สารยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ผลิตขึ้นนั้นน่าจะจำเพาะกับ *Xanthomonas* sp. เพราะ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ยับยั้งได้เฉพาะ *Xanthomonas* sp. แต่ ไม่ยับยั้ง *P. syringae* pv. *mori* 350-5, *R. solanacearum* 404-A-1-A, *B. cepacia* และ *E. carotovora* ในขณะที่ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S1/1-3 สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชเกือบทุกสปีชีส์ที่ใช้การที่ *Bacillus* sp. สายพันธุ์หนึ่งๆยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในจีนัสหรือสปีชีส์เดียวกันได้ผลแตกต่างกัน หรือในแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชสปีชีส์เดียวกันแต่ยับยั้งเพียงบาง pathovar เกิดจากความแปรผันทางพันธุกรรมของทั้งเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อก่อโรค (Monteiro *et al.*, 2005)

ในการศึกษานี้ไม่ได้วิเคราะห์ว่าการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดย *Bacillus* sp. เกิดจากกลไกใดหรือสารยับยั้งชนิดใด แต่เคยมีรายงานว่า *B. polymyxa* สายพันธุ์ Pfizer 2459 ผลิตสารปฏิชีวนะ polymyxin ซึ่งเป็นสารประเภทเปปไทด์ที่โครงสร้างเป็นวงแหวนที่มีกิ่ง มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Paulus and Gray, 1964) สารปฏิชีวนะประเภทโพลีเปปไทด์อีก 2 ชนิด ได้แก่ gavaserin ที่มีโครงสร้างเป็นวงจากกรดอะมิโน 8 ตัว และ saltavalin ที่โครงสร้างไม่ได้เป็นวง ซึ่งผลิตจาก *B. polymyxa* สายพันธุ์ BP1 สารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้ง *X. campestris* pv. *campestris* (Pichard *et al.*, 1995)

4.1 การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เชื้อราที่ใช้เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสารเร่ง พด.1 ได้แก่ *Fusarium oxysporum* เชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวหรือโรคตายพราย (Fusarium wilt) ในพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชไร่หลายชนิด เช่น กล้วย กาแฟ มะเขือเทศ ปาล์ม *Alternaria* sp. เชื้อสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้ (leaf spot, leaf blight และ early blight)ในพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และผลไม้บางชนิด เช่น แตงกวา ถั่ว ผักกาด คะน้า กะหล่ำต่างๆ มันฝรั่ง บานชื่น เบญจมาศ แคนตาลูป องุ่น ส้ม มะนาว *Aspergillus niger* เชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าขาด (Aspergillus crown rot) โรคฝักเน่า (pod rot) และเมล็ดเน่า (seed rot) ในถั่วลิสง และโรคราดำในหอมหัวใหญ่ *Rhizopus oligosporus* เชื้อสาเหตุโรคเน่าในผัก ผลไม้ และไม้ดอกหลังการเก็บเกี่ยว เช่น มันเทศ สตรอเบอร์รี่ ท้อ แตง ถั่ว *Sclerotium* sp. เชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าขาว (Sclerotium stem rot) และโรคโคนไหม้ (stem blight) ในพืชผักและผลไม้ เช่น หอมหัวใหญ่ แครอท มะเขือเทศ มันฝรั่ง สับปะรด1 (นุชนารถ, 2534; ไพโรจน์, 2525)

ราสาเหตุโรคพืชเหล่านี้กระจายอยู่ทั่วไปในดินหรือซากพืช และสามารถคงอยู่เป็นเวลานับปี เนื่องจากราเหล่านี้มีสปอร์หรือเส้นใยที่คงทน จึงอยู่ในธรรมชาตินานเป็นปี เมื่อน้ำท่วมหรือมีลมพัดจึงทำให้เกิดการกระจายของเชื้อราไปทั่ว ประกอบกับเชื้อราเหล่านี้เจริญได้ดีและก่อโรคในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น (นุชนารถ, 2534; ไพโรจน์, 2525) จึงใช้ราเหล่านี้มาเพื่อศึกษาการยับยั้งโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสารเร่ง พด.1

จากการศึกษาการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสารเร่ง พด.1 โดยวิธีเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับเชื้อราบนอาหาร PDA พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10, แบคทีเรียสายพันธุ์ สายพันธุ์ LDD1, LDD3a และ สายพันธุ์ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 ที่คล้าย *B. licheniformis*, สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดที่นำมาศึกษาแบคทีเรีย สำหรับ *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 ยับยั้ง *F. oxysporum, Alternaria* sp., *R. oligosporus* และ *Sclerotium* sp. โดยการสัมผัสกับเส้นใยรา (contact inhibition) นั่นคือไม่เกิดบริเวณยับยั้ง แต่เมื่อเส้นใยราเจริญจนสัมผัสกับโคโลนีของแบคทีเรียแล้ว พบว่าเส้นใยราไม่สามารถเจริญ หรือเจริญช้ากว่าปกติ (Bacon and Hinton., 2002) unidentified *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LDD8 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่นำมาศึกษา เพราะเมื่อสิ้นสุดการทดลองสังเกตได้ว่าเส้นใยเชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร PDA ปกคลุมโคโลนีของแบคทีเรีย ส่วน unidentified *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LDD5, *B. firmus* สายพันธุ์ LDD7 และ LDD9 ไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ดังตารางที่11 และภาพที่ 13-17

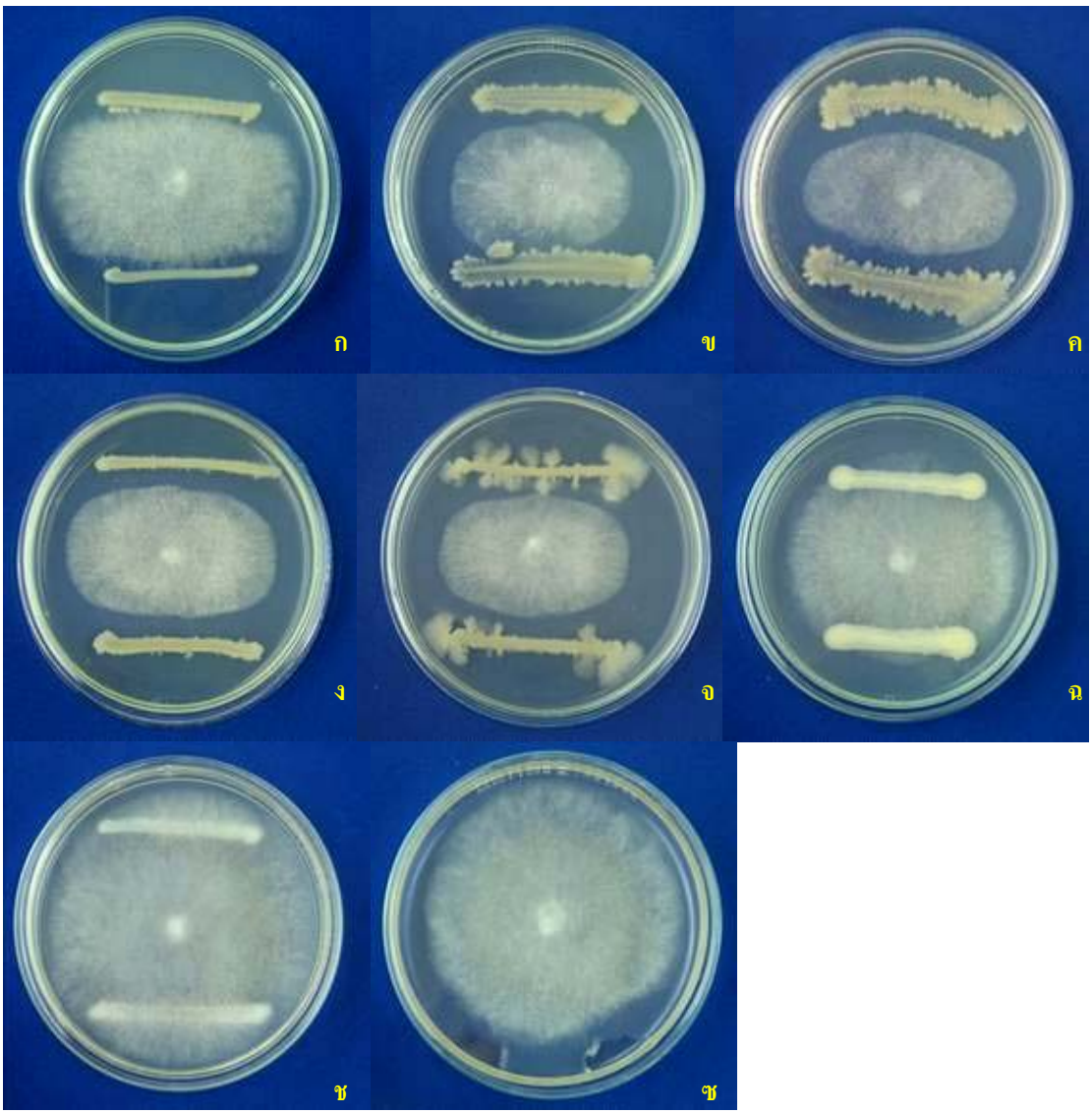
ตารางที่ 11 ขนาดของบริเวณยับยั้งจากสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. ที่แยกจากการเร่งพด.1

