Tm
93-09-20

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่ต้านโรคสแคปในมันฝรั่ง

โดย

สุรีนา ชวนิชย์

กรกฎาคม 2534

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้โดยความกรุณาช่วยเหลือของ Professor Shinsaku Hayashida แห่ง Kyushu University ที่ให้ทั้งคำแนะนำ สถานที่ และเครื่องใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้รับความช่วยเหลือในการตรวจสอบบางขั้นตอนจาก น.ส.อำไพทิพย์ สุขหอม นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ด้วย

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ตามความมุ่งหมายทุกประการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่ต้านโรคสแคปในมันฝรั่ง
ชื่อผู้วิจัย	รองศาสตราจารย์ สุวีนา ชวนิชย์
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	เมษายน 2534

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้ง *Streptomyces scabies* ที่ทำให้เกิดโรคสแคปหรือหูดในมันฝรั่ง จำนวน 17 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณที่เพาะปลูกมันฝรั่ง โดยใช้วิธีขีดไขว้และวิธีซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สายพันธุ์ C-33 เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ดีที่สุด ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในชวดเยอร์ของสายพันธุ์ C-33 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 1% กลูโคส, 2% ซอยโทน, 1% ผงสกัดมอลท์, 0.028 กรัม/ลิตร $FeSO_4$, 1.6 กรัม/ลิตร K_2SO_4, 0.005 กรัม/ลิตร $MgCl_2$ และ 0.01 กรัม/ลิตร $MnSO_4$ ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 7.0-8.5 บ่มที่อุณหภูมิ 27°ซ เป็นเวลา 36 ช.ม. จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสาร จากการตรวจจำแนกทางอนุกรมวิธาน สายพันธุ์ C-33 มีลักษณะคล้ายคลึง *Bacillus licheniformis*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title	Biological active substance from microorganism antagonistic against common scab in potato
Name of Investigator	Assoc. Prof. Surina Chavanich
Year	1991

Abstract

From selection of 17 microorganisms which was isolated from soil in potato plantation. A strain, C-33 was selected by cross streak and paper disc diffusion methods as the best antagonistic activity producer, against *Streptomyces scabies*, a causative agent of common scab in potato. To optimize conditions for production of biological active substance of the strain in shake flasks, the medium should composed of 1% glucose, 2% soytone, 1% malt extract, 0.028% g/l $FeSO_4$ 1.6 g/l K_2SO_4, 0.005 g/l $MgCl_2$ and 0.01 g/l $MnSO_4$, with initial pH range 7.0-8.5 incubated at 27°C for 36 h. From identification, the strain C-33 was identical to *Bacillus licheniformis*.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการรูปภาพประกอบ	vi
รายการตารางประกอบ	vii
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	7
ผลของการวิจัย	12
สรุปผลการวิจัยและอภิปราย	24
ข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งของสายพันธุ์ C-33 ต่อสเคบี้ด้วยวิธี Cross streak	11
2	แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งของสายพันธุ์ C-33 ต่อสเคบี้ด้วยวิธี Paper disc diffusion	11
3	ผลของสารแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต BAS ที่ 36 ชม.	18
4	ปริมาณกลูโคสที่มีผลต่อการผลิต BAS	18
5	ผลของสารแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต BAS	19
6	ปริมาณของผงสกัดมอล์ทต่อการผลิต BAS	19
7	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต BAS	20
8	ผลของพีเอชในมีเดียมต่อการผลิต BAS	20
9	รูปร่างลักษณะของสายพันธุ์ C-33 จากกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)	23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	การแสดงฤทธิ์ของจุลินทรีย์ที่ยับยั้งการเจริญของสเคปีโดยวิธี cross streak	14
2	ขอบเขตการยับยั้งของจุลินทรีย์ต่อสเคปีด้วยวิธี paper disc diffusion	15
3	สารแหล่งไนโตรเจนและแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ	16
4	ผลของปริมาณแร่ธาตุ (trace metal) ต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ	17
5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ของสายพันธุ์ C-33	21
6	ลักษณะทางสรีรวิทยา (physiological characteristic) ของสายพันธุ์ C-33	22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

