่ไม่ละลายน้ำ พบในธรรมชาติมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยพบจากเปลือกของสัตว์พวกครัสเตเชียน แมลง เชื้อรา และยีสต์ สารประกอบไคตินประกอบด้วยหน่วยย่อยของ N-acetyl-D-glucosamineต่อกันเป็นสายด้วยพันธะβ-1,4

B. circulans สายพันธุ์ WL-12 เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์ และหลั่งเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดสู่อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์ไคติเนสจากการเหนี่ยวนำด้วยไคติน พบเอนไซม์ไคติเนส 6 ชนิดใน culture supernatant ได้แก่ A1, A2, B1, B2, C

และ D มีขนาดและค่า pI ดังต่อไปนี้ M_r 74000, pI 4.7 (A1); M_r 69000, pI 4.5 (A2); M_r 38000, pI 6.6 (B1); M_r 38000, pI 5.9 (B2); M_r 39000, pI 8.5 (C) และ M_r 52000, pI 5.2 (D) (Watanabe *et al.*, 1990)

Bacillus sp. สายพันธุ์ NCTU2 จากดินสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์บริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 36.5 kDa และ pI 6.3 เสถียรที่อุณหภูมิ 60°C และ pH 6-8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 50-60°C และ pH 7.0 ผลิตภัณฑ์หลักจากการย่อยสลาย colloidal chitin คือไคโตไบโอส (Wen *et al.*, 2002)

P. illinoisensis สายพันธุ์ KJA-424 แยกจากดินบริเวณชายฝั่งของประเทศเกาหลีสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสปริมาณสูง เอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 63, 54 และ 38 กิโลดาลตัน เมื่อเลี้ยง *P. illinoisensis* สายพันธุ์ KJA-424 ร่วมกับ *Rhizoctonia solani* พบว่าเส้นใยของ *R. solani* บวมและรูปร่างของเส้นใยผิดปกติ และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถควบคุมโรค damping-off ในต้นอ่อนของแตงกวาซึ่งมีสาเหตุจาก *R. solani* (Jung *et al.*, 2003)

B. cereus สายพันธุ์ 28-สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส และมีศักยภาพในการควบคุมโรคใบซีดของลิลลี่ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Botrytis* และเอนไซม์บริสุทธิ์สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียของ *Borytis elliptica* สาเหตุโรคใบซีดของลิลลี่ (Huang *et al.*, 2005)

การควบคุมจุลินทรีย์โรคพืชโดยชีววิธี

พืชที่เป็นโรค หมายถึง พืชที่ถูกรบกวนหรือทำลายระบบต่างๆ ก่อให้เกิดความผิดปกติ สาเหตุโรคพืชอาจเกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น น้ำหรืออากาศ และสิ่งมีชีวิต เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไมโคพลาสมา หรือไส้เดือยฝอย เมื่อสิ่งมีชีวิตสาเหตุโรคพืชเข้าสู่พืช มีผลให้เนื้อเยื่อพืชถูกทำลายและการทำงานของเซลล์พืชผิดปกติ อาการผิดปกติที่สามารถมองเห็น เช่น อาหารเหี่ยว (wilt) บวมพองหรือเป็นปุ่มปม (knot หรือ gall) เนื้อเยื่อเจริญไม่สม่ำเสมอเกิดลักษณะตะปุ่มตะป่ำ (wart) แคระแกร็น (dwarf) โคนเน่าในระยะกล้า (damping off) เกิดอาการตายของเนื้อเยื่อเป็นแห่งๆ (necrotic lesion) ด่าง (chlorosis) หรือการเจริญผิดรูปร่าง (malformation)

การเกิดโรคพืชก่อให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกร ทำให้ขาดทุน เสียเวลาและแรงงาน การระบาดของโรคพืชเป็นการจำกัดชนิดของพืชที่จะปลูกในที่หนึ่งๆ เช่น การระบาดของโรครากเน่าในพริกที่จังหวัดจันทบุรี ทำให้เกษตรกรต้องปลูกพืชชนิดอื่นแทน บางครั้งการเกิดโรคระบาดรุนแรง ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลง และเกิดสภาวะขาดแคลนอาหาร ในด้านอุตสาหกรรม การเกิดโรคพืชส่งผลให้ปริมาณวัตถุดิบไม่เพียงพอสำหรับป้อนโรงงาน เป็นต้น

<u>แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช</u>

แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชมีชีวิตแบบปรสิตในพืชอาศัย แต่อาจดำรงชีวิตแบบอิสระโดยย่อยสลายซากพืชในดิน การแพร่ระบาดเกิดจากพืชต้นหนึ่งไปสู่อีกต้อนหนึ่งโดยตรง หรืออาศัยพาหะ เช่น ลม น้ำ หรือสัตว์ อาการของโรคพืชที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย เช่น อาการเน่าเละ (soft rot) เหี่ยวเฉา (wilt) แห้งตาย (blight) แห้งตายเป็นจุด (spot หรือ lesion) หรืออาการบวมพองเป็นปุ่มปม (gall หรือ tumor) (ประสาทพร, 2534; ไพโรจน์, 2525)

ตัวอย่างแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เช่น

Xanthomonas campestris pv. *campestris* เป็นสาเหตุโรคเน่าดำของกะหล่ำ โรคเหี่ยวจากแบคทีเรีย (bacterial vascular wilt) ในพืชผัก พืชไร่ ไม้ดอก ไม้ประดับ และพืชในเขตร้อน อาการโรคเน่าระดับดิน ต้นกล้ามีอาการแคระแกร็น การเจริญมีเพียงด้านเดียว เส้นใบเป็นสีดำ ต่อมาเป็นสีน้ำตาล แล้วลามไปใบอื่น ส่วนโรคเหี่ยวนั้น *X. campestris* เข้าสู่ไซเลมทำให้อุดตัน ต่อมาย่อยผนังของไซเลม แล้วเพิ่มจำนวนไปยังพาเรนไคมา แบคทีเรียชนิดนี้สามารถอยู่ข้ามฤดูในซากพืช ในดิน และเมล็ดพืช

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* ก่อโรคแบคทีเรียลพัสตูลในถั่ว (bacterial pustule of beans) พบระบาดทั่วโลกในถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วแดง ถั่วลาย ถั่วลันเตา และถั่วลูปิน เชื้อเข้าทำลายพืชทุกส่วน ทั้งใบ ลำต้น ฝัก เมล็ด มีอาการจุดชุ่มน้ำนูน (pustule) มีสีน้ำตาลล้อมรอบสีเหลือง แล้วแผลใหญ่ขึ้น ทำให้ลำต้นหักล้มง่าย พบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ตามเศษซากพืช ในดิน และเมล็ด

R. solanacerum สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชวงศ์ Solanacearum และกล้วย พบในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ ยาสูบ มันฝรั่ง มะเขือเทศ กล้วย พริก มะเขือ ละหุ่ง ถั่วลิสง ขิง มันสำปะหลัง งา ปอกระเจา สัก พืชที่ติดเชื้อมีอาการใบเหี่ยว การเจริญชะงัก ไซเลมมีสีน้ำตาล พบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้กระจายอยู่ในดิน เข้าทำลายพืชทางบาดแผล เพิ่มจำนวนในโฟลเอมเจริญดีที่อุณหภูมิสูง

Pseudomonas syringae สาเหตุโรคแคงเกอร์ (canker) ในผลไม้เปลือกแข็ง เกิดอาการบนลำต้น ผล ใบ ตา ช่อดอก และกิ่งก้าน ลักษณะเป็นสะเก็ดนูนสีเหลืองถึงน้ำตาล ต่อมาเป็นสะเก็ดแข็ง บริเวณรอบแผลมีวงสีเหลืองเป็นมันล้อมรอบ เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ข้ามฤดูในพืช ตา ลำต้น เมล็ด เข้าทำลายพืชทางบาดแผลหรือช่องเปิดตามธรรมชาติ

Erwinia. carotovora และ *Burhkolderia cepacia* เป็นสาเหตุโรคเน่า (soft rot) ของพืชผัก ทำความเสียหายรุนแรงแก่พืชระหว่างการเพาะปลูก การเก็บรักษา และการขนส่ง ก่อโรคในกะหล่ำปลี แตงไทย ฝรั่ง แครอท แตงกวา มะเขือ ผักกาด หัวหอม มันฝรั่ง พริก น้ำเต้า ข้าวโพด ถั่ว มันเทศ แตงโม พืชที่ติดเชื้อมีอาการเน่าเละที่บริเวณผล หัว ราก ลำต้น ก้าน และตาที่อวบน้ำ อาการเน่าเละเกิดจากแบคทีเรียโรคพืชผลิตเอนไซม์ย่อยเพคตินย่อยสลายให้เซลล์พืชหลุดออกจากกัน เกิดกลิ่นเหม็น แบคทีเรียชนินี้อยู่ในซากพืชนานข้ามฤดู เข้าสู่พืชทางบาดแผลและรูเปิดตามธรรมชาติ และเจริญดีที่อุณหภูมิในประเทศเขตร้อน

<u>ราสาเหตุโรคพืช</u>

ราสาเหตุโรคพืชมีมากกว่า 8,000 ชนิด สามารถปรับตัวให้มีชีวิตอยู่ในอากาศ ดิน และน้ำ บางชนิดก่อให้เกิดโรคเฉพาะบางส่วนของต้นพืชหรือเฉพาะชนิดพืช แต่บางชนิดทำให้พืชเป็นโรคโดยไม่จำเพาะว่าเป็นส่วนใด หรือไม่จำเพาะกับชนิดพืช ราสาเหตุโรคพืชส่วนมากเป็นปรสิตแบบชั่วคราว สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว เชื้อราสามารถเข้าสู่ต้นพืชทางแผล รูเปิดตามธรรมชาติ หรือผ่านทาง cuticle และ epidermis โดยตรง ก่อให้พืชเกิดการเจริญผิดปกติจากการผลิตเอนไซม์ สารพิษ สารควบคุมการเจริญ หรือสารปฏิชีวนะ ซึ่งอาจทำลายเซลล์พืชโดยตรงหรือมีอิทธิพลต่อ metabolism ภายในเซลล์พืช (ชาตรี, 2534; นิตยา, 2534; นุชนารถ, 2534; ไพโรจน์, 2525; สมบัติ, 2534)

สภาพเหมาะสมต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อรามักเป็นสภาพเหมาะสมต่อการเกิดโรค การปลูกพืชในที่ร่ม หรือปลูกใกล้ชิดกันมากเกินไป มีอากาศถ่ายเทน้อย อากาศชื้น ทำให้เชื้อราเข้าทำลายพืชง่ายกว่าการปลูกพืชที่มีระยะห่าง อากาศถ่ายเทสะดวก และพืชได้รับแสงแดดเพียงพอ

ตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น

Rhizopus oligosporus เป็นราใน class Zygomycete สาเหตุโรคเน่าเละ (soft rot) ในผักและผลไม้ และไม้ดอกหลังการเก็บเกี่ยว เช่น มันเทศ สตรอเบอรี่ ท้อ แตง ถั่ว พบราชนิดนี้ทั่วไปในซากอินทรียสาร เช่น ซากพืช หรือพบในดินระหว่างฤดูเก็บเกี่ยว พบกระจายทั่วไปในอากาศ sporangiospore ของราชนิดนี้เข้าสู่ผักผลไม้ทางบาดแผล เมื่อเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชแล้วจะผลิตเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์เพคติเนส และเซลลูเลสเพื่อทำลายเนื้อเยื่อ เจริญดีในที่อากาศอบอุ่นและมีความชื้น

Fusarium oxysporum อยู่ใน class Deuteromycete เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพราย (Fusarium wilt) ในผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชไร่หลายชนิด เช่น กล้วย กาแฟ มะเขือเทศ ปาล์ม พบราชนิดนี้ทั่วไปในดิน โดยเฉพาะดินในเขตร้อน ในเรือนกระจก หรือในซากพืช *F. oxysporum* มีโครงสร้างที่เรียกว่า chlamydospore เป็นสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่มีผนังหนา จึงทำให้ทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่งอกนานเป็นปี chlamydospore เข้าสู่ต้นพืชทางราก เมื่อสปอร์สัมผัสกับสารที่หลั่งจากรากพืช หรือสัมผัสกับรากพืช ทำให้สปอร์งอกเป็นเส้นใยเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช หรืออาจเข้าสู่พืชทางบาดแผล จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อท่อลำเลียง ก่อให้เกิดอาการใบเหลืองจากใบล่างขึ้นสู่ด้านบน ใบและกิ่งเริ่มเหี่ยว ใบร่วง เซลล์ตามขอบใบตาย ต้นตาย ท่อลำเลียงเป็นสีน้ำตาลแดง ผลเน่าและร่วง