| สายพันธุ์ | ขนาดบริเวณยับยั้ง(มิลลิเมตร) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *R.. oligosporus* | *F. oxysporum* | *Alternaria* sp. | *A. niger* | *Sclerotium* sp. |
| N10 | 1.00 | 12.00 | 12.00 | 9.00 | 8.00 |
| LDD1 | 2.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 14.00 |
| LDD2 | 4.50 | 6.00 | 10.00 | 7.00 | 14.00 |
| LDD3a | 5.50 | 8.00 | 10.00 | 9.00 | 12.50 |
| LDD3b | 5.00 | 8.50 | 10.00 | 8.00 | 13.50 |
| LDD4 | C | C | C | - | C |
| LDD5 | NG | NG | NG | NG | NG |
| LDD7 | NG | NG | NG | NG | NG |
| LDD8 | - | - | - | - | - |
| LDD9 | NG | NG | NG | NG | NG |

หมายเหตุ - คือ ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

C คือ เส้นใยเชื้อราเจริญจนสัมผัสกับ colony ของแบคทีเรียแล้วเส้นใยราจะไม่มีการเจริญ

NG คือ แบคทีเรียไม่มีการเจริญบน PDA



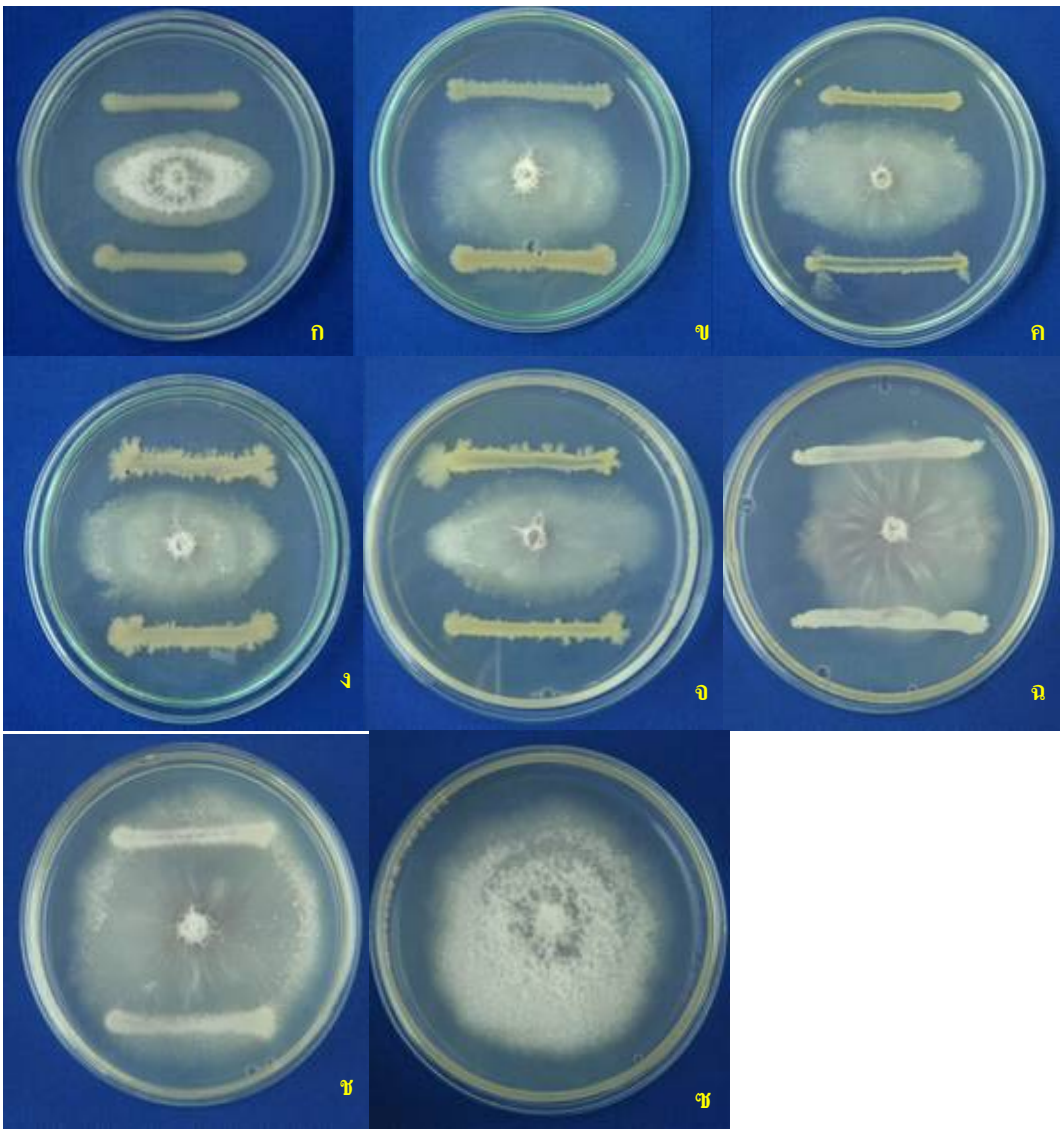

ภาพที่ 13 การยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* โดย *Bacillus* sp. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน

(ก) *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 (ข) LDD1

(ค) LDD2 (ง) LDD3a

(จ) LDD3b (ฉ) LDD4

(ช) LDD8 (ซ) control



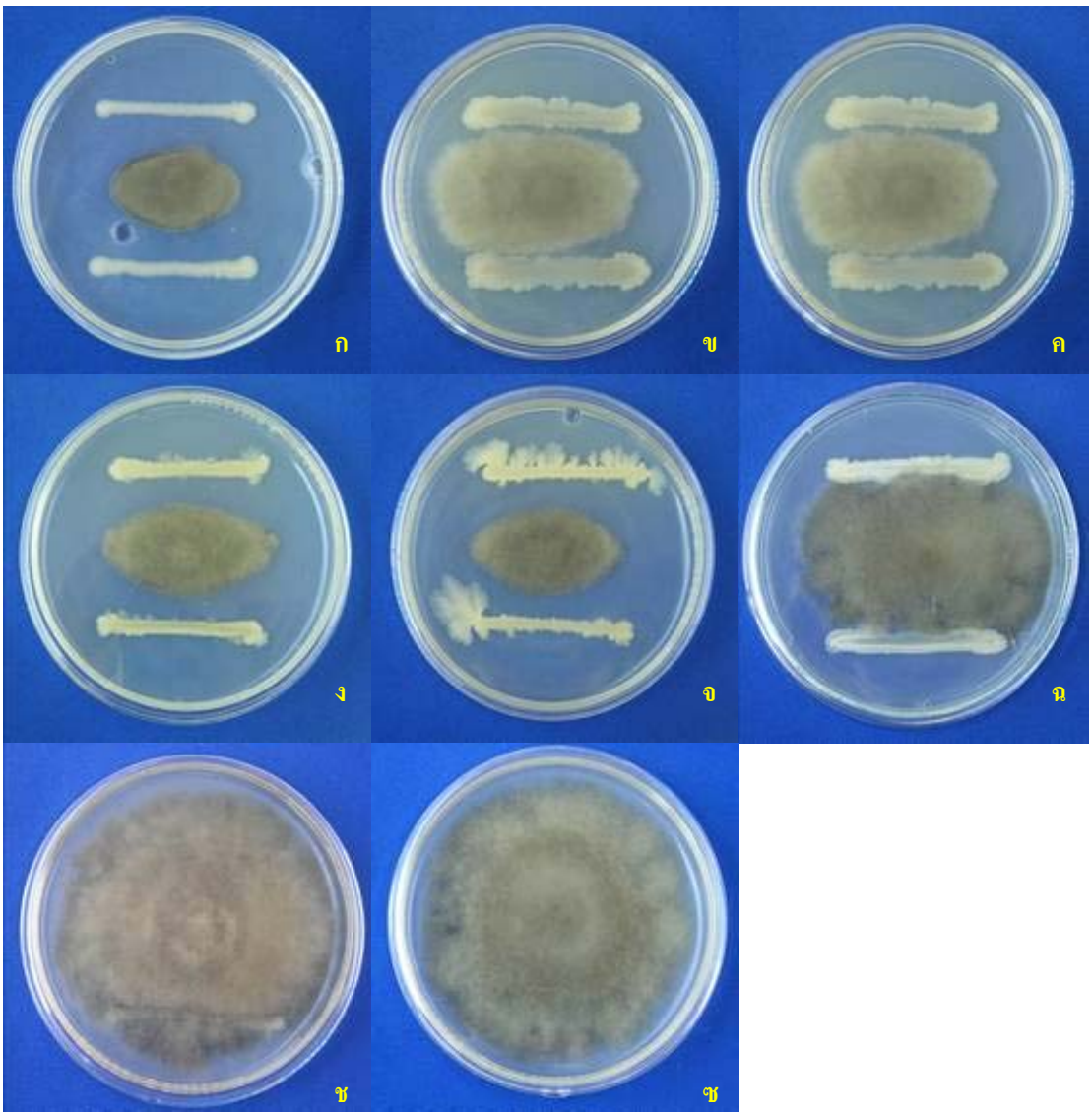

ภาพที่ 14 การยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดย *Bacillus* sp. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 วัน

(ก) *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 (ข) LDD1

(ค) LDD2 (ง) LDD3a

(จ) LDD3b (ฉ) LDD4

(ช) LDD8 (ซ) control



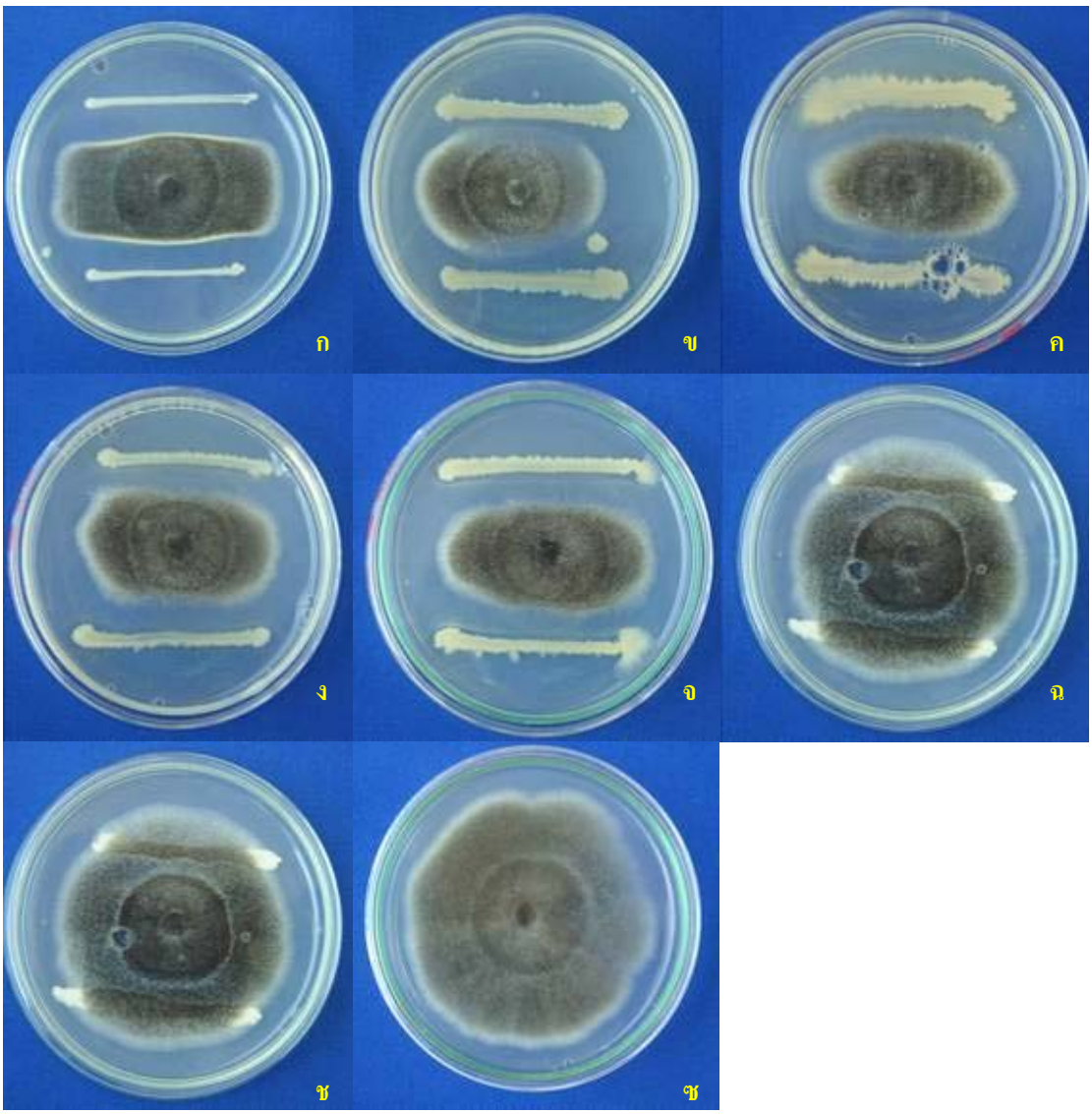

ภาพที่ 15 การยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp.โดย *Bacillus* sp. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 วัน