มันฝรั่งและความสำคัญ

มันฝรั่งเป็นพืชหลักเศรษฐกิจชนิดที่เป็นอาหารสำคัญของมนุษย์มานับเป็นเวลานาน เป็นพืชที่ให้คุณค่าทางอาหารสูง ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน แร่ธาตุ และไวตามินอื่น ๆ ในปี พ.ศ. 2528 ทั่วโลกผลิตมันฝรั่งได้ประมาณ 300 ล้านตัน ต่อเนื้อที่ปลูกทั้งหมด 140 ล้านไร่ จาก 130 ประเทศ ซึ่งมีพลเมืองกว่าร้อยละ 75 ของโลก และปริมาณเนื้อที่ปลูกมันฝรั่งก็เพิ่มขึ้นทุกปีด้วย (มาโนช ทองเจือม, 2531) ปัจจุบันประเทศไทยได้ผลผลิตของมันฝรั่งต่อไร่สูงกว่าข้าว ข้าวโพด มันเทศ และมันสำปะหลัง ปี พ.ศ. 2524-2530 พื้นที่ปลูกมันฝรั่งอยู่ระหว่าง 3,969-9,800 ไร่, ปี พ.ศ. 2524 ให้ผลผลิตของมันฝรั่ง 8,857 ตัน (มาโนช ทองเจือม, 2528) ในยุคที่ธุรกิจรีบเร่ง ความต้องการมันฝรั่งในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปและอุตสาหกรรมอาหารประเภทสำเร็จรูปเพิ่มมากขึ้น มีการตั้งโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่งและมีการนำเข้าของมันฝรั่งในรูปหัวมันทำพันธุ์ แป้ง และเกล็ดมัน มูลค่าประมาณไม่ต่ำกว่า 10 ล้านบาทต่อปี (กรมศุลกากร, 2532) นอกจากนั้นพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งก็เพิ่มขึ้นอีกด้วย และพื้นที่ทำการเพาะปลูกเกือบทั้งหมดอยู่ในภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งปลูกได้ 2 ครั้งต่อปี จากการรายงานของการประชุมวิชาการมันฝรั่งในช่วงระยะเวลาของปีที่ผ่านมา (ปราณี ฮัมเมลลิงค์, 2528; ธงชัย ทองอุทัยศรี, 2529) แสดงให้เห็นว่า มันฝรั่งเป็นพืชที่มีศักยภาพสูง การขยายพื้นที่ปลูกและการเพิ่มผลผลิตภายในประเทศมีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้สูงมาก ในปี พ.ศ.2529-2531 ประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกมันฝรั่งรวมถึง 95,000 ไร่ แต่ประเทศไทยยังคงนำเข้าแป้งมันฝรั่งกับหัวพันธุ์มันฝรั่งในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก ขณะนี้ประเทศไทยกำลังศึกษาการขยายพันธุ์มันฝรั่งเพื่อให้ได้ต้นกล้าที่ดีอย่างเพียงพอ และปรับปรุงหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อสามารถปลูกในแถบอุณหภูมิสูงได้เพื่อลดการสั่งซื้อหัวพันธุ์จากต่างประเทศ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2531)

โรคของมันฝรั่ง

มันฝรั่งเป็นพืชที่มีโรคทำความเสียหายได้หลายโรค ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตลดลง โรคที่ทำความเสียหายให้แก่มันฝรั่งเกิดจากเชื้อแอคติโนมัยซีส รา แบคทีเรีย และไวรัส โรคหูด หรือโรคสแคป (common scab) เป็นโรคหรือศัตรูที่สำคัญของการปลูกมันฝรั่งในประเทศไทย (สถาปัตย์, ปรีดา, 2517) สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อสเตรปโตมัยซีส สเคบี้ (*Streptomyces*