Alternaria sp. อยู่ใน class Deuteromycete เป็นสาเหตุโรคใบจุด (leaf spot) และใบไหม้ (leaf blight) ในผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ และผลไม้บางชนิด เช่น แคนตาลูป แตงกวา องุ่น มันฝรั่ง ถั่ว ผักกาด คะน้า บานชื่น เบญจมาศ ส้ม และมะนาว พบ chlamydospore ของ *Alternaria* sp. ในดินเขตร้อน ซากพืช หัวและเมล็ดพืช นอกจากนี้ *Alternaria* sp. ที่ติดอยู่กับเมล็ดพืช เข้าทำลายพืชในระยะต้นกล้า ก่อให้เกิดอาการโคนเน่าระดับดิน (damping off) ราชนิดนี้สร้างสปอร์ดีในสภาพอากาศชื้น เช่น ฝนตก หรือมีน้ำค้าง และเข้าสู่ต้นพืชทางบาดแผลหรือผิวชั้นนอกของต้นพืช ทำให้

ใบพืชมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ถ้าอุณหภูมิสูง แผลจะใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว ลักษณะเป็นวง แผลอาจเกิดอาการ canker

Aspergillus niger เป็นราใน class Deuteromycete ซึ่งก่อโรค Aspergillus crown ฝักและเมล็ดเน่าในถั่วลิสง และโรคราดำ(black mold) ในหอมใหญ่ ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจอย่างมาก ราชนิดนี้กระจายทั่วไปในอากาศและดิน มักพบเป็นผู้ย่อยอินทรียสาร เข้าสู่ต้นพืชทางเนื้อเยื่อที่อ่อนแอ หรือทางบาดแผล เมล็ดที่ติดเชื้อเมื่องอกเป็นต้นพบอาการโคนเน่าของต้นกล้า ต้นกล้าของถั่วลิสงที่ติดเชื้อเกิดอาการเหี่ยวอย่างรวดเร็ว พบเส้นใยราปกคลุมบริเวณที่ติดเชื้อ และยังก่อโรคในมันสำปะหลัง หรือเผือก ทำให้หัวมีสีน้ำตาลและเน่า

Sclerotium sp. อยู่ใน class Basidiomycete สาเหตุโรค southern blight หรือ Sclerotium rot ในผัก เช่น หอมใหญ่ หรือแครอท ราชนิดนี้มีโครงสร้างที่เรียกว่า sclerotia เป็นกลุ่มเส้นใยที่อัดตัวกันแน่นเป็นก้อนกลม ทำให้คงทนอยู่ในดินหรือซากพืชนานหลายปี ราชนิดนี้เจริญดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส sclerotia งอกเข้าสู่รากพืชโดยผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนสย่อยผนังเซลล์พืช พืชที่เป็นโรคมีอาการเน่าบริเวณรอบโคนต้น ใบด้านล่างเหี่ยวและเหลือง เนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

<u>การควบคุมโรคโดยชีววิธี</u>

การใช้สารกำจัดศัตรูพืชก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสารกำจัดศัตรูพืชเป็นสารที่สลายตัวยาก จึงตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลานาน และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต และทำให้ระบบนิเวศเสียสมดุล

การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) มีกลไกการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายแบบ ทั้งการผลิตสารปฏิชีวนะ การทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยใช้เอนไซม์ (lysis) การเจริญแข่งขันและแย่งสารอาหารหรือพื้นที่สำหรับการเจริญจากเชื้อสาเหตุโรคพืช รวมทั้งการเกิดภาวะปรสิตต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช การผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้น สารปฏิชีวนะมีผลยับยั้งการเจริญหรืออาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชตาย การทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยเอนไซม์นั้น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ เช่น เอนไซม์เซลลูเลส ไคติเนส กลูคาเนส และโปรตีเอส เอนไซม์เหล่านี้สามารถ

ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา การเจริญแบบแข่งขันเป็นอีกกลไกในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เจริญเร็วกว่าจะใช้สารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปัจจัยส่งเสริมการเจริญ ออกซิเจน รวมทั้งพื้นที่ว่างบนซับสเตรต ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชถูกจำกัดการเจริญ การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยภาวะปรสิตคือการที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและทำลายภายในเซลล์ (เกษม, 2532) ตารางที่ 1 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ควบคุมโรคพืชที่ใช้ในการค้า

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ biocontrol agent ที่ใช้ในการค้า

แบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์	โรคพืชหรือจุลินทรีย์โรคพืช	ชนิดพืช	การประยุกต์ใช้
Agrobacterium radiobacter	Galltrol-A	Crown gall ที่มีสาเหตุจาก *Agrobacterium tumerfaciens*	ผลไม้ ผลไม้เปลือกแข็ง และไม้ประดับในเรือนอนุบาล	ใช้ตะกอนเซลล์รดต้นอ่อน ราก และใช้รดดิน
Agrobacterium radiobacter	Nogall	*Agrobacterium tumerfaciens*	ไม้ยืนต้น	ใช้จุ่มราก
Bacillus subtilis	Epic	*Rhizoctonia solani, Fusarium* spp., *Alternaria* spp., และ *Aspergillus* spp. ที่เข้าสู่ต้นพืชทางราก	ฝ้ายและพืชวงศ์ถั่ว	ละลายผงเชื้อและผสมกับยาฆ่าเชื้อราที่ใช้ในการค้าเพื่อแช่เมล็ด
Bacillus subtilis	Kodiak	*Rhizoctonia solani, Fusarium* spp., *Alternaria* spp., และ *Aspergillus* spp. ที่เข้าสู่ต้นพืชทางราก	ฝ้ายและพืชวงศ์ถั่ว	ละลายผงเชื้อและผสมกับยาฆ่าเชื้อราที่ใช้ในการค้าเพื่อแช่เมล็ด
Bacillus subtilis	Kodiak	*Rhizoctonia solani, Fusarium* spp., *Alternaria* spp., และ *Aspergillus* spp. ที่เข้าสู่ต้นพืชทางราก	ฝ้ายและพืชวงศ์ถั่ว	ละลายผงเชื้อและผสมกับยาฆ่าเชื้อราที่ใช้ในการค้าเพื่อแช่เมล็ด
Bacillus subtilis	System 3	โรคในต้นอ่อนพืช	ข้าวบาร์เลย์ ถั่ว ฝ้าย ถั่วลิสง ถั่วลันเตา ถั่วเหลือง ข้าวเจ้า	ใช้แช่เมล็ดพืชที่ปลูกในกระถาง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์	โรคพืชหรือจุลินทรีย์โรคพืช	ชนิดพืช	การประยุกต์ใช้
Burkholderia cepacia	Deny	*Fusarium* spp., *Pythium* spp., ไส้เดือน	อัลฟาฟา ข้าวบาร์เลย์ ถั่ว โคลเวอร์ ฝ้าย ถั่วลันเตา เมล็ดข้าวฟ่าง ผัก ข้าวสาลี	ใช้คลุกโดยผสมกับถ่านหิน
Pseudomonas fluorescens	BrightBan A506	*Erwinia amylovora*	อัลมอนด์ แอปเปิ้ล เชอร์รี่ ลูกพีช ลูกแพร์ สตรอเบอร์รี่ มะเขือเทศ	ใช้จุ่มหรือฉีดพ่นผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว
Pseudomonas fluorescens	Conquer	*Pseudomonas tolassii*	เห็ด	ฉีดพ่น
Pseudomonas syringae	Bio-save 10	*Botrytis cinerea, Pennicillium* spp., *Mucor pyroformis, Geotrichum candidum*	พืชสกุลส้ม	ใช้จุ่มหรือพ่นผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว

ที่มา: Glick *et al*., 1999

Bacillus sp. เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์โรค เนื่องจากสามารถผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์และสารปฏิชีวนะหลายชนิด สร้างเอนโดสปอร์เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญ จึงเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อม

ในปี 1963 Paulus anf Gray ศึกษาการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ polymyxin B ซึ่งยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบจาก *B. polymyxa* และรายงานว่าการสังเคราะห์ polymyxin B เริ่มในช่วงระหว่างกึ่งกลาง log phase และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสูงสุดในระยะ stationary phase สารปฏิชีวนะ chloramphenicol มีผลให้การผลิต polymyxin B ลดลงเล็กน้อยในช่วง 6 ชั่วโมงแรก แต่การเจริญลดลงอย่างมากเนื่องจากสภาวะความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารปฏิชีวนะ gavaserine และ saltavalin เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่ผลิตจาก *B. polymyxa* สายพันธุ์ BP1 รายงานโดย Pichard et al (1995) ซึ่งแยกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จากเมล็ด

กะหล่ำปลี พบว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ได้ผลดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลแลกโตส แอมโมเนียมซัลเฟต ไบโอติน และกรดอะมิโน เมื่อ *B. polymyxa* สายพันธุ์ BP1 มีอายุ 12 ชั่วโมงก่อนการสร้างเอนโดสปอร์จนถึงระยะ stationary phase ในวันที่ 5 และลดลงหลังจากเชื้อมีอายุ 8 วัน

สารปฏิชีวนะอีกประเภทที่ยับยั้ง *X. campestris* คือลิโปเปปไทด์ จาก *Bacillus* sp.ดังที่ รัชฎาวรรณและสุดฤดี (2547) รายงานว่า *B. firmus* สายพันธุ์ KPS46 สามารถผลิตสารที่โครงสร้างคล้ายลิโปเปปไทด์เมื่อเลี้ยงในอาหาร Malt-Yeast Extract สารชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้ง *X. campestris* pv. *glycines* ส่วน Monteiro *et al.* (2005) รายงานว่า *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. subtilis* R14 และ *B. megaterium* C116 ผลิตสารลิโปเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *X. campestris* pv. *campestris* และ *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ผลิตสารยับยั้งในระยะปลาย exponential phase

การควบคุมสาเหตุโรคพืชที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียโดยใช้ *Bacillus* sp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ นอกจาก *Bacillus* sp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ยังมีกลไกอีกประเภท คือกระตุ้นให้พืชผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ดังที่ Silva *et al.* (2004) รายงานว่าการเคลือบเมล็ดมะเขือเทศด้วย *B. cereus* B101R กระตุ้นให้มะเขือเทศผลิตเอนไซม์ lipoxygenase, phenylalanine ammonia-lypase และ peroxidase ลดการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *tomato* การควบคุมสาเหตุโรคพืชลักษณะนี้เป็นแบบไม่จำเพาะ เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. solani* สาเหตุโรคไหม้ เชื้อรา *Corynespora cassiicola* สาเหตุโรคใบไหม้ เชื้อรา *Oidium lycopersici* สาเหตุโรคราแป้ง *Stemphilium solani* สาเหตุโรคใบจุด และเชื้อแบคทีเรีย *X. acampestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคจุดจากแบคทีเรีย แต่ระดับการควบคุมโรคแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อก่อโรค

สำหรับการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชนั้น Walker *et al.* (1998) รายงานว่า *B. polymyxa* สายพันธุ์ D4 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ B3, C1 และ J7 จาก spermatosphere ของถั่วลันเตาและถั่วเหลือง ผลิตสารยับยั้งราโรคพืชออกมาในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถยับยั้ง *Botrytis cinerea* และ *Pythium mamillatum* สารยับยั้งเชื้อราดังกล่าวนี้มีคุณสมบัติทนความร้อน แต่ยังไม่ทราบชนิดและกลไกการยับยั้ง

ในปี 2002 Perrin and Jensen รายงานว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ PKB1 ผลิตสารปฏิชีวนะ fusaricidin ที่ยับยั้ง *Leptosphaeria maculans* การผลิตสาร fusaricidin เกิดขึ้นในช่วงต้นของการเอนโดสปอร์ และผลิตดีที่สุดในอาหาร Potato Dextrose Broth และต่อมาในปี 2004 Yang *et al.* ศึกษาการใช้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ PKB1 เพื่อควบคุมโรค seedling bright และโรครากเน่าซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium* sp. ในการปลูกแตงกวาแบบไม่ใช้ดิน *P. polymyxa* สายพันธุ์ PKB1 สามารถยับยั้ง *Pythium* sp. 9 สายพันธุ์ทั้งบน Potato Dextrose Agar และ Nutrient Agar นอกจากนี้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ PKB1 ยังสามารถสนับสนุนการเจริญของพืช โดยเพิ่มการงอกของเมล็ดแตงกวาและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนเมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Pythium* sp. บน Water Agar plate ส่วนการทดสอบในระบบ hydroponic พบว่าเชื้อ *P. polymyxa* สายพันธุ์ PKB1 สามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวนในสารละลายที่ใช้เพาะปลูกแตงกวา และส่งผลให้ต้นแตงกวาทนต่อเชื้อราโรคพืช รวมทั้งช่วยเพิ่มผลผลิต

การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดย *Bacillus* sp. สัมพันธ์กับการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ ดังที่ Nielsen and Sørensen (1997) รายงานว่า *P. polymyxa* 2 สายพันธุ์และ *B. pumilus* 13 สายพันธุ์ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากและผิวรากต้นข้าวบาร์เลย์ ซึ่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แมนาเนส ไซลาเนส เคซีเนส และไคติเนส สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Rhizoctonia solani, Aphanomyces cochleoides* และ *Pythiumultimum* โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ทุกชนิดสามารถยับยั้งราดีกว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เพียงบางชนิด

Bacillus sp. สามารถยับยั้ง *Botrytis cinerea* บนอาหาร PDA เมื่อเลี้ยงร่วมกัน และเส้นใยบริเวณขอบของบริเวณยับยั้งมีสีเข้มและอัดตัวกันแน่น เส้นใยบวม การงอกของโคนิเดียถูกยับยั้ง ก้านชูโคนิเดียมีรูปร่างผิดปกติ และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์นี้ทำหน้าที่เป็น elicitor กระตุ้นการผลิต phytoalexin หรือสารชีวภาพที่ผลิตขึ้นเพื่อป้องกันต้นพืชเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งไม่มีชีวิต ชนิด resveratrol ในต้นองุ่น และปริมาณ resveratrol เพิ่มสูงขึ้นเมื่อต้นองุ่นถูก infect ด้วย *B. cinerea* (Paul *et al.*, 1998)

Paenibacillus sp. สายพันธุ์ B 2 ซึ่งแยกจาก mycorrhizosphere ของต้นข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โปรตีเอส ไคติเนส และเพคติเนส แบคทีเรียสายพันธุ์ B 2 สามารถยับยั้งราโรคพืช *Phytophthera parasitica* และ *F. oxysporum* บนอาหารแข็ง โดยยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา การเกิดสปอแรงเจียม การงอกของซูโอสปอร์ และการยืดตัวของ germ tube

องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ เกิด vesicle สะสมที่บริเวณระหว่างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ของเชื้อราบิดเบี้ยวเสียรูปอย่างรุนแรง ผนังเซลล์ของราโรคพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกทำลายโดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนส ทำให้เกิดรูรั่วบนผนังเซลล์และมีผลต่อเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจาก *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ B 2 จะสามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืช 2 ชนิดดังกล่าวนี้แล้วยังสามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชอื่นๆ เช่น *F. culmorum* F. cul 1, *Aphanomyces euteiches* 502, *Chalara elegans* 84.1, *Pythium* sp. สายพันธุ์ OP 4 และ *Rhizoctonia solani* (Budi *et al.*, 1999; Budi *et al.*, 2000)

Fusarium verticilliodes เป็นสาเหตุโรคในข้าวโพด (*Zea mays* L.) ต้นข้าวโพดที่ติดเชื้อมีอาการหลายระดับ ตั้งแต่ไม่แสดงอาการไปจนถึงเน่าและทั้งต้น และผลิตสาร Fumonisin B_1 ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อมนุษย์และสัตว์ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้กับ *B. subtilis* สายพันธุ์ CE1 บนอาหารแข็งที่มี maize meal extract 3% พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ CE1 ยับยั้งการเจริญของ *F. verticilliodes* 60% รวมทั้งลดปริมาณการผลิต Fumonisin B_1 50% เมล็ดข้าวโพดที่เคลือบด้วย *B. subtilis* สายพันธุ์ CE1 ปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปปลูกในเรือนกระจกพบว่าลดปริมาณเชื้อรา *F. verticilliodes* บริเวณรอบๆรากต้นข้าวโพด 99.86% (Cavaglieri *et al.*, 2005)

โรค stem-end rot เป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญของอะโวคาโด มีสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิด เช่น *Dothiorella aromatica* และ *Phomopsis perseae* เชื้อราก่อโรคจะเข้าสู่ผลอะโวคาโดโดยผ่านทางปลายกิ่งหรือดอกในช่วงเริ่มต้นของการเจริญและแสดงอาการของโรคในระยะที่ผลอะโวคาโดเริ่มสุกภายหลังการเก็บเกี่ยว Demoz and Korsten (2006) รายงานว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ B246 ซึ่งเป็นที่ยอมรับแล้วว่าสามารถยับยั้งโรค Cerospora spot และโรค anthracnose สามารถยับยั้งโรค stem-end rot โดยที่ *B. subtilis* สายพันธุ์ B246 สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนในดอกอะโวคาโดและสามารถเกาะกับโคนิเดียหรือเส้นใยของเชื้อราโรคพืช กลไกการยับยั้งเชื้อราโรคพืชโดยย่อยสลายเซลล์เชื้อรา

แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชสามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืช ดังที่ Idris et al (2007) รายงานไว้ว่า *B. stearothermophilus* สายพันธุ์ KBE5-7, *B. cereus* สายพันธุ์ KBE5-1 และ *B. cereus* สายพันธุ์ NAE5-5 ซึ่งแยกจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (L) Moench) สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรครากเน่าและยอดเน่าในข้าวฟ่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับเชื้อราโรคพืชในห้องปฏิบัติการ และเมื่อทดสอบกับต้นข้าวฟ่างในเรือนกระจก พบว่า *Bacillus* ทั้ง 4 สาย

พันธุ์นี้สามารถยับยั้งการเกิดโรค 100% แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนในรากพืช และสนับสนุนการเจริญของต้นข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวฟ่างที่เคลือบด้วย*Bacillus* 4 สายพันธุ์นี้ เมื่องอกเป็นต้นมีมวลของรากมากกว่าเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบด้วยเชื้อ

B. cereus สายพันธุ์ QQ 308 เจริญในอาหารเหลวที่มีเปลือกกุ้งและเปลือกปู สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตซาเนส และเอนไซม์โปรตีเอส ส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืช *F. oxysporum*, *F. solani* และ *P. ultimum* แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ยับยั้งเชื้อราโรคพืชโดยยับยั้งการงอกของสปอร์ ส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อนำไปรดต้นกะหล่ำปลีสามารถส่งเสริมการเจริญโดยเพิ่มน้ำหนักของผลผลิต (Chang *et al.*, 2007)

ในปี 1983 Tautorus and Townsley รายงานว่า *Bacillu*s sp. สายพันธุ์ AOG ยับยั้งเชื้อรา *Chaetomium olivaceum* ซึ่งก่อโรคในเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) โดยยับยั้งทั้งบนผิวหน้าอาหารแข็งและในวัสดุเพาะเห็ด เมื่อใส่เชื้อ *Bacillu*s sp. สายพันธุ์ AOG ลงในวัสดุเพาะเห็ดจะช่วยส่งเสริมการเจริญของเส้นใยเห็ด ต่อมาในปี 1984 Tautorus and Townsley รายงานว่าการยับยั้งเชื้อรา *Chaetomium olivaceum* โดย *Bacillu*s sp. สายพันธุ์ AOG เกิดจากการผลิตสารปฏิชีวนะ chaetomacin

สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่ามีผู้ใช้ *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมสาเหตุโรคพืชดังมีรายงานว่าเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 ที่แยกจากเมล็ดข้าวในปี 2530 ยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว ได้แก่ แบคทีเรีย *X. campestris* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง และเชื้อรา *Pyricularia oryzae, Cercospora oryzae, Thamatephorus cucumeris, Curvularia lunata, Acrocylindrium oryzae, Rhynchosporium oryzae* และ *A. padwickii* แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-26 ยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 8 ชนิดนี้ได้ดี ส่วนสายพันธุ์ NSRS 89-24 ไม่สามารถยับยั้ง *T. cucumeris* แต่ยับยั้งเชื้อก่อโรคอีก 7 ชนิดได้ดี โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 มีกลไกการยับยั้งแบบผลิตสารปฏิชีวนะ และสายพันธุ์ NSRS 89-26 ยับยั้งแบบภาวะปรสิต (สมคิด, 2540)

B. subtilis สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 ในรูปผงเชื้อสำเร็จรูป สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานกว่า 1 ปี และสามารถควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) และ *Macrophomina phaseoli* สาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเหลืองได้ดี (สมคิด , 2540)

การสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus*

เอนโดสปอร์เป็นโครงสร้างที่พบในแบคทีเรียบางชนิด คือ *Bacillus, Clostridium, Sporosarcina, Thermoactinomyces* หรือ *Desulfomaculum* เป็นโครงสร้างที่ทำให้แบคทีเรียทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เอนโดสปอร์เกิดขึ้นภายในเซลล์ ใน 1 เซลล์มีเพียง 1 เอนโดสปอร์ ดังนั้นการสร้างเอนโดสปอร์จึงไม่ใช่เพื่อการสืบพันธุ์ รูปร่างและตำแหน่งของเอนโดสปอร์แตกต่างกันตามสปีชีส์ สปอร์อิสระสามารถทนความแห้ง สีย้อม สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ รังสี และความร้อน ความสามารถในการทนความร้อนของเอนโดสปอร์แตกต่างกันตามสปีชีส์ ซึ่งส่วนใหญ่สามารถทนความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 10 นาที

แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ มีลักษณะสะท้อนแสง ไม่สามารถย้อมสีด้วยวิธีธรรมดา ต้องย้อมด้วยวิธีย้อมแบบพิเศษ เอนโดสปอร์ทำให้แบคทีเรียในจีนัสนี้ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น สภาวะขาดแคลนสารอาหาร เอนโดสปอร์มีคุณสมบัติทนต่อความร้อน ความแห้ง รังสี UV กรด และสารเคมีต่างๆ รวมทั้งสารฆ่าเชื้อ

สปอร์อิสระที่หลุดออกจากเซลล์แล้วทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากมีผนังหลายชั้น ชั้นนอกสุดคือชั้น exosporium เป็นผนังบางๆ ถัดมาคือ spore coat ประกอบด้วยโปรตีนชั้นเดียวหรือหลายชั้น ชั้นถัดมาคือ cortex ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนที่เกิดพันธะเชื่อมกันหลวมๆ ถัดจากชั้น cortex คือชั้น cell wall และ core เป็นชั้นในสุด ประกอบด้วยองค์ประกอบของเซลล์ และกรดไดพิโคลินิคซึ่งพบเฉพาะในเอนโดสปอร์ เป็นสารที่ทำให้เอนโดสปอร์ทนความร้อน ปัจจัยอีกประการที่ทำให้เอนโดสปอร์ทนความร้อนได้ดีคือไซโตพลาซึมของเอนโดสปอร์อยู่ในสภาพที่ถูกกำจัดน้ำออก ทำให้ไม่เกิดเมตาบอลิซึม (กัญจนา, 2537; เจษฎาวรรณ, 2544)

การสร้างเอนโดสปอร์เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของ *Bacillus* อยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็น เช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase ปริมาณสารอาหาร เช่น น้ำตาลกลูโคสที่หมดลงจะกระตุ้นยีนที่ควบคุมการผลิต intracellular และ extracellular enzyme ซึ่ง intracellular enzyme นั้นรวมถึงเอนไซม์ใน tricarboxylic acid (TCA) cycle และเอนไซม์อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการใช้แหล่งคาร์บอน การเจริญของเซลล์ในระยะ exponential phase จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกรดอินทรีย์ เช่น ไพรูเวต และอะซีเตต สะสมใน

อาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเหลือประมาณ 5.0-6.0 หลังจากน้ำตาลกลูโคสหมดลง เอนไซม์ใน TCA cycle จึงถูกกระตุ้น *Bacillus* สามารถใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 7.0 เนื่องจากเซลล์ปรับตัวให้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ระยะนี้เริ่มสังเกตเห็น spore septum และพบการย่อยสลายโปรตีนภายในไซโตพลาซึมเพื่อนำกรดอะมิโนไปสร้างเป็นโปรตีนในเอนโดสปอร์ การสร้างเอนโดสปอร์ใช้พลังงานจากโปรตีนภายในเซลล์และ poly-β-hydroxybutyrate (PHB) ที่สะสมภายในเซลล์ (กัญจนา, 2537; Doi, 1989) การสร้างเอนโดสปอร์จนเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลานานหลายชั่วโมง สปอร์อิสระเป็นระยะพักตัวของเซลล์ ภายในสปอร์ไม่มีกิจกรรมใดๆเป็นเวลานานหลายปี ทำให้พบ *Bacillus* ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม สปอร์สามารถงอกกลับเป็นเซลล์ปกติถ้าอยู่ในสภาวะเหมาะสม มีอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญ

การสร้างสปอร์เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการมีชีวิตอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่มีความรุนแรง สปอร์ทนทานต่อสภาวะที่อันตราย เช่น ความร้อน H_2O_2 หรือรังสี UV สูงกว่าตัวเซลล์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น การกำจัดน้ำออกจากเซลล์ โครงสร้างของชั้น cortex การตรึงแร่ธาตุของเอนโดสปอร์และกรดไดพิโคลินิค รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ เช่นสภาวะการเพาะเลี้ยง หรือปัจจัยภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

