รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** :การลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวและสารพิษจากรา

2. **โครงการวิจัย** : การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์

   กิจกรรม :การใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

1. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** **:ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1**

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) **:Study on Optimal Conditions of *Bacillus subtilis*for Controlling *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B_1 Production**

2. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง **:นายชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ สังกัดกวป.**

   ผู้ร่วมงาน:นางสาวสุพี วนศิรากุลสังกัด กวป.

   นางสาวอัจฉราพร ศรีจุดานุสังกัด กวป.

3. **บทคัดย่อ** :

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* A39 ทำการศึกษาโดยเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในอาหารเหลว nutrient broth ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 5 6 7 และ 8 ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า *B. subtilis* C57 มีการเจริญสูงสุดที่อายุ 24 ชั่วโมง และลดลงเมื่อบ่มเป็นระยะเวลานานขึ้น พบการเจริญเฉลี่ยสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 35 30 และ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณ $1.2x10^9$, $9.5x10^8$, $5.3x10^8$ และ $2.8x10^8$ ตามลำดับ สภาวะความเป็นกรด-ด่างมีผลทำให้การเจริญของ *B. Subtilis* C57

แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 เมื่อนำแบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่า *B. Subtilis* C57 ที่อายุแตกต่างกัน มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. Flavus* A39 โดยแบคทีเรียที่อายุ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรียที่อายุ 48 และ 72 ชั่วโมง การยับยั้งเฉลี่ยสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 35 25 และ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณการยับยั้ง 48.1, 40.6, 29.4 และ 28.4% ตามลำดับ และ *B. Subtilis* C57 อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ได้ดีที่สุดเฉลี่ย 55.5% เท่ากัน รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 40 และ 25 องศาเซลเซียส มีการยับยั้งเฉลี่ย 50.86, และ 39.4% ตามลำดับ และแบคทีเรียที่เจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันมีผลต่อการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กันในแต่ละอุณหภูมิ
คำหลัก:*Bacillus subtilis, Aspergillus flavus*, แอฟลาทอกซิน บี 1, การยับยั้ง

Abstract

In this study, used the nutrient broth (NB) for *Bacillus subtilis* C57 culture at different pH (pH5, pH6, pH7 and pH8), time (24, 48 and 72 hours) and temperature (25, 30, 35 and 40°C).The highest *B. subtilis* C57 growth was found at 24 hours and 40, 35, 30 and 25°C, average growth $1.2x10^9$, $9.5x10^8$, $5.3x10^8$และ $2.8x10^8$, respectively. The different pH affects the growth of *B. subtilis* C57 that was grown well at pH5 and temperature at 30, 35 and 40°C while, at 25°C *B. subtilis* C57 was grown well at pH8. *B. subtilis* C57 cultured under different condition were tested for inhibit the growth of *Aspergillus flavus* A39 and aflatoxin B1 production. The growth of *B. subtilis* C57 at different time affected the inhibition of *A. flavus* A39 growth. *B. subtilis* C57 cultured at 24 hours was more effective cultured at 48 and 72 hours. The highest inhibition was found at 40, 35, 25 and 30°C with inhibition percentages of 48.1, 40.6, 29.4 and 28.4%, respectively. In addition, *B. subtilis* C57 cultured at 24 hours and temperature at 30 and 35°C could inhibit aflatoxin B1 production with 55.5% followed by 40 and 25°C with average inhibition of 50.86 and 39.4%, respectively. *B. subtilis* C57 cultured at different pH affects the inhibition of aflatoxin B1 production but, it has different inhibitory effects in each temperature.
Keywords: *Bacillus subtilis, Aspergillus flavus*, aflatoxin B_1, inhibition

4. คำนำ:

การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) เป็นปัญหาที่พบในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวหลายชนิด ทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของมนุษย์ การปนเปื้อนพบได้ทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ซึ่งเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงและคาดการณ์ได้ยาก การจัดการเพื่อลดความเสี่ยงในการบริโภคผลิตผลเกษตรที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง (อมราและคณะ ,2551) การควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อน การใช้แสงอุลตร้าไวโอเลต การใช้รังสี วิธีทางเคมี เช่น การใช้โซเดียม ไฮเปอร์คลอไรท์ (sodium hypochlorite) การใช้โอโซน การใช้โซเดียมไดซัลไฟด์ (sodium disulfide) แต่วิธีดังกล่าวก็ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งทำให้เกิดความสูญเสียทางโภชนาการกับผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ด้วย (Line and Brackett, 1995) การใช้วิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น การใช้แบคทีเรีย ยีสต์ หรือเชื้อรา เนื่องจากพบได้ในธรรมชาติ และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม กลไกที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยทางชีวภาพนั้นมีรูปแบบที่หลากหลายไม่สามารถกำหนดขอบเขตที่ชัดเจนได้ มีทั้งที่เป็นผลโดยตรงในการยับยั้ง และเป็นวิธีการเฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคพืช กลไกที่มักพบโดยทั่วไป คือ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยการสร้างสารปฏิชีวนะ เอนไซม์หรือสาร biocide ออกมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุ โดยจะไปจำกัดปัจจัยที่ใช้ในการดำรงชีวิตให้ใช้ได้น้อยลงหรือไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Paul and Clark, 1996)

แบคทีเรีย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (rod shaped) อาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย สร้างโคโลนีผิวด้าน (dull) หรือผิวย่นทั้งเซลล์ (wrinkled) เป็นสีครีมหรือน้ำตาลอ่อน (Gordon, 1989) เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง 5-55 องศาเซลเซียส ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงและสภาพเป็นด่างได้อย่างดี เจริญได้ตั้งแต่ pH 5.5 ไปถึง 8.8 (สุรางค์, 2555)

Palumbo *et al*. (2006) รายง านว่า มีแบคทีเรียหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างสารพิษได้ เช่น *Bacillus*, *Lactobacilli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* และ *Burkholderia* spp. เป็นต้น ในประเทศไทยมีการศึกษาแบคทีเรียดินโดยการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ จากแหล่งปลูกข้าวโพด และถั่วลิสงทั่วทุกภาค มาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินด้วย พบว่ามีแบคทีเรียดินหลายไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้ Nesci *et al*. (2005) พบว่า *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากดินปลูกข้าวโพดสามารถยับยั้งการสะสมของสารแอฟลาทอกซินได้ และจากการศึกษาของอวันวี (2550) พบว่า *B. subtilis* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. westerdijkiae* และสามารถกำจัดสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *B.subtilis* มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ

ของโรคพืชได้หลายชนิด และในขณะเดียวกันยังเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม

B. subtilis เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน ซึ่ง *B. subtilis* สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมหลากหลาย แต่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์หรือสารที่มีฤทธิ์ในการควบคุมสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อม การศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและสารพิษจะทำให้สามารถนำ *B. subtilis* มาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

5. วิธีดำเนินการ:

- อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57
2. เชื้อรา *Aspergillus flavus* A39
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ: Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB) Potato Dextrose Agar (PDA)
4. ชุดทดสอบสารแอฟลาทอกซินสำเร็จรูป DOA –Aflatoxin ELISA test kit
5. คิวเวตพลาสติก (cuvette)
6. เมทานอล
7. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 4
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
9. เครื่องอ่าน MicroELISA Reader
10. เครื่อง spectrophotometer

- วิธีการ

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. subtilis*C57 ในสภาวะแตกต่างกัน

1.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* C57

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*C57 ในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยแบคทีเรียให้ได้ปริมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับค่าการดูดกลืนแสง (optical density;OD) ให้ได้เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

1.2 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. Subtilis* ในสภาวะต่างกัน

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ความเป็นกรด-ด่าง 5 6 7 และ 8 เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40

องศาเซลเซียส วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีอายุ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยด้วยเครื่อง spectrophotometer บันทึกผลการทดลอง