(ก) *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 (ข) LDD1

(ค) LDD2 (ง) LDD3a

(จ) LDD3b (ฉ) LDD4

(ช) LDD8 (ซ) control



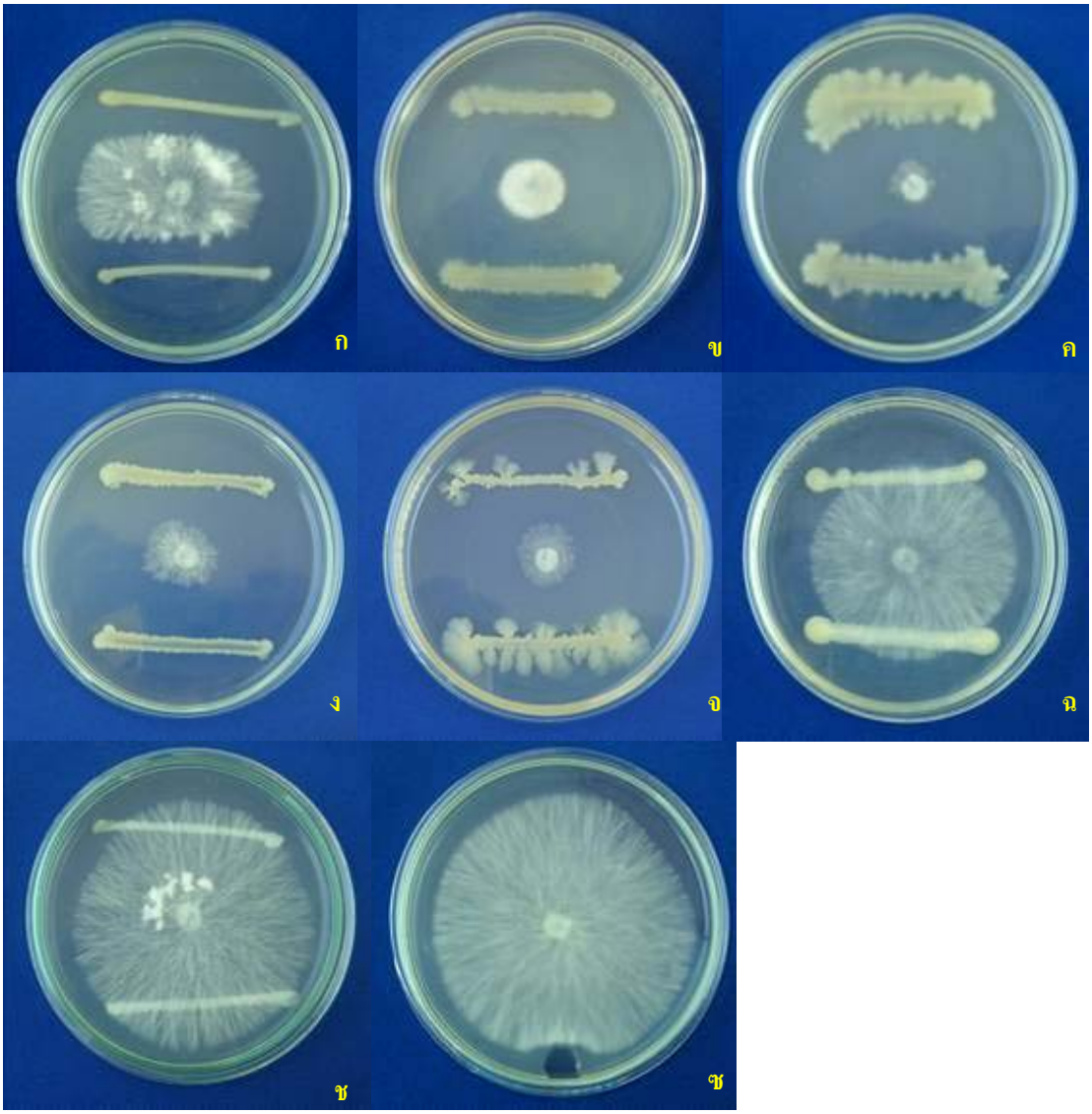

ภาพที่ 16 การยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* โดย *Bacillus* sp. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน

(ก) *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 (ข) LDD1

(ค) LDD2 (ง) LDD3a

(จ) LDD3b (ฉ) LDD4

(ช) LDD8 (ซ) control




ภาพที่ 17 การยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium* sp. โดย *Bacillus* sp. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน

(ก) *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 (ข) LDD1

(ค) LDD2 (ง) LDD3a

(จ) LDD3b (ฉ) LDD4

(ช) LDD8 (ซ) control

ความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดย *Bacillus* sp. แตกต่างกันตามชนิดของ *Bacillus* sp. และราสาเหตุโรคพืช พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ยับยั้งราใน class Deuteromycete คือ *F. oxysporum*, *Alternaria* sp. และ *A. niger* ดีกว่า *Bacillus* sp. จากพด.1 อย่างเห็นได้ชัด ส่วนการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชใน class Zygomycete คือ *R. oligosporus* และ class Basidiomycete คือ *Sclerotium* sp. โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ต่ำกว่า *Bacillus* sp. จากพด.1 แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* มีความสามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชใกล้เคียงกัน แต่แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1 ที่คล้าย *B. subtilis* ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชน้อยกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b ยกเว้นการยับยั้ง *Sclerotium* sp. ที่แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสามารถใกล้เคียงกัน แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 ที่คล้าย *B. licheniformis* สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* ส่วน *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยการสัมผัสเท่านั้น

จากผลการศึกษาพบว่าการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดย *Bacillus* sp. มีทั้งการยับยั้งแบบเกิดบริเวณยับยั้งและการยับยั้งแบบสัมผัส ขนาดของบริเวณยับยั้งขึ้นอยู่กับความสามารถแพร่ผ่านอาหารแข็งของสารยับยั้ง ถ้าสารยับยั้งแพร่ผ่านเนื้ออาหารแข็งได้ดี ขนาดของบริเวณยับยั้งจะกว้าง ความเสถียรของสารยับยั้งก็เป็นสิ่งสำคัญ ถ้าสามารถยับยั้งมีความเสถียร การยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชจะเป็นแบบไม่ผันกลับ แต่ทั้งนี้สารยับยั้งที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องสามารถหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ด้วย (Bacon and Hinton, 2002)

ความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดย *Bacillus* sp. ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารยับยั้ง รวมทั้งความทนต่อสารยับยั้งของราสาเหตุโรคพืช แม้ว่าในการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจสอบชนิดของสารยับยั้งเชื้อราที่ผลิตจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากสารเร่ง พด.1 แต่สังเกตว่าการยับยั้งเชื้อราชนิดเดียวกันแต่โดย *Bacillus* sp.ต่างชนิดกัน มีบริเวณยับยั้งแตกต่างกัน อาจเกิดจากสารยับยั้งสามารถแพร่ผ่านอาหารแข็งแตกต่างกัน และขนาดของบริเวณยับยั้งโดย *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สามารถทนต่อสารยับยั้งมากน้อยแตกต่างกัน *Bacillus* sp. สายพันธุ์หนึ่งๆอาจผลิตสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังที่ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ยับยั้งเชื้อรา class Deuteromycete ได้ผลดี แต่ยับยั้งเชื้อรา class Zygomycete น้อยมาก ขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1 ที่คล้าย *B. subtilis* ยับยั้งเชื้อรา class Deuteromycete และ Zygomycete น้อยมาก แต่สามารถยับยั้งเชื้อราclass Basidiomycete ดีมาก