การกำจัดน้ำออกจาก spore core เกิดขึ้นระหว่างการสร้างเอนโดสปอร์ ในเอนโดสปอร์มีน้ำอยู่เพียง 0.5-1.0 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ตัวเซลล์มีน้ำอยู่ถึง 3.0-4.0 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การกำจัดน้ำออกทำให้เอนโดสปอร์ทนต่อความร้อน โปรตีนภายในเซลล์มีความเสถียรสูง ไม่ถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อน การสะสมแร่ธาตุภายในเอนโดสปอร์และการพัฒนาโครงสร้างชั้น cortex มีผลต่อการลดปริมาณน้ำใน spore core (Atrih and Foster, 2001)

ระดับความทนทานต่อความร้อนของเอนโดสปอร์เกี่ยวข้องกับขนาดของ cortex โครงสร้างของเปปติโดไกลแคนในแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพักตัวและการทนความร้อนของเอนโดสปอร์ เปปติโดไกลแคนของเอนโดสปอร์เกิดพันธะอย่างหลวมๆ (กัญจนา, 2537; เจษฎาวรรณ, 2543; Atrih and Foster, 2001)

เอนโดสปอร์สะสมแร่ธาตุ เช่น Ca^{2+} Mg^{2+} และ Mn^{2+} ภายใน spore core ทำให้เอนโดสปอร์มีความเสถียรต่อความร้อน การเติม Ca^{2+} Mg^{2+} และ Mn^{2+} ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ *Bacillus*

สร้างเอนโดสปอร์มากขึ้น เอนโดสปอร์มีความเสถียร และทนความร้อนเพิ่มขึ้น (Atrih and Foster, 2001; Beaman and Gerhardt, 1986; Bender and Marquis, 1985; Igura *et al.*, 2003; Marquis and Bender, 1985; Oomes and Brul, 2004) การตรึงแร่ธาตุภายในเอนโดสปอร์ที่เพิ่มขึ้น เกี่ยวข้องกับการลดปริมาณน้ำภายใน spore core ส่วนกรดไดพิโคลินิคภายในเอนโดสปอร์ทำหน้าที่เป็น chelate จับกับประจุ 2+ และแทนที่น้ำภายใน spore core เป็นการลดปริมาณน้ำ จึงทำให้เอนโดสปอร์ทนความร้อน (Setlow *et al.*, 2006)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงมีผลต่อคุณสมบัติของเอนโดสปอร์ เช่น ชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งวิตามิน มีผลต่อการสร้างเอนโดสปอร์ (Dingman and Stahly, 1983; de Vries *et al.*, 2005; Warriner and Waites, 1999) *Bacillus* ที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิสูงจะสร้างเอนโดสปอร์ทนความร้อนสูงกว่า *Bacillus* ที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิต่ำกว่า การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูงจะกระตุ้นให้ *Bacillus* สร้าง heat shock protein ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้โปรตีนภายในเซลล์ตกตะกอน (Atrih and Foster, 2002; Sedlák *et al.*, 1993)

Bacillus บางสปีชีส์สร้างสปอร์ยาก หรือสายพันธุ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเมื่อต่อเชื้อบ่อยๆ ทำให้ *Bacillus* สูญเสียความสามารถในการสร้างสปอร์ จึงต้องกระตุ้นให้สร้างเอนโดสปอร์ แมงกานีสเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการกระตุ้นการสร้างสปอร์ โดยผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และต้องให้แมงกานีสกับเซลล์ในระยะ exponential phase เพื่อกระตุ้นการสร้างเอนโดสปอร์ ถ้าให้แมงกานีสกับเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้วไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเอนโดสปอร์ (Charney *et al.*, 1951) *B. larvae* สายพันธุ์ NRRL B-3650 โดยปกติสร้างเอนโดสปอร์ยากในอาหารเหลว แต่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ในอาหารสูตร TMYGP ที่มี yeast extract น้ำตาลกลูโคส ไพรูเวต พีเอช 7.0 ซึ่ง yeast extract เป็นองค์ประกอบของอาหารที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ ส่วนน้ำตาลกลูโคสและไพรูเวตจำเป็นต่อการสร้างเอนโดสปอร์ แบคทีเรียนี้สามารถสร้างเอนโดสปอร์ $5x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Dingman *et al.*, 1983) สำหรับการสร้างเอนโดสปอร์ของ*B. subtilis* สายพันธุ์ PS 346 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไรโบสให้ผลดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือไรโบสเพียงชนิดเดียว (Warriner and Waites, 1999)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Satorius)

1.2 เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง (CHAUS, Precision Plus)

1.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert)

1.4 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (JENWAY, 6405 UV/Vis)

1.5 หม้อนึ่งความดันไอ (SANYO, MLS-3020)

1.6 เครื่อง refrigerated centrifuge (Kokusan H1500FR)

1.7 เครื่องวัดพีเอช (CONSORT, C830)

1.8 เครื่องเขย่า (New Brunswick Scientific, innova 2100 platform shaker)

1.9 เครื่องผสม (VORTEX GENIE 2)

1.10 อ่างน้ำแข็ง

1.11 ตู้ปลอดเชื้อ (BIOHAZARD)

1.12 กล้องจุลทรรศน์

1.13 เครื่องแก้วที่จำเป็นในการวิเคราะห์

1.17 ปิเปตอัตโนมัติขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.18 ลูป

1.19 เข็มเขี่ยเชื้อ

1.20 แท่งแก้วงอ

1.21 Cork boror No.3

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1 Nutrient Agar (NA)

2.2 Nutrient Broth (NB)

2.3 อาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus* sp.

2.4 อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

2.5 อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

2.6 อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.7 อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

2.8 อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

2.9 อาหารเหลวสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

2.10 อาหารเหลวสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

2.11 อาหารเหลวสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.12 อาหารเหลวสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

2.13 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

2.14 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

2.15 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

2.16 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

2.17 อาหารเหลวสำหรับผลิตกรดจากการหมักน้ำตาล

2.18 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

2.19 Potato Dextrose Agar (PDA)

2.20 Yeast Extract Polypeptone Dextrose Agar (YPD)

2.21 คลอโรฟอร์ม

2.22 NA ที่ผสม $MnSO_4$ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.23 Soil Extract Agar

2.24 AK#2 Agar

2.25 Glucose Yeast Extract Salt (GYS)

2.26 NA ที่เติม ccy Sporulation Medium

3. <u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

3.1 แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* สปีชีส์ต่างๆที่ใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบ จากแหล่งเก็บเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

3.2 สารเร่งปุ๋ยหมักพด.1 ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3.3 ราสาเหตุโรคพืช *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus*, *Sclerotium* sp. และ *Trichoderma harzianum* ได้รับความอนุเคราะห์จากอ.ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และรศ.ดร.สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4 แบคทีเรียโรคพืช *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, X. *campestris* pv. *glycines*, X. *campestris* pv. *phaseoli*, X. *campestris*, *Psuedomonas syringae* pv. *mori*, *P. solanacerum*, *P. cepacia* และ *Erwinia carotovora* จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5 เชื้อเห็ดฟาง ได้รับความอนุเคราะห์จากอ.อัจฉรา พยัพพานนท์ กลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เห็ดนางฟ้าภูฏานครีม เห็ดนางฟ้าภูฏานดำ เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดขอนขาว และเห็ดหูหนู

วิธีการ

1. <u>การแยก *Bacillus* sp. จากสารเร่งพด.1</u>

ชั่งสารเร่งปุ๋ยหมักพด.1 ปริมาณ 1.0 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำ heat shock โดยให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที เจือจางในระดับที่เหมาะสม หยดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าอาหาร NA แล้วเกลี่ยให้ทั่วด้วยแท่งแก้วงอ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาย้อมแกรมแล้วดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกโคโลนีที่เป็น *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวกหรือแกรม variable และสร้างสปอร์ โดยศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำมาทำ cross streak บนผิวหน้าอาหาร NA เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อที่แยกได้บนผิวหน้า NA slant ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้งาน

2. <u>การจำแนก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสารเร่ง พด.1</u>

2.1 การจำแนก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสารเร่ง พด.1 โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยตรวจดูลักษณะโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบน NA ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยศึกษารูปร่างของเซลล์ ความกว้างและความยาวของเซลล์ การติดสีแกรม รูปทรงและตำแหน่งของสปอร์ภายในเซลล์และการทำให้เซลล์โป่ง รวมทั้งการสะสม granule ภายในเซลล์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ได้แก่ การตรวจการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน การหมัก butylene glycol ในอาหารเลี้ยงเชื้อ VP broth และค่าพีเอชใน VP broth หลังการเจริญ 7 วัน การรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ การหมักกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคส แอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส และดี-แมนนิทอล การสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายเคซีน เจลาติน และแป้ง การใช้ซิเตรตและโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน การสร้างเอนไซม์เลซิธิเนสบนอาหาร egg yolk agar การเจริญในอาหารเหลวที่ pH 6.8 และ 5.7 การเจริญในอาหารเหลวที่มีเกลือ NaCl 5%, 7% และ 10% ตามวิธีการใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (1986)

2.1 การจำแนก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 โดยวิธี BIOLOG

เลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 โดย streak บน NA ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปแตะโคโลนีเดี่ยวที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง streak ลงบนอาหาร BUG agar (Biolog Universal Growth) ที่ผสมน้ำตาลมอลโตส 0.25% เพื่อยับยั้งการสร้างสปอร์ และทาผิวหน้าอาหารด้วย Thioglycollate solution 5 mM เพื่อป้องกันการสร้างเมือก โพลีแซคคาไรด์ หรือแคปซูล streak เชื้อเป็นรูปตัว Z แคบๆกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ทับกันเป็นเครื่องหมายบวก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใช้ลูปแตะเชื้อที่อยู่บริเวณขอบจานทั้ง 4 ด้านมาทำ suspension ใน IF medium (inoculation fluid: 0.40% Nacl, 0.03% Pluronic F-68, 0.01% Gellan Gum) วัดความขุ่นของ suspension ให้ได้ 28% transmittance โดยเครื่องวัดของ Biolog catalog 3531 แล้วจึงดูด suspension ใส่ลงใน GP2 microplate ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 95 ชนิด หลุมละ 150 ไมโครลิตร แหล่งคาร์บอนนี้มีความจำเพาะกับแบคทีเรียแกรมบวก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง และ 16-24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลด้วยเครื่องอ่านผล การอ่าน pattern การเกิดผลบวกดูจาก

ความเข้มของสี tetrazolium ถ้าเชื้อเจริญในอาหารนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญจะยังคงใสไม่มีสี pattern การเกิดผลบวกลบของแหล่งคาร์บอน 95 ชนิดที่แตกต่างกันทำให้สามารถจัดจำแนกชนิดได้โดย Biolog's Microlog computer program

3. <u>การเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์</u>

3.1 การเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย

3.1.1 การต่อเชื้อ (subculture)

เก็บเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ในการทดลอง โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงอาหาร NA slant สายพันธุ์ละ 5 หลอด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญแล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.2 การเก็บแบบเยือกแข็ง (deep freeze)

เก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียระยะยาว โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดแบคทีเรียปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงใน cryovial tube ที่บรรจุกลีเซอรอลความเข้มข้น 20% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรที่ปลอดเชื้อ ในอัตราส่วนของเชื้อต่อกลีเซอรอล 1 ต่อ 1 โดยเทคนิคปลอดเชื้อ ปิดฝาหลอดให้สนิท ทำซ้ำสายพันธุ์ละ 5 หลอด จากนั้นนำ cryovial tube ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วจึงย้ายไปเก็บต่อที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.2 การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเชื้อเห็ด

3.2.1 การต่อเชื้อ (subculture)

เก็บเชื้อราและเชื้อเห็ดสำหรับใช้ในการทดลอง โดยถ่ายเชื้อลงอาหาร PDA slant สายพันธุ์ละ 5 หลอด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญแล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเชื้อเห็ดใต้น้ำมันพาราฟิน

ถ่ายเชื้อราและเชื้อเห็ดลงบนลงอาหาร PDA slant ในหลอดฝาเกียวสายพันธุ์ละ 5 หลอด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารแล้วจึงเทน้ำมันพาราฟินปลอดเชื้อทับลงบนเส้นใย ปิดฝาเกลียวให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. <u>การทดสอบการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสาร่ง พด.1</u>

4.1 ทดสอบการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ในอาหารแข็ง

4.1.1 การเตรียมเชื้อ

ใช้ลูปแตะเชื้อจาก working culture แล้วถ่ายลง NA slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

4.1.2 ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ต่อไปนี้

(1) เอนไซม์โปรตีเอส

ถ่ายเชื้อจากข้อ 4.1.1 ด้วยวิธี point inoculation ลงบนอาหาร Milk agar สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

ตรวจผลโดยดูวงใสรอบโคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Co) และเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี (Cz) เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง Cz/Co ของ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์

(2) เอนไซม์อะไมเลส

ถ่ายเชื้อจากข้อ 4.1.1 ด้วยวิธี point inoculation ลงบนอาหาร Starch agar สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน ตรวจผลโดยราดสารละลายไอโอดีนลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ดูวงใสรอบโคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Co) และเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี (Cz) เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง Cz/Co ของ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์

(3) เอนไซม์เซลลูเลส

ถ่ายเชื้อจากข้อ 4.1.1 ด้วยวิธี point inoculation ลงบนอาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ก ข้อ 3) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ตรวจผลโดยราดสารละลาย Congo red ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้นาน 15 นาที ล้างออกด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ดูวงใสรอบโคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Co) และเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี (Cz) เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง Cz/Co ของ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์

(4) เอนไซม์ไซลาเนส

ถ่ายเชื้อจากข้อ 4.1.1 ด้วยวิธี point inoculation ลงบนอาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (ภาคผนวก ก ข้อ 4) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยราดสารละลายไอโอดีนลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ดูวงใสรอบโคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Co) และเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี (Cz) เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง Cz/Co ของ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์

(5) เอนไซม์ไคติเนส

ถ่ายเชื้อจากข้อ 4.1.1 ด้วยวิธี point inoculation ลงบนอาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส (ภาคผนวก ก ข้อ 5) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยดูวงใสรอบโคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Co) และเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี (Cz) เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง Cz/Co ของ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์

4.2 ทดสอบการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ในอาหารเหลว

4.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter)

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ลงบน NA slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 1 ลูปลงอาหาร NB ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

4.2.2 การผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ในอาหารเหลว

ถ่ายเชื้อจากข้อ 4.2.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (ภาคผนวก ก ข้อ 6) อะไมเลส (ภาคผนวก ก ข้อ 7) เซลลูเลส (ภาคผนวก ก ข้อ 8) และไซลาเนส (ภาคผนวก ก ข้อ 9) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงจนครบ 60 ชั่วโมง แบ่งตัวอย่างเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปเจือจางให้เหมาะสมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร แล้วเกลี่ยเชื้อบนอาหาร NA เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนที่ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของ crude enzyme ตามวิธีในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

(1) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสและแอสิดโปรตีเอส

โดยวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยซับสเตรต คือ สารละลายเคซีนที่มีความเข้มข้น 2% ใน Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 สำหรับเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส และพีเอช 4.0 สำหรับเอนไซม์แอสิดโปรตีเอส ทำปฏิกิริยาโดยอุ่นซับสเตรตและ crude enzyme ที่เจือจางเหมาะสมในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำซับสเตรต 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับ crude enzyme ที่เจือจางเหมาะสม 1.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 10% ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสมาวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Lowry และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสตามวิธีในภาคผนวก ข ข้อ 1 และ 2

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์โปรตีเอสเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยซับสเตรตคือเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่ทดสอบ

(2) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลส

วัดปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยซับสเตรตคือ soluble starch ที่มีความเข้มข้น 1% ใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ทำปฏิกิริยาโดยอุ่นซับสเตรตและ crude enzyme ที่เจือจางเหมาะสมในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำซับสเตรต 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ crude enzyme ที่เจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมน้ำ 15 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณน้ำตาลมอลโตสตามวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลสตามวิธีในภาคผนวก ข ข้อ 3 และ 4

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เบตาอะไมเลสเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยซับสเตรตคือ soluble starch แล้วเกิดน้ำตาลมอลโตส 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่ทดสอบ

(3) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยซับสเตรตคือคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) หรือ CMC ที่มีความเข้มข้น 1% ใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 สำหรับ endo-1,4-β-glucanase ที่ย่อยเซลลูโลสที่โครงสร้างไม่เป็นผลึก และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดกว้าง 10x60 มิลลิเมตรสำหรับวิเคราะห์ exo-1,4-β-glucanase ที่ย่อยเซลลูโลสที่โครงสร้างเป็นผลึก

วัดกิจกรรมของ endo-1,4-β-glucanase ที่ย่อยสลาย CMC โดยอุ่นซับสเตรตและ crude enzyme ที่เจือจางเหมาะสมในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำซับสเตรต 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับcrude enzymeที่เจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมน้ำ 15 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสตามวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวนกิจกรรมของ endo-1,4-β-glucanase ตามวิธีในภาคผนวก ข ข้อ 5 และ 4

วัดกิจกรรมของ exo-1,4-β-glucanase ซึ่งย่อยสลายกระดาษกรอง โดยอุ่น crude enzyme ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรที่เจือจางเหมาะสมในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วใส่กระดาษกรองลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมน้ำ 15 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสตามวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณกิจกรรมของ exo-1,4-β-glucanase ตามวิธีในภาคผนวก ข ข้อ 5 และ 4

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยซับสเตรตคือ CMC หรือกระดาษกรองแล้วเกิดน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่ทดสอบ

(4) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

วัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยซับสเตรตคือ soluble oat spelt xylan ที่มีความเข้มข้น 1% ใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ทำปฏิกิริยาโดยอุ่นซับสเตรตและ crude enzyme ที่เจือจางเหมาะสมในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำซับสเตรต 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ crude enzyme ที่เจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมน้ำ 15 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณน้ำตาลมอลโตสตามวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวิธีในภาคผนวก ข ข้อ 6 และ 4

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยซับสเตรตคือ soluble oat spelt xylan แล้วเกิดน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่ทดสอบ

5. <u>การยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากพด.1 และ ผลของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ต่อเส้นใยเห็ด</u>

5.1 การยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากพด.1

5.1.1 การเตรียมเชื้อ *Bacillus* sp.

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10, และ *Bacillus* sp. จากสารเร่งปุ๋ยหมักพด.1 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S1/1-3, S1(2-5), RS1/1 และ RS1/2 ที่เคยทดสอบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียโรคพืช ลงบน NA slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

5.1.2 การเตรียมแบคทีเรียโรคพืช

ถ่ายเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, X. *campestris* pv. *glycines*, X. *campestris* pv. *phaseoli*, X. *campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *mori*, *Ralstonia solanacerum*, *Burkholderia cepacia* และ *Erwinia carotovora* ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงอาหาร YPD broth ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.3 ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียโรคพืชโดย *Bacillus* sp

.

ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากข้อ 5.1.1 แล้วแตะลงบนผิวหน้าอาหาร YPD agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน รมควันฆ่าเชื้อ *Bacillus* sp. ด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร โดยหยดคลอโรฟอร์มลงบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ คว่ำก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนฝานาน 30 นาทีในตู้ดูดควัน ใช้ปิเปตแก้วที่ปลอดเชื้อถ่ายเชื้อจากข้อ 5.1.2 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรใส่ลงใน YPD soft agar ที่หลอมเหลว ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เททับลงบนโคโลนีของ *Bacillus* sp. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน วัดขนาดโคโลนีของ *Bacillus* sp. (Co) และวงใสรอบโคโลนี (Cz) คำนวณอัตราส่วนระหว่าง Cz/Co

5.2 การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp.จากพด. 1

5.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10, และ *Bacillus* sp. จากสารเร่งปุ๋ยหมักพด.1 ลงบน NA slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

5.2.2 การเตรียมเชื้อราโรคพืช

ถ่ายเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus*, *Sclerotium* sp. และ *Trichoderma harzianum* วางลงบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน

5.2.3 ศึกษาการยับยั้งเชื้อราโรคพืชโดย *Bacillus* sp.

ใช้จูปแตะ *Bacillus* sp. จากข้อ 5.1.1 ขีดลงบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ด้านให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านละประมาณ 2 เซนติเมตร และใช้ Cork borer No.3 ตัดปลายเส้นใยราจากข้อ 5.2.2 วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-6 วัน ให้เส้นใยราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ลงเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดบริเวณยับยั้ง โดยวัดจากขอบโคโลนีของแบคทีเรียจนถึงขอบโคโลนีของเชื้อรา

5.3 ผลของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ต่อเส้นใยเห็ด

5.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ลงบน NA slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

5.3.2 การเตรียมเชื้อเห็ด

ถ่ายเชื้อเห็ดฟาง เห็ดนางฟ้าภูฏานครีม เห็ดนางฟ้าภูฏานดำ เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดขอนขาว และเห็ดหูหนู ลงบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน

5.3.3 ศึกษาผลของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ต่อเส้นใยเห็ด

ใช้จูปแตะ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 จากข้อ 5.3.1 ขีดลงบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ด้านให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านละประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้ Cork borer No.3 ตัดปลายเส้นใยเห็ดจากข้อ 5.3.2 วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-15 วัน ให้เส้นใยเห็ดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ลงเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดบริเวณยับยั้ง โดยวัดจากขอบโคโลนีของแบคทีเรียจนถึงขอบโคโลนีของเชื้อรา

6. <u>การผลิตกรดจากน้ำตาล</u>

6.1 การเตรียมเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10, *B. subtilis* JCM 1465^{t}, *B. mojavensis* NRRL-B-14698^{t}, *B. atrophaeus*DSM 5151^{t}, *B. amyloliquefaciens* DSM 7^{t} และ *Bacillus* sp. จากสารเร่งปุ๋ยหมักพด.1 ที่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคส ได้แก่สายพันธุ์ LDD2, LDD3a, LDD3b และ LDD4 ลงบน NA slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 1 ลูปลงอาหาร NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผสมน้ำตาลดี-กลูโคส 0.5% ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

6.2 การผลิตกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคส

ถ่ายเชื้อจากข้อ 6.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงใน Basal medium ที่มีน้ำตาลดี-กลูโคส 0.5% ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อนำไปวัดค่าพีเอช

7. <u>การสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10</u>

7.1 ศึกษาการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

7.1.1 การเตรียมเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ลงบน NA slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

7.1.2 ศึกษาการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 บนอาหารแข็ง

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.1.1 จำนวน 1 ลูป ลงอาหารแข็งที่กระตุ้นการสร้างสปอร์ ได้แก่ NA, NA ที่ผสม $MnSO_4$ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, Soil Extract Agar, AK Agar #2, GYS Agar และ NA ที่ผสม ccy salt solution บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 10 และ 15 วัน เก็บตัวอย่างมา smear บนสไลด์ ย้อมสปอร์ด้วย Malachite green เทียบจำนวนสปอร์กับจำนวนสปอร์อิสระและ vegetative cell ทั้งหมดใน 1 field คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ในอาหารแต่ละชนิดทำสไลด์ 2 ซ้ำ และนับจำนวนซ้ำละ 15 filed หาค่าเฉลี่ย

7.2 ศึกษาการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ในอาหารเหลว

7.2.1 การเตรียมเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.1.1 จำนวน 1 ลูปลงอาหาร NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5% ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ

150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

7.2.2 การสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ในอาหารเหลว

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.2.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็งที่ทำให้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 สามารถสร้างสปอร์ได้ดี ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงจนครบ 7 วัน แยกตัวอย่างเป็น 5 ส่วน แบ่งตัวอย่างเป็น 5 ส่วน ส่วนที่ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้เหมาะสมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร แล้วเกลี่ยเชื้อบนอาหาร NA เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด ส่วนที่ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ heat shock โดยให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำมา 0.5 มิลลิลิตรเจือจางให้เหมาะสมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร NA เพื่อนับจำนวนสปอร์ที่ทนความร้อน ส่วนที่ 3 นับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยย้อมสปอร์ด้วย Malachite green แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนเชื้อทั้งหมดใน 1 field เช่นเดียวกับการนับจำนวนจากอาหารแข็ง ส่วนที่ 4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใสเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยวิธี DNS ดังภาคผนวก ข ข้อ 4 และส่วนที่ 5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร วัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

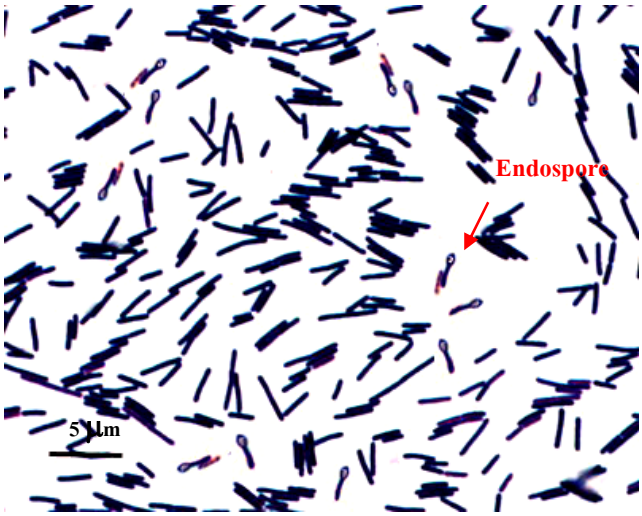
1. การจำแนก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ระดับสปีชีส์โดยคุณสมบัติทางชีวเคมี สรีรวิทยา และวิธี BIOLOG