ทำการศึกษาในแต่ละอุณหภูมิโดยวางแผนการทดลองแบบ 4x3 factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัย คือระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4 ระดับ ได้แก่ pH 5 pH 6 pH 7 และ pH 8 และปัจจัยของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 3 ระดับ ได้แก่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ รวม 12 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 pH5 อายุแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 7 pH7 อายุแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 2 pH5 อายุแบคทีเรีย 48 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 8 pH7 อายุแบคทีเรีย 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 3 pH5 อายุแบคทีเรีย 72 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 9 pH7 อายุแบคทีเรีย 72 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 4 pH6 อายุแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 10 pH8 อายุแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 5 pH6 อายุแบคทีเรีย 48 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 11 pH8 อายุแบคทีเรีย 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที 6 pH6 อายุแบคทีเรีย 72 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 12 pH8 อายุแบคทีเรีย 72 ชั่วโมง

2. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*A39

2.1 เตรียมสารละลายแบคทีเรีย (cell suspension)

นำเชื้อ *B. subtilis* C57 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตรา 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนตะกอนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วและปั่นเหวี่ยงอีก 2 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ($1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิตร)

2.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *A. flavus* A39

เลี้ยงเชื้อรา *A. flavus*A39 ในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำสปอร์ไปละลายในน้ำกลั่นผสม tween 20 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นับสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. Flavus* A39

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา โดยวิธี dual culture ในอาหาร PDA+NA หยดสารละลายสปอร์ *A. Flavus* A39 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ และหยดสารละลายแบคทีเรีย 5 ไมโครลิตร ที่มีอายุ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ด้าน ระยะห่างระหว่างหยดของสารละลายแบคทีเรียประมาณ 2.5 เซนติเมตร บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *A. Flavus* A39 ในจานทดสอบและจานควบคุม

วางแผนการทดลองแบบ 4x3 factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัย คือ การใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4 ระดับ ได้แก่ pH 5 pH 6 pH 7 และ pH 8 และอายุของแบคทีเรีย 3 ระดับ ได้แก่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ รวม 12 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH5 อายุ 24 ชม.	กรรมวิธีที่ 7 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH7 อายุ 24 ชม.

กรรมวิธีที่ 2 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH5 อายุ 48 ชม.
กรรมวิธีที่ 3 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH5 อายุ 72 ชม.
กรรมวิธีที่ 4 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH6 อายุ 24 ชม.
กรรมวิธีที่ 5 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH6 อายุ 48 ชม.
กรรมวิธีที 6 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH6 อายุ 72 ชม.
กรรมวิธีที่ 8 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH7 อายุ 48 ชม.
กรรมวิธีที่ 9 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH7 อายุ 72 ชม.
กรรมวิธีที่ 10 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH8 อายุ 24 ชม.
กรรมวิธีที่ 11 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH8 อายุ 48 ชม.
กรรมวิธีที่ 12 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่pH8 อายุ 72 ชม.

คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา = (C-T) / C x 100

C = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานควบคุม

T = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานทดสอบ

3. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. Flavus* A39

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งสารแอฟลาทอกซิน โดยบ่มเชื้อราจากข้อ 2.3 ต่อไปอีก 7 วัน รวมเป็นเวลา 14 วัน ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อรา *A. flavus* A39 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้น ใส่ลงหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร นำมาสกัดสารแอฟลาทอกซิน บี 1 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Teniola *et al.* (2005) เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร ลงไปหลอดที่มีชิ้นวุ้นของเชื้อรา เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ดูดส่วนน้ำใสในหลอดใหม่ ผ่าน syring filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ระเหยแห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน จากนั้นเติม 70% เมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป นำสารสกัดที่ได้ไปตรวจสอบสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ด้วยชุดทดสอบ DOA ELISA Test Kit คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* = (C-T) / C x 100

C = ปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี1 จากเชื้อราที่ได้จากชุดควบคุม

T = ปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี จากเชื้อราที่ได้จากการทดสอบ dual culture

- เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวพืชไร่ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

6. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. Subtilis* C57 ในสภาวะแตกต่างกัน

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่แยกได้จากดินและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส (C42C46C53 และ C57) มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารพิษสูง และได้เลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ C57 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. Flavus* A39 ได้ดี มาใช้ในการทดสอบ

การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรด-ด่าง 5 67 และ 8 ที่ระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. Subtilis* C57 มีผลต่อการเจริญหรือปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *B. Subtilis* C57 ที่อายุ 24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดในทุกๆ อุณหภูมิ ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเฉลี่ย 28.46×10^7, 53.15×10^7, 97.53×10^7 และ 127.86×10^7 ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Table 1) ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับอุณหภูมิ พบว่า ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *B. Subtilis* C57 เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้น (Figure1) แต่การเลี้ยงแบคทีเรียที่ระยะเวลานานขึ้นทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. Subtilis* C57 มีแนวโน้มลดลงในทุกอุณหภูมิ

นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับความเป็นกรด-ด่าง มีผลทำให้การเจริญของแบคทีเรีย *B. Subtilis* C57 แตกต่างกัน แต่ไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งในแต่ละอุณหภูมิให้ผลที่แตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ระดับ ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ทำให้ *B. Subtilis* C57 มีการเจริญสูงกว่าที่ความเป็นกรด-ด่างระดับอื่น ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบ *B. Subtilis* C57 เจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 (Table1)

2. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*A39

การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. Flavus* A39 ที่ระยะเวลา 7 วัน พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis*A39 ที่เจริญที่ระยะเวลาแตกต่างกัน มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*A39 แตกต่างกันด้วย โดยแบคทีเรียที่อายุ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด มีการยับยั้งเฉลี่ย 29.45, 28.43, 40.64 และ 48.12% ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่การใช้แบคทีเรียที่อายุ 48 และ 72 ชั่วโมง ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราไม่แตกต่างกัน (Table2)

แบคทีเรียที่เจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกันไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. Flavus* A39นอกจากนี้ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับอุณหภูมิ พบว่าแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูงมีแนวโน้มทำให้การยับยั้งการเจริญของ *A. Flavus* A39 สูงขึ้น (Table2 และ Figure 2)

จากการศึกษาของ Farzaneh *et al.* (2016) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ UTBSPI ในปริมาณที่แตกต่างกันมีประสิทธิภาพในการลดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วพิสตาชิโอที่แตกต่างกัน โดย

B. subtilis จะไปยับยั้งการงอกของสปอร์ ส่งผลให้เชื้อรามีการเจริญลดลงและทำให้มีการเข้าครอบครองพื้นที่ลดลง

3. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. Flavus* A39

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ของเชื้อรา *A. Flavus* A39 พบว่า แบคทีเรีย *B. Subtilis* C57 ที่เจริญที่ระยะเวลาแตกต่างกัน มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. Flavus* A39 แตกต่างกันด้วย โดยแบคทีเรียที่อายุ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้ดีที่สุด มีการยับยั้งเฉลี่ย 39.48, 55.58, 55.56 และ 50.86% ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และพบว่าระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันมีผลต่อการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. Flavus* A39 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กัน (Table3) ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับอุณหภูมิ พบว่าแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูงทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* A39 ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ สอดคล้องกับการทดลองของ Farzaneh *et al.* (2012) ซึ่งได้ศึกษาการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในอาหารเหลว NB ที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆ กัน พบว่า เชื้อ *B. Subtilis* UTBSP1 ที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการลดสารแอฟลาทอกซินได้ดีที่สุด และเมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นทำให้มีประสิทธิภาพลดลง

Table1 The growth of *B. subtilis* (cells/ml) in different conditions.