scabies Thaxter) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า สเคบี้ เป็นโรคที่เกิดขึ้นในพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกมันฝรั่งกันเป็นส่วนมาก ลักษณะของโรคคือผิวมันฝรั่งจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลอ่อนเป็นน้ำตาลเข้ม อาจจะขรุขระเป็นเนื้อนูนขึ้นมาหรืออาจเป็นหลุมลึก เนื้อมันใต้แผลเป็นสีฟางข้าว บางส่วนใสอาจเป็นรอยทางหรือเป็นรูเหมือนไม้ก๊อก มีกลิ่นเหม็นเขียว ทำให้คุณภาพของมันเสียไป ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งในด้านผลผลิตอันเนื่องมาจากคุณภาพของมันตกต่ำ (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2527; Hooker, 1983)

การควบคุมและป้องกันโรคสแคป

ในต่างประเทศได้มีผู้ศึกษาวิจัยที่จะป้องกันโรคสแคปมาช้านานด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน เช่น การใส่ผงกำมะถัน ปูนขาว หรือยาปฏิชีวนะลงไปในดินที่ทำการเพาะปลูกมัน หรือคลุกหัวมันกับจุลินทรีย์บางชนิดก่อนที่จะเอาหัวลงดินปลูก (Weinhold and Bowman, 1968; Davis et.al., 1976; Burr et.al., 1978; Hayashida et.al., 1989) แต่สเตรปโตมัยซีส สเคบี้ ที่ทำให้เกิดโรคนี้ เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน ยากที่จะควบคุมหรือกำจัดให้หมดสิ้น โดยมิให้ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การปลูกต้นมันฝรั่งซ้ำ ๆ กันบนพื้นที่เดิม การใส่ปุ๋ย และการเพิ่มปูนขาวลงในดิน สิ่งเหล่านี้ดูเหมือนจะเป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งจะทำให้เกิดการระบาดของโรคมากขึ้น (Alexander, 1961; Smith, 1977; Hooker, 1983) เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ exterase ในเชื้อสเคบี้ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดโรคสแคปในมันฝรั่ง และธาตุสังกะสีเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์มีรายงานการป้องกันสแคปด้วยการใส่จุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านสเตรปโตมัยซีส สเคบี้ ใส่ลงในดินที่ปลูกต้นมันฝรั่ง ซึ่งยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก (Hayashida, et.al., 1989) การสกัดแยกสารจากจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านสเตรปโตมัยซีส สเคบี้ เท่าที่ทราบยังไม่มีการรายงาน เป็นไปได้ว่าการค้นคว้าหาสารจากจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านโรคสแคปนี้มีปัญหาหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายสูง ระยะเวลาที่นาน และขั้นตอนที่ยุ่งยากในการแยกสารดังกล่าว จึงเป็นข้อจำกัดที่ทำให้นักวิจัยมุ่งไปทางวิธีอื่น ๆ

จุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อการควบคุมโรคพืช

การควบคุมทางชีวภาพต่อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชนั้น มีการศึกษากันมานาน แต่ยังได้รับความสนใจน้อย อาจเป็นเพราะกลไกของการควบคุมค่อนข้างจะสลับซับซ้อน และยังต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นอีกด้วย จากการเสียสมดุลย์ของสิ่งแวดล้อมเนื่องมาจากการกำจัดโรคพืชด้วยสารเคมีในรูปแบบต่าง ๆ จึงได้มีการฟื้นฟูการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง (antagonistic microorganism) *เมื่อประมาณ 15 ปีที่ผ่านมา การใช้สารเคมีในการกำจัดโรคพืช ไม่เพียงแต่ทำลาย* จุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืชเท่านั้น ยังทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์อื่น ๆ ด้วย เช่น ไมโครฟลอรา (microflora) หรือจุลินทรีย์ประเภทที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonistic microorganisms) ซึ่งเป็นผลทำให้พืชที่ปลูกในฤดูกาลถัดไปเสียความสามารถในการต้านโรคตามธรรมชาติ

มีการศึกษาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืชกับจุลินทรีย์ในดิน พบว่ามีจุลินทรีย์ถึง 256 ชนิด ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช ได้แก่ รา 106 ชนิด แอคติโนมัยซีส 90 ชนิด และแบคทีเรีย 60 ชนิด (Kosuge and Nester, 1989) และมีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างมันฝรั่งสายพันธุ์ที่ต้านโรคเหี่ยวจาก *Verticillium daliae* (A66107-51) กับสายพันธุ์ที่ไม่ต้านโรคเหี่ยว *V. daliae* (Russet Burbank) พบว่าที่บริเวณผิวรากและดินบริเวณรอบรากของมันฝรั่งสายพันธุ์ที่ต้านโรคเหี่ยวมีจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ต้านโรคเหี่ยว (Azad et.al., 1987) จุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่พบมาก ได้แก่ *Bacillus* spp. นอกนั้นเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Pseudomonas, Gluconobacter, Flavobacterium* และ *Streptomyces* แสดงว่าความสามารถในการต้านโรคตามธรรมชาติของพืช มีความสัมพันธ์กันระหว่างสายพันธุ์ของมันฝรั่งกับปริมาณที่เพียงพอของจุลินทรีย์มีฤทธิ์ยับยั้งที่อยู่ในดิน มีผู้สันนิษฐานว่าการให้ปุ๋ยพืชสดทำให้โรคสแคปของมันฝรั่งลดลงนั้น น่าจะเป็นผลทางอ้อม แท้จริงแล้วเป็นเพราะมีจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อ *S. scabies* ที่อยู่ในปุ๋ยนั่นเอง (Sanford, 1926) นอกจากนี้ยังมีผู้พบ *S. praecox* ในปุ๋ยสดเป็นสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. scabies* ด้วย (Millard and Taylor, 1927)

สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์

สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ชนิดที่เรียกว่า สารปฏิชีวนะ (antibiotics) นั้นเป็นสารประเภทเมตาโบไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในช่วงที่เซลล์หยุดการแบ่งตัว อาจได้มาจากกลุ่มจุลินทรีย์ชนิด แอคติโนมัยซีส (Actinomycetes) แบซิเลซี (Bacillaceae) และรา (Fungi) สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวแม้จะมีปริมาณ

น้อยหรือเจือจางมาก ก็สามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ การที่จุลินทรีย์สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น มีข้อสันนิษฐานต่าง ๆ กัน ซึ่งสรุปได้ว่า มีความสัมพันธ์กับกระบวนการเพื่อการอยู่รอดของมันในธรรมชาติ เช่น พบว่าการสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. จะสัมพันธ์กับการสร้างสปอร์ คือการสร้างสปอร์จะเริ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้สังเคราะห์สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพถึงจุดสูงสุด สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจะถูกสังเคราะห์ก็ต่อเมื่อสภาวะการเลี้ยงเชื้อ เอื้ออำนวยต่อการสร้างสปอร์เท่านั้น ถ้าทำให้จุลินทรีย์กลายพันธุ์หรือยับยั้งการสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ จุลินทรีย์จะไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ (Bernlohr and Novelli, 1963; Sarkar and Paulus, 1972; Egorov et.al., 1986) ความสำคัญของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสร้างสปอร์นั้น เนื่องจากจุลินทรีย์นำสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพไปสร้างเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของสปอร์

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. <u>องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

จุลินทรีย์มีความต้องการสารอาหารเหมือนสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เพื่อใช้ในการเจริญสร้างองค์ประกอบของเซลล์ ทำกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การทำงานของเอนไซม์ การขนส่ง ตลอดจนการหายใจ และการผลิตเมตาโบไลท์ ในสารอาหารจะประกอบด้วยแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถแบ่งแร่ธาตุออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความต้องการของจุลินทรีย์ (Gottschalk, 1986)