ความเสถียรของสารยับยั้งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช ถ้าสารยับยั้งสลายตัวง่าย การยับยั้งเชื้อราจะเกิดแบบผันกลับ การยับยั้งจึงเกิดขึ้นชั่วคราว เมื่อเส้นใยราสัมผัสกับโคโลนีแบคทีเรีย การเจริญของเส้นใยราหยุดชะงักประมาณ 1-2 วัน จากนั้นเส้นใยราสามารถเจริญตามปกติจนปกคลุมโคโลนีของแบคทีเรีย การยับยั้ง *R. oligosporus* โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เกิดแบบผันกลับ เมื่อเส้นใยของเชื้อรา *R. oligosporus* เจริญเข้าใกล้โคโลนีของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 พบว่ามีบริเวณยับยั้งขนาด 1.00 มิลลิเมตร เส้นใยเชื้อราบริเวณขอบของเชื้อราที่อยู่ใกล้กับโคโลนี *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 มีลักษณะแบนติดกับผิวหน้าอาหาร PDA แต่หลังจากนั้น 1-2 วัน เส้นใยของเชื้อรา *R. oligosporus* จึงสามารถเจริญตามปกติ เส้นใยมีลักษณะฟู และเจริญปกคลุมโคโลนีของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10

การยับยั้งเชื้อราโดย *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 มีลักษณะแตกต่างจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่น เมื่อเส้นใยของเชื้อราเจริญจนสัมผัสกับโคโลนีของ *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 เส้นใยราสามารถเจริญปกคลุมโคโลนีของ *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 แต่เส้นใยมีลักษณะแตกต่างจากลักษณะของเส้นใยราที่เจริญตามปกติ เส้นใยที่ปกคลุมโคโลนีของ *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 มีลักษณะแบนติดผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเจริญช้ากว่าปกติ การยับยั้งแบบนี้เป็นการยับยั้งแบบสัมผัส แสดงว่า *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 ไม่สามารถหยุดการเจริญของเชื้อรา แต่ทำให้เชื้อราเจริญช้าลง

การยับยั้งเชื้อรา class Deuteromycete ได้แก่ *F. oxysporum, Alternaria* sp. และ *A. niger* โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สังเกตเห็นเส้นใย *Alternaria* sp. บริเวณขอบของบริเวณยับยั้งมีสีเข้มขึ้นกว่าเส้นใยปกติและอัดตัวกันแน่น เส้นใยของ *F. oxysporum* และ *A. niger* ที่อยู่ใกล้บริเวณยับยั้งมีลักษณะแบนติดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และเห็นเป็นขอบชัดเจน เช่นเดียวกับรายงานของ Paul *et al* (1988). ที่ศึกษาการยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* สาเหตุโรคราสีเทาในองุ่นโดยใช้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B-781 เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ กล่าวว่าเส้นใยราที่อยู่ใกล้บริเวณยับยั้งมีลักษณะเป็นสีดำและอัดตัวกันแน่น ลักษณะเส้นใยเกิดความผิดปกติ บางช่วงของเส้นใยคอดบางส่วนบวมเป็นทรงกลมหรือรี และโคนิเดียผิดปกติ ส่วน Demoz and Korsten (2006) ซึ่งรายงานว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ B246 ยับยั้งเชื้อรา *Dothiorella aromatica* และ *Phomopsis perseae* สาเหตุโรค stem-end rot โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ B246 ทำให้โคนิเดียของเชื้อรา 2 ชนิดนี้ไม่สามารถงอกเป็นเส้นใย และย่อยสลายเส้นใยราให้ขาดเป็นท่อนเมื่อลงเชื้อร่วมกันในดอกอะโวคาโด

การผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์เป็นกลไกประการหนึ่งที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อราเป็นสารประเภทโพลีเมอร์ ได้แก่ เซลลูโลส ไคติน เบตา-กลูแคน แมนแนน สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10, แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 ที่คล้าย *B. licheniformis*, แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a และสายพันธุ์ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส (ตารางที่ 8) สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่นำมาศึกษาได้ทุกชนิด แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1 ที่คล้าย *B. subtilis* ผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด คือโปรตีเอส อะไมเลส และเซลลูเลส สามารถยับยั้งเชื้อราทุกชนิดเช่นกัน แต่ความสามารถต่ำกว่าแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์แรก ยกเว้น *Sclerotium* sp. ที่แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1 ยับยั้งได้ดี *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 ผลิตเอนไซม์เพียง 2 ชนิด คือโปรตีเอสและอะไมเลส สามารถยับยั้งเชื้อราแบบสัมผัสเท่านั้น และ unidentified *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LDD8 ซึ่งไม่สามารถผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเช่นกัน

เช่นเดียวกับการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยใช้ *P. polymyxa* และ *B. pumilus* ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวบาร์เลย์ ดังที่ Nielsen and Sørensen (1997) รายงานว่า *P. polymyxa* และ *B. pumilus* ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แมนแนเนส ไซลาเนส และเคซีเนส ทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้ง *Rhizoctonis solani, Aphanomyces cochleoides* และ *Pythium ultimum* บนอาหาร PDA แต่ *Bacillus* sp. บางสายพันธุ์เท่านั้นที่ผลิตเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดแต่ไม่สามารถยับยั้ง *P. ultimum* ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่นๆที่ผลิตเอนไซม์เพียงบางชนิด ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา กลไกการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชน่าจะเกิดจากกิจกรรมร่วมกันของเอนไซม์เหล่านี้ ซึ่ง Budi *et al.* (2002) รายงานว่า *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ B2 ที่แยกจากดินบริเวณ mycorrhizosphere จากรากของ *Sorghum bicolor* ซึ่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โปรตีเอส ไคติเนส และเพคติเนส สามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora parasitica* และ *F. oxysporum* ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B6 และ B8 ที่ผลิตเอนไซม์ 3 ชนิดแต่ไม่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ เส้นใยราที่เลี้ยงร่วมกับ *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ B2 มีความผิดปกติของผนังเซลล์ คือผนังเซลล์บิดและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ผนังเซลล์เป็นรู องค์ประกอบของไซโตพลาซึมหนาแน่นขึ้น ไม่สะสมไกลโคเจน ส่วนของ cell lumen ถูกย่อยสลาย