temperature (°C)	pH	growth of *B. subtilis* (x 10^7 cells/ml)			
		24 h	48 h	72 h	average[1/]
25	5	34.74	16.90	2.13	17.92 c
	6	18.46	30.74	9.35	19.52 c
	7	19.61	36.91	15.52	24.02 b
	8	41.03	39.51	23.57	34.70 a
Average[2/]		28.46 a	31.01 a	12.64 b	
30	5	55.42	48.07	46.24	49.91 a
	6	36.63	20.57	22.96	26.72 c
	7	56.68	26.40	24.46	35.85 b
	8	63.87	26.24	23.24	37.78 b
	average[2/]	53.15 a	30.32 b	29.22 b	
35	5	124.01	89.96	59.63	91.20 a
	6	101.18	57.85	43.46	67.50 c
	7	59.18	37.13	34.57	43.63 d
	8	105.74	67.91	55.24	76.30 b
	average[2/]	97.53 a	63.21 b	48.23 c	
40	5	141.35	104.74	94.68	113.59 a

	6	143.24	66.02	49.41	86.22 b
	7	109.24	63.96	63.96	79.05 c
	8	117.63	42.24	21.29	60.39 d
	average[2/]	127.86 c	69.24 b	57.34 a	

[1/] In a column of each temperature, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by DMRT

[2/] In a row of each temperature, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by DMRT

Table2 The percentage inhibition of fungal growth controlled by *B. subtilis* from different conditions.

temperature (°C)	pH	% inhibition of fungal growth			
		24 h	48 h	72 h	average[1/]
25	5	30.97	25.00	26.60	27.52
	6	27.60	25.10	25.57	26.09
	7	29.43	25.23	26.90	27.19
	8	29.80	25.90	24.70	26.80
Average[2/]		29.45 A	25.31 B	25.94 B	
30	5	31.14	23.50	25.47	26.70
	6	30.80	26.27	26.87	27.98
	7	25.70	25.60	24.17	25.16
	8	26.10	23.87	24.60	24.86
	Average[2/]	28.43 A	24.81 B	25.27 B	
35	5	38.62	31.2	29.81	33.21
	6	40.56	32.05	32.26	34.96
	7	42.18	31.41	34.62	36.07
	8	41.21	29.72	29.27	33.40
	average[2/]	40.64 a	31.09 b	31.49 b	
40	5	49.13	48.83	47.13	48.37 a
	6	48.83	47.43	46.47	47.58 a
	7	48.17	46.13	44.53	46.28 b
	8	46.37	44.47	42.80	44.54 c
	average[2/]	48.12 a	46.72 b	45.23 c	

[1/] In a column of each temperature, means followed by a common letter lowercase are not significantly different at the 1% level by DMRT

[2/] In a row of each temperature, means followed by a common letter lowercase and uppercase are not significantly different at the 1% and 5% level, respectively by DMRT

Table3 The percentage inhibition of aflatoxin production by *A. Flavus* controlled by *B. subtilis* from different conditions.

temperature (°C)	pH	% inhibition of aflatoxin production			
		24 h	48 h	72 h	average[1/]
25	5	36.85	34.76	37.64	36.42 AB
	6	36.51	32.87	30.65	33.35 B
	7	41.66	38.73	37.98	39.47 A
	8	42.91	40.48	36.09	39.83 A
average[2/]		39.48 A	36.71 AB	35.59 B	
30	5	46.64	43.16	43.33	44.37 AB
	6	46.95	37.01	28.20	37.39 B
	7	61.95	39.00	25.03	41.99 AB
	8	66.77	54.97	37.04	52.93 A
	average[2/]	55.58 A	43.54 B	33.40 B	
35	5	58.05	53.83	46.91	52.93
	6	52.12	48.03	49.49	49.88
	7	56.37	43.75	43.27	47.79
	8	55.71	45.89	48.08	49.89
	average	55.56	47.87	46.93	
40	5	62.99	44.85	40.81	49.55 a
	6	48.58	37.89	33.65	40.04 ab
	7	53.68	47.72	49.67	50.36 a
	8	38.19	33.98	34.64	35.60 b
	average[2/]	50.86 a	41.11 b	39.69 b	

[1/] In a column of each temperature, means followed by a common letter lowercase and uppercase are not significantly different at the 1% and 5% level, respectively by DMRT