1.1 <u>กลุ่มแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณสูง</u>

แร่ธาตุในกลุ่มนี้ จุลินทรีย์มีความต้องการในความเข้มข้นที่สูงกว่า 10^{-4} โมลาร์ แร่ธาตุที่สำคัญและเป็นองค์ประกอบหลักของสารอินทรีย์ได้แก่ คาร์บอน ออกซิเจน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน

1.1.1 <u>แหล่งสารคาร์บอน</u>

สารคาร์บอน นอกจากจะเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์แล้ว ยังมีความสำคัญต่อการสร้างพลังงานและสร้างเมตาโบไลท์ชนิดต่าง ๆ จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งในรูปอนินทรีย์ เช่น CO, CO_2 และสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งมีมากมายหลายชนิด เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) แป้ง (starch) เด็กซ์ทริน (dextrin) กากน้ำตาล (molasses) และอื่น ๆ (Gottschalk, 1986) สารประกอบอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับ

ชนิดของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพและจุลินทรีย์ เช่น น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลินของรา *Penicillium chrysogenum* (วนิดา เรืองศรี, 2532) น้ำตาลแลคโตสมีโครงสร้างซับซ้อน จึงถูกนำไปใช้ได้อย่างช้า ๆ ทำให้ป้องกันการสะสมของน้ำตาลเฮกโซส (hexose) ซึ่งเป็นสาเหตุของการยับยั้งการสังเคราะห์เพนนิซิลินดังกล่าว น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการผลิตเบซิเทรซิน (bacitracin) ของ *Bacillus licheniformis* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคาตาโบไลท์ รีเพรซชั่นของน้ำตาลกลูโคส (Demain, 1968) หรืออาจเนื่องจากเมตาโบลิสมของน้ำตาลกลูโคสช่วยลดความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงหลังของการเจริญไม่ให้สูงเกินไป

ในกรณีที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด แหล่งสารคาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดชนิดของสารปฏิชีวนะ เช่น *B. licheniformis* จะผลิตเบซิเทรซินเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และจะผลิตไลเคนนิฟอร์มิน (licheniformin) เมื่อมีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (Callow and work, 1952)

1.1.2 <u>แหล่งสารไนโตรเจน</u>

จากน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียพบว่า ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถึง 10% สำหรับสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารปฏิชีวนะในโมเลกุลจะประกอบไปด้วยอะตอมของไนโตรเจน ดังนั้นในการผลิตสารปฏิชีวนะอาหารเลี้ยงเชื้อควรจะมีสารแหล่งไนโตรเจนเป็นสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณที่สูง เช่น กากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองสกัดไขมัน กากเมล็ดฝ้าย และกากถั่วลิสง สารประกอบไนโตรเจนเหล่านี้จะให้ผลผลิตสูง เนื่องจากย่อยสลายได้ยาก การนำไปใช้เกิดอย่างช้า ๆ แล้วยังหาได้ง่ายและราคาถูก สารปฏิชีวนะต่างชนิดกัน แหล่งสารไนโตรเจนที่เหมาะสมก็จะต่างกันไป ส่วนออกซิเจนและไฮโดรเจนเป็นสารประกอบอินทรีย์องค์ประกอบหลักของเซลล์

1.2 <u>กลุ่มแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย</u>

แร่ธาตุในกลุ่มนี้ จุลินทรีย์มีความต้องการเพียงปริมาณน้อย คือต่ำกว่า 10^{-4} โมลาร์ เช่น สังกะสี แมงกานีส เหล็ก แคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม คลอรีน แมกนีเซียม เป็นต้น แร่ธาตุเหล่านี้บางชนิดเป็นอิออนหลัก หรือองค์ประกอบที่สำคัญของส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นและสำคัญต่อจุลินทรีย์มาก

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1 อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ไม่น้อยไปกว่าปัจจัยอื่น ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป ผลผลิตที่ได้จะต่ำ เพราะจุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานในการหายใจสูง ดังนั้นในการผลิตสาร จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่พอเหมาะ (Haavik, 1974)