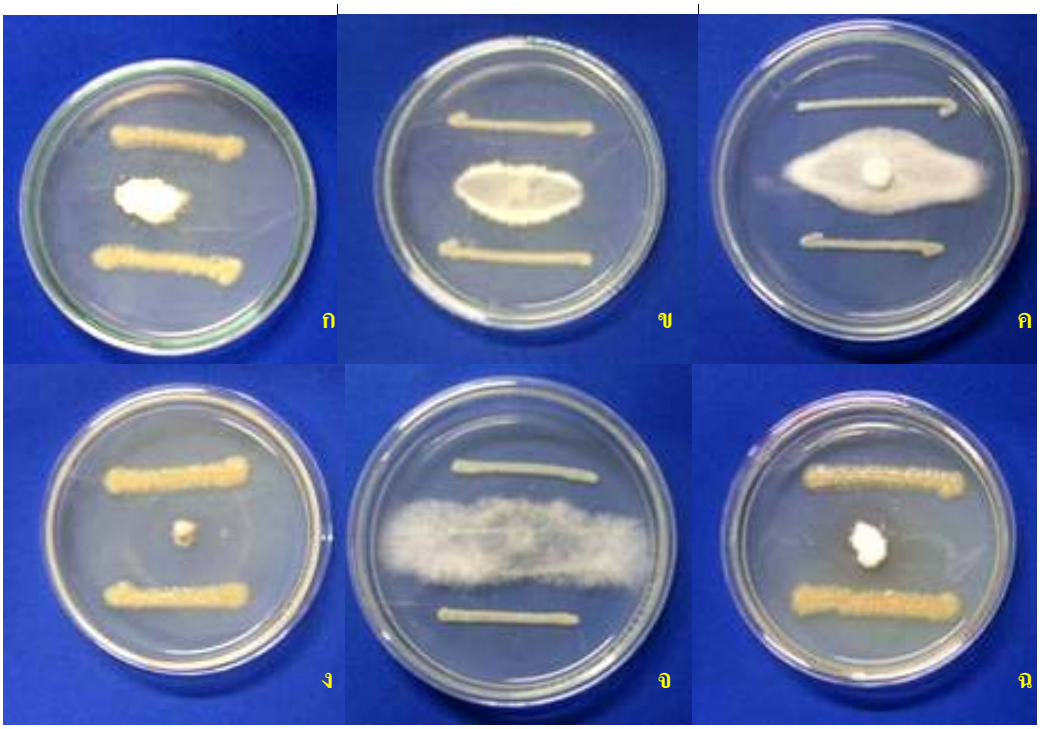
4.3 ผลของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ต่อเส้นใยเห็ด

จากการที่ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างของพืช ได้แก่ เอนไซม์เพคติเนส (Sittidilokratna *et al.*, 2007) อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส รวมทั้งโปรตีเอส จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะใช้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นเพื่อย่อยสลายวัสดุสำหรับเพาะเห็ด เช่น ฟาง เปลือกถั่ว เปลือกบัว ขุยมะพร้าว กากเมล็ดฝ้าย ไส้นุ่น หญ้าขจรจบ ขี้เลื่อย ทลายปาล์ม (บรรณ, 2547) มีรายงานว่า *Bacillus* sp. สามารถยับยั้งเชื้อรา *Chaetomium olivaceum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคในเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) โดยยับยั้งทั้งบนอาหารแข็ง และในวัสดุเพาะเห็ด โดยการผลิตสารปฏิชีวนะ Chatomacin และส่งเสริมการเจริญของเส้นใยเห็ด (Tautorus and Townsley, 1983; Tautorus and Townsley, 1984) จึงศึกษาผลของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดชนิดต่างๆ

เห็ดที่ใช้ศึกษาเป็นเห็ดที่เพาะขายกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ เห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.) เห็ดหูหนู (*Auricularia auricular* (Hook.) Underw.) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea* (Bull. Ex Fr.) Sing.) และเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus ablonus* Han) โดยเลี้ยงร่วมกับ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 บนอาหาร PDA ปรากฏว่าเชื้อ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดทุกชนิดที่นำมาศึกษา เปรียบเทียบกับการเจริญของเส้นใยเห็ดที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ขนาดของบริเวณยับยั้งดังตารางที่ 12 และภาพที่ 18

ตารางที่ 12 ขนาดของบริเวณยับยั้งเส้นใยเห็ดโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10

| ชนิดของเห็ด | ขนาดของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน) |
|---|---|---|
| เห็ดนางฟ้าภูฏานครีม | 13.17 | 9 |
| เห็ดนางฟ้าภูฏานดำ | 11.50 | 5 |
| เห็ดขอนขาว | 9.33 | 4 |
| เห็ดหูหนู | เส้นใยเห็ดไม่เจริญ | 13 |
| เห็ดฟาง | 10.50 | 3 |
| เห็ดเป๋าฮื้อ | 11.50 | 15 |




ภาพที่ 18 การยับยั้งเส้นใยเห็ดโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10

(ก) เห็ดนางฟ้าภูฏานครีม (ข) เห็ดนางฟ้าภูฏานดำ

(ค) เห็ดขอนขาว (ง) เห็ดหูหนู

(จ) เห็ดฟาง (ฉ) เห็ดเป๋าฮื้อ

การยับยั้งเส้นใยเห็ดโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 มากน้อยแตกต่างกันตามชนิดของเห็ด เห็ดนางฟ้าภูฏานครีมและเห็ดนางฟ้าภูฏานดำมีขนาดของบริเวณยับยั้ง 13.17 และ11.50 มิลลิเมตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 9 และ 5 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 18 (ก) และ (ข)) เส้นใยที่อยู่ใกล้บริเวณยับยั้งอัดตัวแน่นเห็นเป็นขอบชัดเจน เห็ดขอนขาวมีบริเวณยับยั้ง 9.33 มิลลิเมตร เมื่อบ่มนาน 4 วัน (ภาพที่ 19 (ค)) เส้นใยของเห็ดขอนขาวเจริญได้มากกว่าเห็ดนางฟ้าภูฏานครีม เห็ดนางฟ้าภูฏานดำ เห็ดหูหนู และเห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหูหนูที่เลี้ยงร่วมกับ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เป็นเวลา 13 วัน พบว่าเส้นใยไม่สามารถเจริญเพิ่มขึ้นจากที่ลงเชื้อเอาไว้ (ภาพที่ 18 (ง)) เส้นใยของเห็ดฟางมีลักษณะฟู และเจริญขนานกับโคโลนีของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 จนเส้นใยสัมผัสกับขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.50 มิลลิเมตร หลังจากบ่ม 3 วัน (ภาพที่ 19 (จ)) ส่วนเห็ดเป๋าฮื้อเจริญน้อยมาก เมื่อบ่มนาน 15 วัน วัดขนาดของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.50 มิลลิเมตร (ภาพที่ 19 (ฉ))

ข้อดีของการใช้ *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมสาเหตุโรคพืชที่เหนือกว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่น คือ *Bacillus* sp. สร้างสปอร์ที่ทนความร้อนและความแห้ง ทำให้มีอายุการเก็บที่นานกว่าจุลินทรีย์อื่น จึงเหมาะสำหรับเตรียมในรูปผงเชื้อสำเร็จรูป และ *Bacillus* sp. มีกิจกรรมของสารทุติยภูมิที่กว้าง จึงสามารถควบคุมสาเหตุโรคพืชหลายชนิด สำหรับ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 น่าจะเหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ทำปุ๋ยหมักร่วมกับจุลินทรีย์อื่น เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์หลายชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน รวมทั้งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่เป็น soil borne pathogen คุณสมบัติเหล่านี้จึงเป็นข้อดีของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ที่ช่วยป้องกันการแพร่กระจายของจุลินทรีย์โรคพืชที่อยู่ในดินและกองปุ๋ยหมัก แต่อาจไม่เหมาะสำหรับประยุกต์ใช้ร่วมกับการเพาะเห็ด เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดทุกชนิดที่นำมาศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้ควรศึกษาในสภาพธรรมชาติด้วยว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 มีผลอย่างไรต่อกองปุ๋ยหมัก วัสดุเพาะเห็ด และการเจริญของเห็ด เนื่องจากในสภาพธรรมชาติเป็นเชื้อผสม ไม่ใช่เชื้อบริสุทธิ์