แบคทีเรียสายพันธุ์ N10 แยกจากเปลือกปอสาแห้ง โดยอาศัยคุณสมบัติที่สามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนส (Sittidilokratna *et al.*, 2007) มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ดังนี้ ใส ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เจริญช้า แต่เจริญได้ดีบนอาหารที่มีน้ำตาลหรือแป้งเป็นองค์ประกอบ โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก เจริญทับถมกัน ทำให้โคโลนีมีลักษณะใหญ่ขึ้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิลิตรและมีความนูนมากขึ้น ส่วนการเจริญในอาหารเหลวเป็นลักษณะเดียวกันกับอาหารแข็ง คือสามารถเจริญในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบดีกว่าอาหารเหลวที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ

แบคทีเรียสายพันธุ์ N10 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ขนาดกว้างใกล้เคียง 1 ไมโครเมตร ยาว 2.0-3.0 ไมโครเมตร เรียงตัวแบบ palisade มีสปอร์เป็นรูปวงรีอยู่บริเวณปลายหรือค่อนข้างปลาย สปอร์ทำให้เซลล์โป่ง ดังภาพที่ 1

จากคุณสมบัติที่เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ ผลิตเอนไซม์คะตะเลส และเป็น facultative anaerobe จึงสามารถจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* ตามเกณฑ์ของ Claus and Berkeley (1986) นอกจากนี้ ผลการทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา พบว่าสามารถผลิตสาร acetoin จากน้ำตาลกลูโคส ในกระบวนการ butylene glycol fermentation คือให้ผล VP test เป็นบวก และมีค่าพีเอชใน VP broth เท่ากับ 5.5 หลังจากการเจริญ 7 วัน สามารถรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ได้ใน 5 วัน แต่ไม่เกิดดีไนตริฟิเคชัน จึงไม่เกิด N_2 ผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ย่อยสลายเคซีน เจลาติน และแป้ง ไม่สร้างเอนไซม์เลซิธิเนส จากการทดสอบการผลิตกรดจากน้ำตาล ดี-กลูโคส แอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส และดี-แมนนิทอล พบความแตกต่างของ *Bacillus* sp. นี้กับ *Bacillus* sp. อื่นๆอย่างชัดเจน คือสามารถผลิตกรดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง อาหารทดสอบจะเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองและไม่มีสี ไม่สามารถใช้ซิเตรตและโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเจริญที่พีเอช 5.7 และ 6.8 แต่ไม่สามารถเจริญใน NaCl ที่มีความเข้มข้น 5, 7 และ 10% เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและสรีรวิทยาแบคทีเรีย สายพันธุ์ N10 กับ *B. polymyxa* จากข้อมูลของ Claus and Berkeley (1986) และ Gordon (1989) พบว่าเหมือนกันเกือบ

ทุกประการ ยกเว้นแบคทีเรียสายพันธุ์ N10 ไม่สามารถเกิดดีไนตริฟิเคชัน ดังตารางที่ 2 ต่อมา Tindall (2000) กล่าวอ้างจาก Ash *et al.* (1993) ว่า *B. polymyxa* ถูกจัดใหม่อยู่ในจีนัส *Paenibacillus* เป็น *Paenibacillus polymyxa* โดยอาศัยลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ตำแหน่ง 1,393-1,437 (Shida *et al.*, 1997) ดังนั้นจึงจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ N10 เป็น *P. polymyxa* นอกจากนี้ผลการศึกษาโดยวิธี BIOLOG ก็สอดคล้องกับการจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาว่าคือ *Paenibacillus polymyxa* และ pattern การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด แสดงดังภาพผนวกที่ 5 และ 6



ภาพที่ 1 ลักษณะและการเรียงตัวของแบคทีเรียสายพันธุ์ N10 เมื่อศึกษาด้วยการย้อมแกรม

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 และ *Paenibacillus polymyxa*

คุณสมบัติ	*Bacillus* sp.สายพันธุ์ N10	*Paenibacillus polymyxa* *
ขนาดของเซลล์		
กว้าง	≤ 1.0 μm	0.7-1.0 μm
ยาว	2.0-3.0 μm	2.0-3.0 μm
แกรนูลภายในเซลล์	+	-
สปอร์		
รูปร่าง	วงรี	วงรี
ตำแหน่ง	ปลายเซลล์หรือค่อนข้างปลายเซลล์	ปลายเซลล์
สปอร์ทำให้เซลล์โป่ง	+	+
การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	+	+
Aerobe/Facultative anaerobe	Facultative anaerobe	Facultative anaerobe
การทดสอบ VP	+	+
พีเอชในอาหาร VP เจริญ 7 วัน	5.5	< 6
การผลิตกรดจาก		
ดี-กลูโคส	+	+
แอล-อะราบิโนส	+	+
ดี-ไซโลส	+	+
ดี-แมนนิทอล	+	+
การย่อยสลาย		
แป้ง	+	+
เคซีน	+	+
เจลาติน	+	+
การใช้		
ซิเตรต	-	-
โพรพิโอเนต	-	-
การผลิตเอนไซม์เลซิธิเนส	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

คุณสมบัติ	*Bacillus* sp.สายพันธุ์ N10	*Paenibacillus polymyxa* *
รีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์	+	+
ดีไนตริฟิเคชัน	-	+
การเจริญใน		
พีเอช 5.7	+	+
พีเอช 6.8	+	+
NaCl ความเข้มข้น 5%	-	-
NaCl ความเข้มข้น 7%	-	-
NaCl ความเข้มข้น 10%	-	-

หมายเหตุ - คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้ผลลบ

\+ คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้บวก

* คือ ข้อมูลจาก Claus and Berkeley (1986) และ Gordon (1989)

2. การแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์จากสารเร่งพด.1 และการจำแนกชนิด

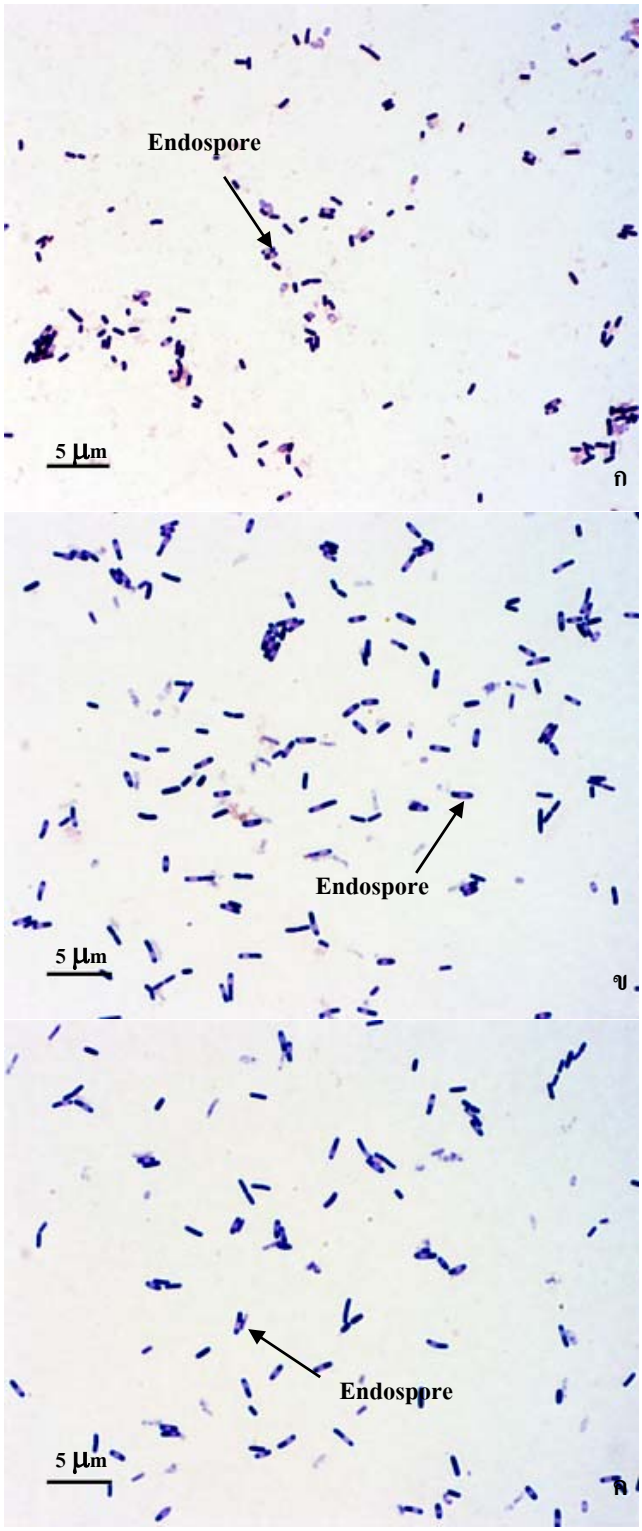
สารเร่งพด.1 ประกอบด้วยจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีส ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเศษซากพืชให้เป็นปุ๋ยหมักอย่างรวดเร็ว และสามารถทำลายเมล็ดวัชพืชหรือเชื้อโรคที่ปะปนอยู่ในกองปุ๋ยหมัก (กรมพัฒนาที่ดิน, 2546) งานวิจัยนี้ได้แยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากตัวอย่างสารเร่งพด.1 จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างสารเร่งพด.1 หนัก 1 กรัม ใส่ในน้ำให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เจือจางให้ได้ระดับเหมาะสม แล้วตรวจนับปริมาณและชนิดของเชื้อในตัวอย่างโดยวิธีเกลี่ยบนอาหาร NA พบว่ามีแบคทีเรียที่สร้างสปอร์อยู่ในช่วง 10^5-10^7 CFU/g และชนิดของแบคทีเรียดังกล่าว เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย ดังข้อมูลในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ที่แยกได้จากสารเร่งปุ๋ยหมัก พด.1 และการจำแนกชนิด

สายพันธุ์	ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์	กลุ่ม *Bacillus*	การจำแนกในระดับสปีชีส์
LDD 1	เซลล์ต่อกันเป็นสาย เป็นแพ เป็นเซลล์เดี่ยว สปอร์รูปวงรี อยู่กลางเซลล์	IB	คล้าย *B. subtilis*
LDD 2	เซลล์เรียงตัวเป็นแพ มีเมือก สปอร์รูปวงรีอยู่กลางเซลล์	IB	คล้าย *B. licheniformis*
LDD 3a	เซลล์ต่อกันเป็นสาย เป็นแพ สปอร์ทรงกระบอก อยู่ค่อนข้างปลายเซลล์	IB	คล้าย *B. subtilis*
LDD 3b	เซลล์เรียงตัวเป็นแพ และเซลล์เดี่ยว สปอร์ทรงกระบอก อยู่ค่อนข้างปลายเซลล์	IB	คล้าย *B. subtilis*
LDD 4	เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ขนาดใหญ่มาก สปอร์รูปวงรี	IA	*B. megaterium*
LDD 5	เซลล์ขนาดใหญ่ สปอร์รูปวงรี อยู่ค่อนข้างกลางเซลล์	IA	Unidentified *Bacillus*
LDD 7	เซลล์เล็กมาก เรียงตัวเป็นแพ สปอร์รูปวงรีอยู่ปลายเซลล์ ทำให้เซลล์โป่ง	II	*B. firmus*
LDD 8	เซลล์ขนาดใหญ่ ต่อกันเป็นสาย สปอร์รูปวงรีอยู่ค่อนข้างกลางเซลล์	IA	Unidentified *Bacillus*
LDD 9	เซลล์ขนาดเล็ก เรียงตัวเป็นแพ สปอร์รูปวงรีอยู่ปลายเซลล์ ทำให้เซลล์โป่ง	II	*B. firmus*

จำแนกชนิดแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากสารเร่งปุ๋ยหมัก พด.1. ในระดับสปีชีส์โดยศึกษาสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยา จากคุณสมบัติที่แบคทีเรียเหล่านี้เป็นรูปท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ ผลิตเอนไซม์คะตะเลส และเป็น facultative anaerobe หรือ aerobe จึงสามารถจำแนกอยู่ในจีนัส *Bacillus* ตามเกณฑ์ของ Claus and Berkely (1986) และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. II พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1, LDD3a และ LDD3b โคโลนีสีขาว กลม ทึบแสง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดเซลล์กว้าง 0.7-0.8 ไมโครเมตร และยาว 2.0-3.0 ไมโครเมตร กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว สปอร์รูปวงรีหรือเป็นทรงกระบอกอยู่กลางเซลล์ ไม่มี granule ภายในเซลล์ ดังภาพที่ 2 จึงจัดอยู่ในกลุ่ม IB โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยามีดังนี้ เป็น aerobe การทดสอบ VP ให้ผลบวก และมีค่าพี