[2/] In a row of each temperature, means followed by a common letter lowercase and uppercase are not significantly different at the 1% and 5% level, respectively by DMRT

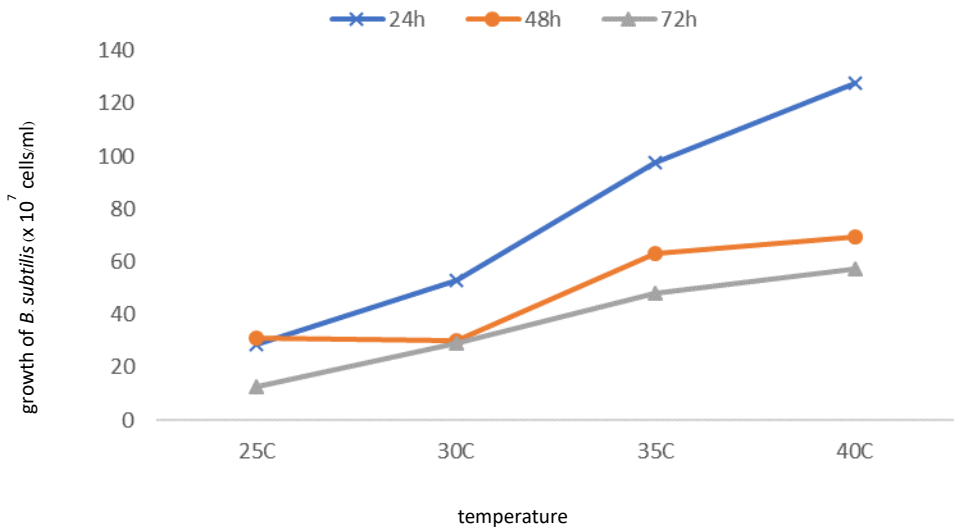

Figure 1 The relation of time and temperature for the growth of *B. subtilis.*

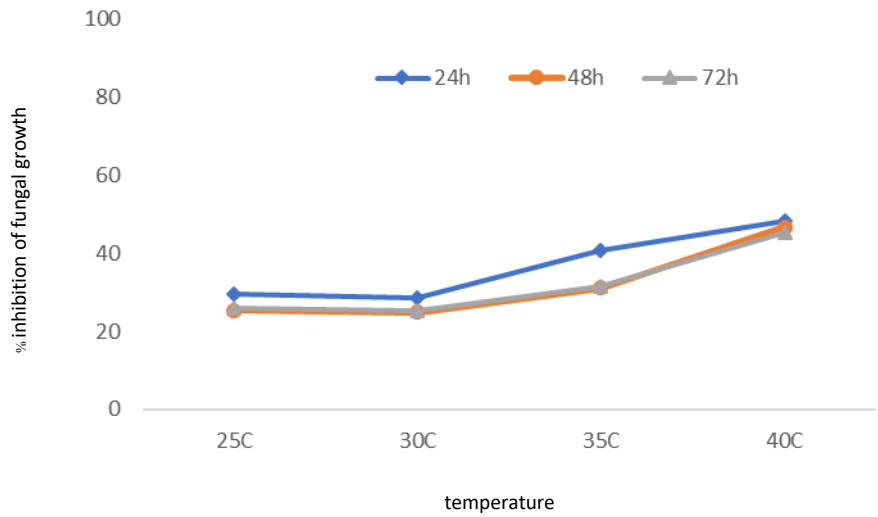

Figure 2 The relation of time and temperature for the percentage inhibition of fungal growth.