**5. <u>การผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส</u>**

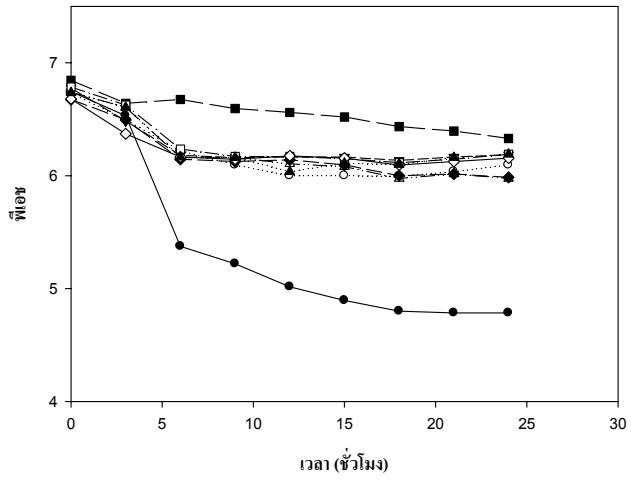
จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เพื่อจำแนก *Bacillus* ระดับสปีชีส์ (ตารางที่ 2) สังเกตว่าขณะทดสอบการผลิตกรดจากสารคาร์โบไฮเดรตนั้น *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตกรดได้เร็ว และเปลี่ยนสี bromcresol purple เป็นสีเหลือง และไม่มีสีภายใน 24 ชั่วโมง คุณสมบัตินี้ไม่พบใน *Bacillus* sp. อื่นๆ ซึ่งสามารถเปลี่ยนสี bromcresol purple เป็นสีเหลืองได้เร็วที่สุดภายใน 2-3 วัน และในสปีชีส์ที่ผลิตกรดได้ช้านั้นสามารถเปลี่ยนสี bromcresol purple เป็นสีเหลืองในเวลา 7-14 วัน ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตกรดได้สูงและเร็ว

การศึกษาการผลิตกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 นี้เลือก *Bacillus* sp. ในกลุ่มของ *B. subtilis* และญาติใกล้ชิด ได้แก่ *B. subtilis* JCM 1465$^{t}$, *B. mojavensis* NRRL-B-14698$^{t}$, *B. atropheaus* DSM 5151$^{t}$, *B. amyloliquefaciens* DSM 7$^{t}$ เนื่องจาก *Bacillus* เหล่านี้สามารถผลิตกรดจากสารคาร์โบไฮเดรตได้เร็ว คือสามารถเปลี่ยนสี bromcresol purple เป็นสีเหลืองได้ภายใน 2-3 วัน และยังเป็นแบคทีเรียที่มีผู้นำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังเลือกและ *Bacillus* sp. จากพด.1 ที่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้เร็วคือสามารถเปลี่ยนสี bromcresol purple เป็นสีเหลืองได้ภายใน 2-3 วันได้เช่นกัน ได้แก่แบคทีเรียสาย

พันธุ์ LDD2 ที่คล้าย *B. licheniformis* , แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* และ *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4

อาหารที่ใช้ทดสอบการผลิตกรดมาจากสูตร basal medium ที่ใช้ทดสอบการผลิตกรดจากสารคาร์โบไฮเดรต (Gordon, 1973 อ้างจาก Ayer *et al.*, 1919) และการศึกษานี้ใช้น้ำตาลดี-กลูโคส 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อวัดค่าพีเอช

พบว่าใน 3 ชั่วโมงแรก ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus* sp. ทั้ง 9 สายพันธุ์ลดลงเล็กน้อย จากค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.7-6.8 เหลือประมาณ 6.4-6.6 หลังจากนั้น *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 มีค่าพีเอชลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัดเจน คือมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.38 ในชั่วโมงที่ 6 และลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 24 มีค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.79 ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่นที่ใช้เปรียบเทียบ มีค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 5.6-6.3 ดังภาพที่ 19




ภาพที่ 19 พีเอชในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจากการหมักน้ำตาลกลูโคสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 (●),แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 ที่คล้าย *B. licheniformis* (○),แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a (▼) และ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* (△), *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 (■), *B. subtilis* JCM 1465$^{t}$ (□), *B. mojavensis* NRRL-B-14698$^{t}$ (◆), *B. atropheaus* DSM 5151$^{t}$ (◇) และ *B. amyloliquefaciens* DSM 7$^{t}$ (▲)

*Bacillus* sp. หมักน้ำตาลกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด Chung et al (1975) กล่าวว่า *B. cereus* ออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสผ่านทาง Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) และ Pentose Phosphate (PP) pathway ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไพรูวิก และกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ส่วนกรดแลคติก อะซิโตอิน และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์รอง และกล่าวอ้างจาก Demay and Wilseens (1970) ว่า *B. polymyxa* และ *B. macerans* ย่อยสลายกลูโคสโดย catabolic pathway เดียวกันแต่ได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันไป

*B. subtilis* ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีไนเตรตมีการเจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่มีการหายใจแบบใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสและไพรูเวตหรือกรดอะมิโนผสมได้ผลิตภัณฑ์เป็นแลคเตตและออกซาโลอะซีเตต แล้วเปลี่ยนเป็นมาเลต มาเลต และซัคซิเนต นอกจากนี้ไพรูเวตยังสามารถเปลี่ยนเป็นอะซิโตอิน และ2,3-บิวเทนไดออล สุดท้ายไพรูเวตจะเปลี่ยนเป็นอะซิเตตและเอทธานอล (Nakano *et al.*, 1997)

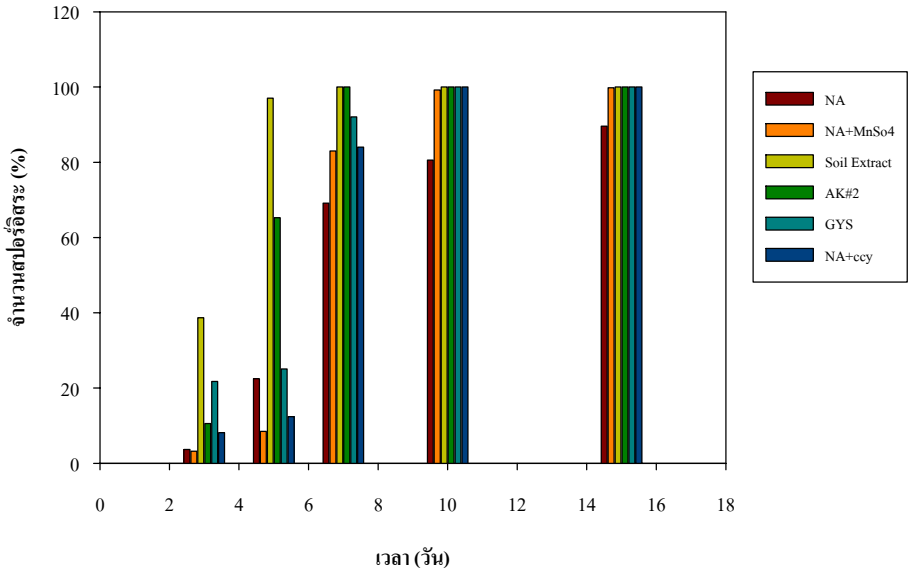
แบคทีเรียกรดแลคติกหมักวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ต้นข้าวโพด หญ้าขน ต้นพืชตระกูลถั่วเพื่อเป็นพืชอาหารสัตว์หมัก หรือไซเลส (silage) การหมักไซเลจต้องย่อยสารคาร์โบไฮเดรตในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นน้ำตาล เพื่อให้แบคทีเรียกรดแลคติกหมักน้ำตาลเป็นกรดแลคติก เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในช่วงต้นของการหมักไซเลจเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cellulolytic, hemicellulolytic และ amylolytic enzymes ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และเพคติเนส (ทองเลียน, 2541) การที่ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนสปริมาณสูง (Sittidilokratna *et al.*, 2007) รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส จึงน่าจะช่วยให้การหมักไซเลจเกิดเร็วขึ้น นอกจากนี้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส ทำให้ค่าพีเอชต่ำกว่า *Bacillus* sp. อื่นที่ใช้เปรียบเทียบอย่างเห็นได้ชัด และการที่ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ลดลงอย่างรวดเร็วน่าจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของไซเลจ ประกอบกับสามารถยับยั้งราหลายชนิด จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สำหรับหมักไซเลจให้มีคุณภาพดีขึ้น และควบคุมราที่เป็นสาเหตุให้ไซเลจเน่าเสีย