เอชในอาหาร VP อยู่ในช่วง 5.39-5.52 สามารถรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ และสามารถผลิตเอนไซม์ อะไมเลสย่อยแป้ง ซึ่งคล้าย *B. subtilis* ที่สรุปว่าคล้าย *B. subtilis* เนื่องจากมีบางคุณสมบัติที่แตกต่างจาก *B. subtilis* คือสายพันธุ์ LDD1 ไม่ผลิตกรดจากน้ำตาลแอล-อะราบิโนสและดี-ไซโลส ส่วนสายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b ไม่ผลิตกรดจากน้ำตาลดี-ไซโลส ซึ่งทั่วไป *B.subtilis* ควรให้ผลบวกกับน้ำตาลเหล่านี้ ดังตารางที่ 4



ภาพที่ 2 ลักษณะและการเรียงตัวของแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1 (ก), LDD3a (ข) และ LDD3b (ค) เมื่อศึกษาด้วยการย้อมแกรม

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของสายพันธุ์ LDD1, LDD3a และ LDD3b เปรียบเทียบกับ *B. subtilis*

คุณสมบัติ	LDD1	LDD3a	LDD3b	*B. subtilis* *
ขนาดของเซลล์				
กว้าง	0.7 μm	0.8 μm	0.8 μm	0.7-0.8 μm
ยาว	2.0-2.5 μm	2.5-3.0 μm	2.5-3.0 μm	2.0-3.0 μm
แกรนูลภายในเซลล์	-	-	-	-
สปอร์				
รูปร่าง	วงรี/	วงรี/	วงรี/	วงรี/
ตำแหน่ง	ทรงกระบอก กลางเซลล์	ทรงกระบอก กลางเซลล์	ทรงกระบอก กลางเซลล์	ทรงกระบอก กลางเซลล์/ ค่อนข้าง กลางเซลล์
สปอร์ทำให้เซลล์โป่ง	-	-	-	-
การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	+	+	+	+
Aerobe/Facultative anaerobe	Aerobe	Aerobe	Aerobe	Aerobe
การทดสอบ VP	+	+	+	+
พีเอชในอาหาร VP	5.49	5.39	5.52	5.4-8.0
การผลิตกรดจาก				
ดี-กลูโคส	+	+	+	+
แอล-อะราบิโนส	-	+	+	+
ดี-ไซโลส	-	-	-	+
ดี-แมนนิทอล	+	+	+	+
การย่อยสลาย				
แป้ง	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+
เจลาติน	+	+	+	+
การผลิตเอนไซม์เลซิธิเนส	-	-	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

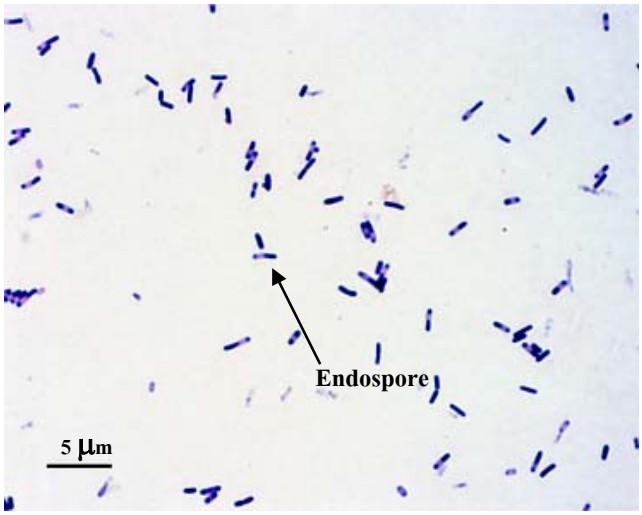
คุณสมบัติ	LDD1	LDD3a	LDD3b	*B. subtilis* *
การใช้				
ซิเตรต	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	-	-	-	-
การผลิตเอนไซม์เลซิธิเนส	-	-	-	-
รีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์	+	+	+	+
การเจริญใน				
พีเอช 5.7	+	+	+	+
พีเอช 6.8	+	+	+	+
NaCl ความเข้มข้น 5%	+	+	+	+
NaCl ความเข้มข้น 7%	+	+	+	+
NaCl ความเข้มข้น 10%	+	+	+	+

หมายเหตุ - คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้ผลลบ

\+ คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้บวก

* คือ ข้อมูลจาก Claus and Berkeley (1986) และ Gordon (1989)

สายพันธุ์ LDD2 มีโคโลนีลามเป็นเมือก ทึบแสง เซลล์เรียงตัวแบบ palisade ขนาดกว้าง 0.6-0.7 ไมโครเมตร ยาว 1.5-2.0 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปวงรี อยู่กลางเซลล์ ไม่มี granule ภายในเซลล์ ดังภาพที่ 3 จากสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 สามารถจัดอยู่ในกลุ่ม IB ที่มีลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยาคล้ายกับ *B. licheniformis* เกือบทุกประการ คือเป็น facultative anaerobe การทดสอบ VP ให้ผลบวก และมีค่าพีเอชในอาหาร VP น้อยกว่า 5.35 สามารถใช้ซิเตรตและโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ ดังตารางที่ 5 แต่อย่างไรก็ตาม *B. licheniformis* ควรให้ผลบวกจากการผลิตกรดจากน้ำตาลดี-ไซโลส แต่แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 ให้ผลลบ ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าคือ *B. licheniformis*



ภาพที่ 3 ลักษณะและการเรียงตัวของแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 เมื่อศึกษาด้วยการย้อมแกรม

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของสายพันธุ์ LDD2 เปรียบเทียบกับ *B. licheniformis*

คุณสมบัติ	LDD2	*B. licheniformis* *
ขนาดของเซลล์		
กว้าง	0.6-0.7 μm	0.6-0.8 μm
ยาว	1.5-2.0 μm	1.5-3.0 μm
แกรนูลภายในเซลล์	-	-
สปอร์		
รูปร่าง	ทรงกระบอก	วงรี/ทรงกระบอก
ตำแหน่ง	กลางเซลล์	กลางเซลล์
สปอร์ทำให้เซลล์โป่ง	-	-
การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	+	+
Aerobe/Facultative anaerobe	Facultative anaerobe	Facultative anaerobe
การทดสอบ VP	+	+
พีเอชในอาหาร VP	5.35	5.0-6.5

ตารางที่ 5 (ต่อ)

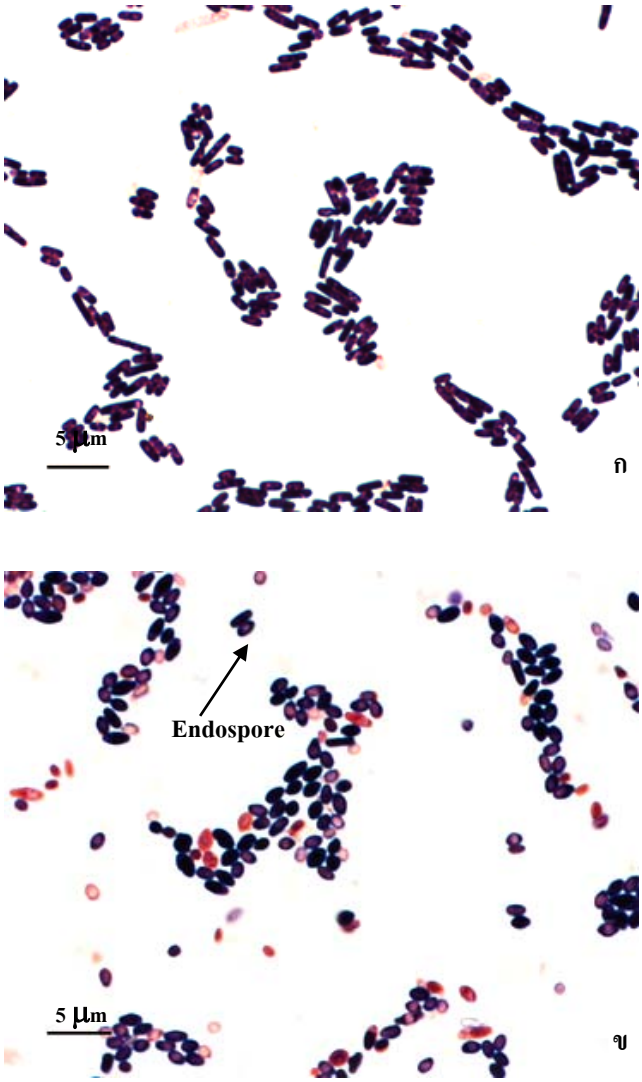
คุณสมบัติ	LDD2	*B. licheniformis* *
การผลิตกรดจาก		
ดี-กลูโคส	+	+
แอล-อะราบิโนส	+	+
ดี-ไซโลส	-	+
ดี-แมนนิทอล	+	+
การย่อยสลาย		
แป้ง	+	+
เคซีน	+	+
เจลาติน	+	+
การใช้		
ซิเตรต	+	+
โพรพิโอเนต	+	+
การผลิตเอนไซม์เลซิธิเนส	-	-
รีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์	+	+
การเจริญใน		
พีเอช 5.7	+	+
พีเอช 6.8	+	+
NaCl ความเข้มข้น 5%	+	+
NaCl ความเข้มข้น 7%	+	+
NaCl ความเข้มข้น 10%	+	+

หมายเหตุ - คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้ผลลบ

\+ คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้บวก

* คือ ข้อมูลจาก Claus and Berkeley (1986) และ Gordon (1989)

สายพันธุ์ LDD4 มีโคโลนีสีครีม นูน ทึบแสง เซลล์ขนาดใหญ่ มีความกว้าง 1.2-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว สปอร์เป็นรูปวงรี มี granule ภายในเซลล์ ดังภาพที่ 4 จึงจัดอยู่ในกลุ่ม IA คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาที่สำคัญคือเป็น aerobe การทดสอบ VP ให้ผลลบ ค่าพีเอชในอาหาร VP เท่ากับ 5.04 และสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ ซึ่งคุณสมบัติต่างๆเหล่านี้เหมือนกับ *B. megaterium* ทุกประการ ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 4 ลักษณะและการเรียงตัวของแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อศึกษาด้วยการย้อมแกรม

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของสายพันธุ์ LDD4 เปรียบเทียบกับ *B. megaterium*

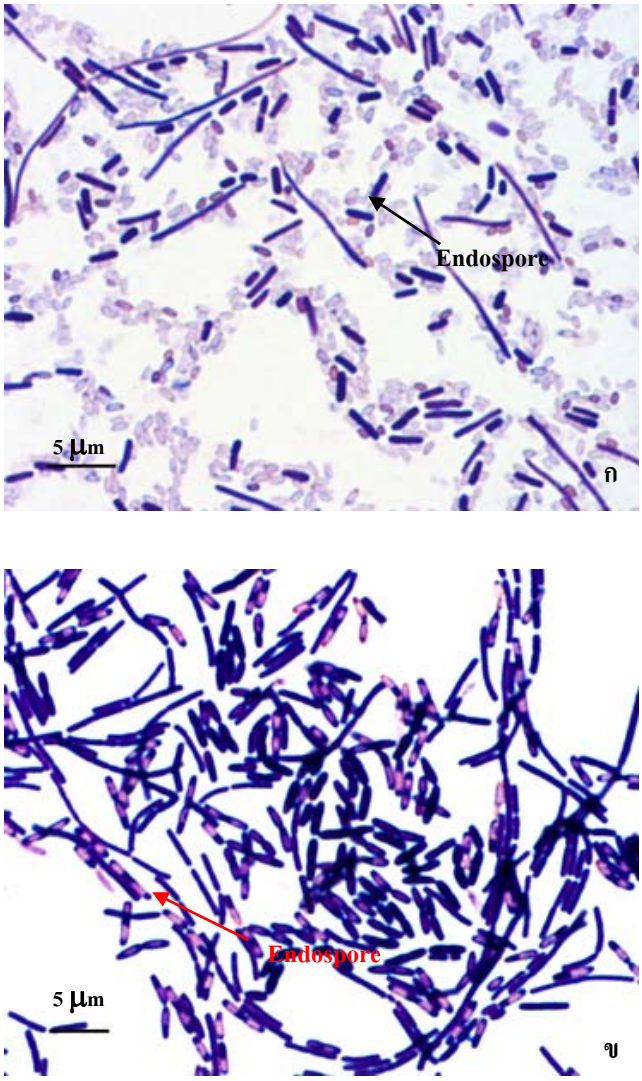
คุณสมบัติ	LDD4	*B. megaterium* *
ขนาดของเซลล์		
กว้าง	1.2-1.3 μm	1.2-1.5 μm
ยาว	2.0-3.0 μm	2.0-5.0 μm
แกรนูลภายในเซลล์	+	+
สปอร์		
รูปร่าง	วงรี	วงรี
ตำแหน่ง	กลาง/เกือบปลายเซลล์	กลางเซลล์
สปอร์ทำให้เซลล์โป่ง	-	v
การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	+	-
Aerobe/Facultative anaerobe	Aerobe	Aerobe
การทดสอบ VP	-	-
พีเอชในอาหาร VP	5.04	4.5-6.8
การผลิตกรดจาก		
ดี-กลูโคส	+	+
แอล-อะราบิโนส	+	d
ดี-ไซโลส	+	d
ดี-แมนนิทอล	+	+
การย่อยสลาย		
แป้ง	+	+
เคซีน	+	+
เจลาติน	+	+
การใช้		
ซิเตรต	+	+
โพรพิโอเนต	-	-
การผลิตเอนไซม์เลซิธิเนส	-	-
รีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์	+	d