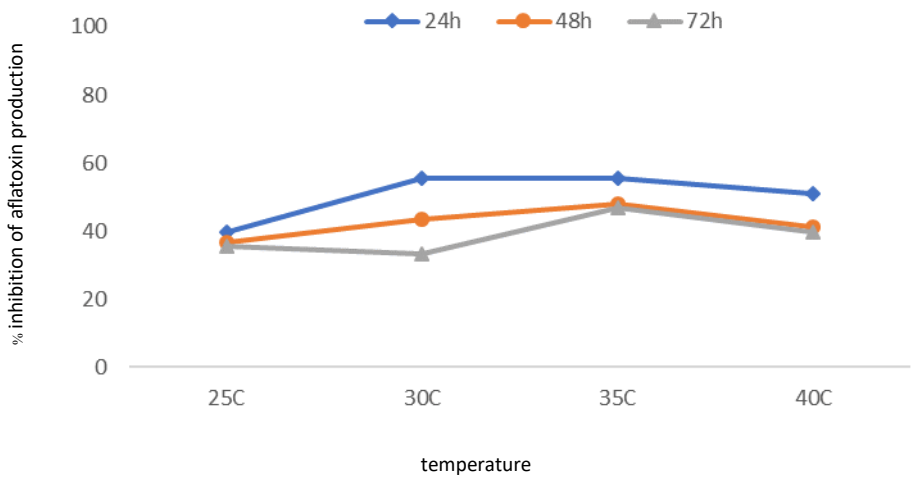

Figure 3 The relation of time and temperature for the percentage inhibition of aflatoxin B1 production.

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ:

แบคทีเรีย *B. subtilis* C57 มีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้มีประสิทธิภาพสูงในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus*A39 และพบว่า *B. subtilis* C57 สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง ระดับ 5 - 7

8. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- สภาวะการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและสารพิษและการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ของเชื้อรา *A. flavus*A39จะนำมาใช้ในการทดลอง “ การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา ” ซึ่งอยู่ในกิจกรรม โครงการวิจัย และแผนงานวิจัยเดียวกันนี้

9. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :-

10. เอกสารอ้างอิง :

สุรางค์ สุธิราวุธ. 2555. การตรวจสอบปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตรจากผลิตภัณฑ์นำเข้า. http://www.doa.go.th/biotech/pdf-ktk/i_book_1.pdf

อมรา ชินภูติ. 2551. สารพิษจากเชื้อราและการจัดการ. หน้า1-21. ใน: เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการตรวจวิเคราะห์สารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรอย่างรวดเร็วโดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป “DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit”. สำนักวิจัยพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

อวันวี เพชรคงแก้ว. 2550. การลดระดับการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราโดยเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 189 หน้า.

Alberts, J. F., W. C. A. Gelderblomb, A. Botha and W. H. Van Zyl. 2009. Degradation of aflatoxin B_1 by fungal laccase enzymes. **International Journal of Food Microbiology**: 35- 47.

Farzaneh, M., Z.Q. Shi, A. Ghassempour, N. Sedaghat, M. Ahmadzadeh, M. Mirabolfathy andM. Javan-Nikkhah. 2012. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. **Food control 23(1)**: 101-106.

Farzaneh, M., Z.Q. Shi, M. Admadzadeh, L.B. Hu and A. Ghassempour. 2016. Inhibition of the *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B_1 contamination on pistachio nut by fengycin and surfactin- producing Bacillus subtilis UTBSP1. Plant Pathol. J. 32(3): 209-215.

Gordon, R.E. 1989. The Genus *Bacillus*; In Practical Handbook of microbiology Edited by W.M. O’Leary 681pp. CRC Press Inc. pp 109-126.

Line, J. E., R. E. Brackett. 1995. Factors affecting aflatoxin B_1 removal by *Flavobacterium aurantiacum*. Journal of Food Protection 58(1): 91-94.

Nesci, A.V., R.V. Bluma and M.G. Etcheverry. 2005. *In vitro* selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus*section *Flavi* and aflatoxin production. **Eur J Plant Pathol.**113: 159-171.

Palumbo, J.D., J.L. Baker and N.E. Mahoney. 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. **Microb Ecol**. 52: 45-52.

Paul, E.A. and F.E. Clark. 1996. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego.

TeniolaO.D., P.A. Addo, I.M. Brost, P.Färber, K.-D.Jany, J.F. Alberts, W.H. van Zyl, P.S.Steyn and W.H. Holzapfel. 2005. Degradation of aflatoxin B_1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556