**6. <u>การสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10</u>**

6.1 การสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 บนอาหารแข็ง

*P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 นั้น เมื่อนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานาน พบว่าบางสภาวะ แบคทีเรียสร้างสปอร์น้อยลง การทดลองนี้จึงศึกษาสูตรอาหารและสภาวะเหมาะสมที่ทำให้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สร้างสปอร์ได้มากขึ้น โดยขั้นตอนแรกใช้อาหารแข็งสำหรับการสร้างสปอร์ 6 สูตร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสปอร์บนผิวหน้าของอาหารแข็งแต่ละชนิด อาหารแข็งทั้ง 6 สูตร ได้แก่ NA, NA ที่ผสม $MnSO_4$ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, Soil extract agar, AK agar # 2, GYS agar และ NA ที่ผสม ccy salt solution ถ่ายเชื้อ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ลงบนอาหารในหลอดอาหารเอียงสำหรับสร้างสปอร์ทั้ง 6 สูตร เก็บตัวอย่างเมื่อเชื้อมีอายุ 1, 3, 5, 7, 10 และ 15 วัน นำมา smear บนสไลด์ ย้อมสปอร์ด้วย Malachite green เปรียบเทียบจำนวนสปอร์กับจำนวนสปอร์อิสระและ vegetative cell ทั้งหมดใน 1 field เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ ในอาหารแต่ละชนิดทำสไลด์ 2 ซ้ำ และนับจำนวนซ้ำละ 15 filed หาค่าเฉลี่ย ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 20

ผลปรากฏว่าในวันที่ 1 ของการศึกษาไม่พบการสร้างสปอร์ในอาหารทั้ง 6 สูตร ในวันที่ 3 ของการศึกษาพบการสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ในอาหารแข็งทั้ง 6 สูตร โดยที่จำนวนสปอร์อิสระในอาหารสูตร Soil Extract Agar และ GYS Agar สูงกว่าสูตรอื่นอย่างเห็นได้ชัด จำนวนสปอร์อิสระในอาหารสูตร Soil Extract Agar และ AK Agar #2 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 และมีจำนวนสปอร์อิสระเท่ากับ 100% ในวันที่ 7 จำนวนสปอร์อิสระในอาหารสูตร GYS Agar และ NA ที่ผสม ccy salt solution เท่ากับ 100% ในวันที่ 10 แต่จำนวนสปอร์อิสระในอาหารสูตร GYS agar ในระยะ 7 แรก สูงกว่าในอาหารสูตร NA ที่ผสม ccy salt solution ดังนั้นจึงเลือกอาหารสูตร Soil Extract, AK Agar #2 และ GYS เพื่อศึกษาการสร้างสปอร์ในอาหารเหลว




ภาพที่ 20 การสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ในอาหารแข็งสูตรต่างๆ

อาหารแข็งสูตร Soil Extract Agar เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 มากที่สุด สามารถกระตุ้นให้แบคทีเรียสายพันธุ์ N10 สร้างสปอร์ได้เร็วกว่าอาหารสูตรอื่น เนื่องจากอาหารสูตร Soil Extract Agar มีน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับแบคทีเรีย yeast extract เป็นแหล่งวิตามิน และเหตุผลที่สำคัญคือประกอบด้วยน้ำสกัดจากดิน ซึ่งแร่ธาตุที่อยู่ในดินน่าจะมีส่วนทำให้อาหารสูตรนี้เหมาะสมสำหรับกระตุ้นการสร้างสปอร์ อาหารสูตร AK agar # 2 และ GYS agar มีน้ำตาลกลูโคส และ yeast extract เป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารสูตร Soil Extract Agar และนอกจากนี้ในอาหารสูตร AK Agar # 2 มี $MnSO_4$ เป็นองค์ประกอบ ส่วนอาหารสูตร GYS Agar มีทั้ง $MgSO_4$, $CaCl_2$ และ $MnSO_4$ จึงสร้างสปอร์ได้เร็วรองจากอาหารสูตร Soil Extract Agar เนื่องจากไอออนโลหะเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์และความเสถียรของสปอร์อิสระดังที่นักวิจัยหลายคณะรายงานไว้ (Beaman and Gerhardt, 1986; Bender and Marquis, 1985; Igura *et al.*, 2003; Maquis and Bender, 1958; Ooms and Brul, 2004)

สำหรับอาหารสูตร NA ที่ผสม ccy salt solution แม้ว่าไม่มีน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract เป็นองค์ประกอบ แต่มี salt solution ที่ประกอบด้วย $MgSO_4$, $MnSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$, $ZnSO_4$, $K_2SO_4$ และ $CaCl_2$ การสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ในอาหาร NA ที่ผสม ccy salt

solution ในระยะแรก 7 วันแรกน้อยกว่าในอาหารสูตร Soil Extract Agar, AK agar # 2 และ GYS agar แต่มีจำนวนสปอร์อิสระเท่ากับ 100% ในวันที่ 10 อาหารสูตร NA ที่ผสม $MnSO_4$ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract แต่มีไอออนโลหะจาก $MgSO_4$ เพียงอย่างเดียว การสร้างสปอร์จึงเกิดน้อยกว่าอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส yeast extract และไอออนโลหะหลายชนิด เช่น $Mg^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Fe^{2+}$ หรือ $Zn^{2+}$ ส่วนอาหารสูตร NA ซึ่งไม่มีทั้งน้ำตาลกลูโคส yeast extract และไอออนโลหะกระตุ้นให้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สร้างสปอร์น้อยที่สุด

ซึ่งเหตุผลที่การมีน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract มีการสร้างสปอร์มากกว่าและเร็วกว่า NA ที่ไม่ได้เติมสารอื่น อาจเป็นเพราะแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้เร็ว ประกอบกับการสร้างกรดจากกลูโคสทำให้พีเอชของอาหารต่ำลงอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียจึงต้องปรับตัวเพื่อความอยู่รอด ซึ่งโลหะที่ผสมในอาหารน่าจะมีส่วนเสริมให้แบคทีเรียสร้างสปอร์ได้เร็วขึ้น (Atrih and Foster, 2001; Beaman and Gerhardt, 1986; Bender and Marquis, 1985; Igura *et al.*, 2003; Marquis and Bender, 1985; Oomes and Brul, 2004)

6.2 การสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10ในอาหารเหลว

ศึกษาการสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10ในอาหารเหลวสูตร Soil extract, AK #2 และ GYS เนื่องจากอาหารแข็งทั้ง 3 สูตรดังกล่าวกระตุ้นให้เกิดสปอร์ได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่น ศึกษาโดยเลี้ยงแบคทีเรีย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ปริมาณเริ่มต้น $10^5$-$10^6$ CFU/ml ในอาหารเหลวทั้ง 3 สูตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน วันละ1 ฟลาสก์ จนครบ 7 วัน เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด นับจำนวนสปอร์ที่ทนความร้อนพร้อมกับนับจำนวนสปอร์อิสระภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยย้อมสปอร์ด้วย Malachite green วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยวิธี DNS ดังภาคผนวก ข ข้อ 4 และวัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 21