ตารางที่ 6 (ต่อ)

คุณสมบัติ	LDD4	*B. megaterium* *
การเจริญใน		
พีเอช 5.7	+	+
พีเอช 6.8	+	+
NaCl ความเข้มข้น 5%	+	+
NaCl ความเข้มข้น 7%	+	+
NaCl ความเข้มข้น 10%	+	+

หมายเหตุ - คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้ผลลบ
+ คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้บวก
v คือ คุณสมบัติไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงได้
d คือ 89-100% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้บวก
* คือ ข้อมูลจาก Claus and Berkeley (1986) และ Gordon (1989)

สายพันธุ์ LDD5 และ LDD8 มีเซลล์ขนาดใหญ่ สปอร์รูปวงรีอยู่กลางเซลล์ ขนาดเซลล์กว้าง 1.0-1.5 ไมโครเมตร ยาว 3.0-5.0 ไมโครเมตร มี granule ภายในเซลล์ ดังภาพที่ 5 โคโลนีสีขาว ทึบแสง ขนาดของเซลล์ใกล้เคียงกับ *Bacillus* sp. ที่อยู่ในกลุ่ม IA คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาที่สำคัญคือการทดสอบ VP ให้ผลลบ ไม่ผลิตกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคส แอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส และดี-แมนนิทอล ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเคซีน เจลาติน และแป้ง สายพันธุ์ LDD5 ไม่เจริญในอาหาร NB ที่มีพีเอชเท่ากับ 5.7 แต่สายพันธุ์ LDD8 เจริญในอาหาร NB ที่มีพีเอชเท่ากับ 5.7 ดังตารางที่ 7 ซึ่งคุณสมบัติของ LDD5 และ LDD 8 ไม่ตรงกับ *Bacillus* ในสปีชีส์ใดเลย จึงไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD5 และ LDD8 ในระดับสปีชีส์โดยวิธีนี้



ภาพที่ 5 ลักษณะและการเรียงตัวของแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD5 (ก) และสายพันธุ์ LDD8 (ข) เมื่อศึกษาด้วยการย้อมแกรม

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของสายพันธุ์ LDD5 และ LDD8

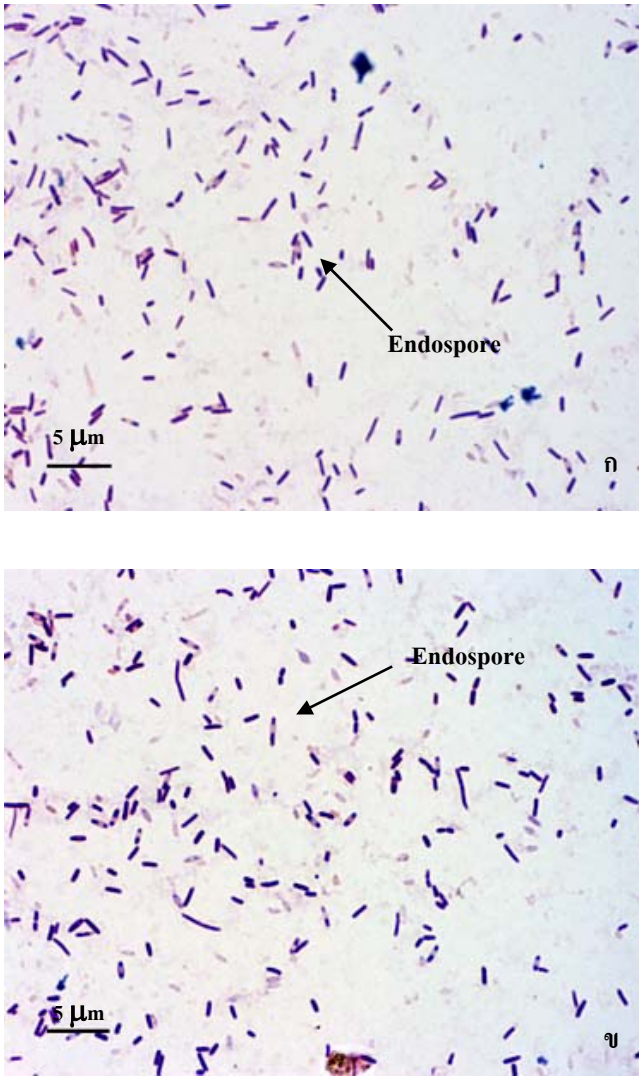
คุณสมบัติ	LDD5	LDD8
ขนาดของเซลล์		
กว้าง	1.0 -1.2 μm	1.0-1.5 μm
ยาว	2.0-2.5 μm	2.0-3.0 μm
แกรนูลภายในเซลล์	+	+
สปอร์		
รูปร่าง	วงรี	รี
ตำแหน่ง	กลางเซลล์	กลาง/ค่อนข้างปลายเซลล์
สปอร์ทำให้เซลล์โป่ง	-	-
การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	+	+
Aerobe/Facultative anaerobe	Aerobe	Aerobe
การทดสอบ VP	-	-
พีเอชในอาหาร VP	6.42	7.53
การผลิตกรดจาก		
ดี-กลูโคส	-	-
แอล-อะราบิโนส	-	-
ดี-ไซโลส	-	-
ดี-แมนนิทอล	-	-
การย่อยสลาย		
แป้ง	-	-
เคซีน	-	-
เจลาติน	-	-
การใช้		
ซิเตรต	-	-
โพรพิโอเนต	-	-
การผลิตเอนไซม์เลซิธิเนส	-	-
รีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์	+	+

ตารางที่ 7 (ต่อ)

คุณสมบัติ	LDD5	LDD8
การเจริญใน		
พีเอช 5.7	-	+
พีเอช 6.8	+	+
NaCl ความเข้มข้น 5%	+	+
NaCl ความเข้มข้น 7%	-	-
NaCl ความเข้มข้น 10%	-	-

หมายเหตุ - คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้ผลลบ
+ คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้บวก

สายพันธุ์ LDD7 และ LDD9 มีเซลล์ขนาดเล็ก กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 1.2-2.4 ไมโครเมตร เรียงตัวแบบ palisade สปอร์รีอยู่ปลายเซลล์ ดังภาพที่ 6 โคโลนีขนาดเล็ก นูน ใส คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาเหมือนกับ *B. firmus* คือไม่สามารถเจริญในอาหาร anaerobic agar การทดสอบ VP ให้ผลลบ ค่าพีเอชในอาหาร VP อยู่ในช่วง 6.0-6.8 หมักน้ำตาลดี-กลูโคส และดี-แมนนิทอล แต่ไม่หมักน้ำตาลแอล-อะราบิโนส และดี-ไซโลส ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเคซีน เจลาติน และแป้ง สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ และไม่สามารถเจริญในอาหาร NB ที่มีพีเอช 5.7 ดังตารางที่ 8 จึงจำแนกชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD7 และ LDD9 เป็น *B. firmus*



<u>ภาพที่ 6</u> ลักษณะและการเรียงตัวของแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD7 (ก และ ข) และ LDD9 (ค และ ง) เมื่อศึกษาด้วยการย้อมแกรม

ตารางที่ 8 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของสายพันธุ์ LDD7 และ LDD9เปรียบเทียบกับ *B. firmus*

คุณสมบัติ	LDD7	LDD9	*B. firmus* *
ขนาดของเซลล์			
กว้าง	0.5 μm	0.5 μm	0.6-0.9 μm
ยาว	1.2-2.4 μm	1.2-2.4 μm	1.2-2.4 μm
แกรนูลภายในเซลล์	-	-	-
สปอร์			
รูปร่าง	วงรี	วงรี	วงรี
ตำแหน่ง	ปลาย/ค่อนข้างปลายเซลล์	ปลาย/ค่อนข้างปลายเซลล์	ปลายเซลล์
สปอร์ทำให้เซลล์โป่ง	-	-	-
การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	-	-	-
Aerobe/Facultative anaerobe	Aerobe	Aerobe	Aerobe
การทดสอบ VP	-	-	-
พีเอชในอาหาร VP	5.90	6.13	6.0-6.8
การผลิตกรดจาก			
ดี-กลูโคส	+	+	+
แอล-อะราบิโนส	-	-	b
ดี-ไซโลส	-	-	b
ดี-แมนนิทอล	+	+	+
การย่อยสลาย			
แป้ง	+	+	+
เคซีน	+	+	+
เจลาติน	+	+	b
การใช้			
ซิเตรต	-	-	-
โพรพิโอเนต	-	-	-
การผลิตเอนไซม์เลซิธิเนส	-	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)

คุณสมบัติ	LDD7	LDD9	*B. firmus* *
รีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์	+	+	+
การเจริญใน			
พีเอช 5.7	-	-	-
พีเอช 6.8	+	+	+
NaCl ความเข้มข้น 5%	+	+	+
NaCl ความเข้มข้น 7%	+	+	+
NaCl ความเข้มข้น 10%	+	+	ND

หมายเหตุ - คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้ผลลบ

\+ คือ 90% หรือมากกว่าของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้บวก

b คือ 15-49% ของสายพันธุ์ทั้งหมดในสปีชีส์ให้บวก

ND คือ ไม่มีข้อมูล

* คือ ข้อมูลจาก Claus and Berkeley (1986) และ Gordon (1989)

การศึกษานี้แยกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากสารเร่งพด.1 ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ตามความแตกต่างของโคโลนี สามารถจำแนกระดับสปีชีส์คล้ายกับ *B. subtilis* ได้แก่ สายพันธุ์ LDD1, LDD3a และ LDD3b สายพันธุ์ LDD2 คล้ายกับ *B. licheniformis* สายพันธุ์ LDD4 จำแนกเป็น *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD5 และ LDD 8 จัดเป็น *Bacillus* กลุ่ม IA แต่ไม่สามารถจำแนกระดับสปีชีส์ เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่ตรงกับ *Bacillus* sp. กลุ่ม IA เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Claus and Berkeley (1986) และ Gordon (1989) และสายพันธุ์ LDD7 และ LDD9 จำแนกเป็น *B. firmus* สำหรับสายพันธุ์ที่ไม่ชัดเจน หรือจำแนกชนิดไม่ได้ ควรหาวิธีจำแนกชนิดด้วยวิธีอื่นต่อไป เช่น วิธีของ BIOLOG, API หรือศึกษาโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA

3. <u>การผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสารเร่ง พด.1</u>

3.1 การตรวจสอบการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์บนอาหารแข็ง

จากการจำแนก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหาร Starch agar และโปรตีเอสบนอาหาร Milk agar จึงนำมาตรวจสอบการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างผนังเซลล์ของพืช ได้แก่ ไซแลน และเซลลูโลส รวมทั้งไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. จากสารเร่งพด.1 ซึ่งคาดว่ามีความสามารถย่อยสลายซากพืชเพื่อใช้ทำปุ๋ยหมัก และยังยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่ปนเปื้อนอยู่ในกองปุ๋ยหมัก งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส ไซลาเนส และไคติเนส ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เปรียบเทียบกับ *Bacillus* sp. จากสารเร่งพด.1 ได้แก่แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1, LDD3a และ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis*, แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 ที่คล้าย *B. licheniformis*, *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4, unidentified *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LDD5 และ LDD8 และ *B. firmus* สายพันธุ์ LDD7 และ LDD9

ศึกษาการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ในอาหารแข็งโดยถ่ายเชื้อ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสารเร่งพด.1 ทั้ง 9 สายพันธุ์ ลงบนอาหาร Milk agar เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อาหาร Starch agar เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และอาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และไคติเนส ซึ่งมี carboxymethyl cellulose (CMC), oat spelt xylan และ colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ ปลูกเชื้อโดยวิธี point inoculation บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-7 วัน สังเกตวงใสรอบโคโลนีจากการย่อยสลายซับสเตรต เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์โดย *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์จากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Cz/Co) ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 9 และภาพที่ 7