2.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

มีความสำคัญต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพมาก ได้มีการศึกษาพบว่า การที่สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลิตออกมาในช่วงหลังของการเจริญนั้น เนื่องมาจากความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญ การผลิตนี้สามารถทำให้เกิดขึ้นในช่วงของการเจริญ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม (Haavik, 1974, Egorov et.al., 1986)

2.3 แหล่งสารออกซิเจน จุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิสม และยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะของสารแขวนลอย ออกซิเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้นั้นต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลของออกซิเจนที่ละลายหรืออยู่ในรูปของเหลว

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ปัจจุบันปัญหาใหญ่ที่ทุกคนตระหนักคือการเสียสภาพสมดุลย์ของธรรมชาติและการเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่อาจจะแก้ไขได้ทันท่วงทีในระยะเวลาเพียง 2 หรือ 3 ปี และการเกิดปัญหาซึ่งกว่าจะปรากฏให้เห็นชัดเจนก็ได้สะสมมานานนับสิบปี ดังนั้นการป้องกันไม่เกิดปัญหาย่อมเป็นการที่ดีที่สุด การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพก็เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยป้องกันปัญหาเนื่องจากการใช้สารเคมี จากความสำคัญของมันฝรั่งซึ่งเป็นพืชอาหารหลักและพืชสำคัญทางเศรษฐกิจที่ประเทศไทยกำลังเพิ่มเนื้อที่ทำการเพาะปลูกเพื่อเพิ่มผลผลิตขึ้นทุก ๆ ปี ถึงแม้ว่าประเทศไทยมีปัญหาของโรคสแคปในมันฝรั่งจะยังไม่รุนแรงเท่ากับต่างประเทศ แต่เราก็ควรจะศึกษาและหาทางป้องกันโดยการใช้วิธีควบคุมทางชีวภาพเสียแต่เนิ่น มิฉะนั้นแล้วเมื่อถึงเวลานั้นอาจจะต้องใช้สารเคมีเพื่อแก้ปัญหาเฉพาะหน้าไปก่อนอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ที่สามารถผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้ง *S. scabies* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคสแคปในมันฝรั่ง และหาสภาวะที่เหมาะสมในขวดเขย่าเพื่อให้ผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงสุด ข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางในการควบคุมป้องกันโรค ในแปลงเพาะปลูกมันฝรั่ง และยังสามารถนำไปใช้ในการผลิตสารปริมาณมากในระดับถังหมักต่อไปด้วย

วิธีการวิจัย

ชนิดของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ 17 สายพันธุ์ (ดูจากตารางที่ 1) ซึ่งแยกได้จากบริเวณพื้นดินที่ทำการเพาะปลูกมันฝรั่ง เชื้อสเตรปโตมัยซิส สเคบี้ ได้รับจาก Lab. of Applied Microbiology Faculty of Agriculture, Kyushu University จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บที่ตู้เย็น 4°ซ

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ใช้ YMA ประกอบด้วย 0.1% yeast extract, 0.1% beef extract, 0.2% NZ-amine type A, 1.0% maltose, 2% agar ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH 7.0 แบ่งใส่หลอดแก้วหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลี เพื่อทำหลอดเอียง ส่วนที่เหลือนำไปใส่ในขวดแก้ว เพื่อเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 15 มิลลิลิตร การนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อใช้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

นิวเตรียน อการ์ (Nutrient agar)

แอนแอโรบิค อการ์ (Anaerobic agar)

วี-พี บรอท (Voges-Pros-kaver broth)

แซบบรอด เดกซ์โตรส บรอท (Sabouraud dextrose broth)

เบซัลมีเดียม น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ดี-กลูโคส (D-glucose) ดี-แมนนิทอล (D-manital) และดี-ไซโลส (D-xylose)

ซิเตรดและโปรปิโอเนท ยูติไลเซชั่น มีเดียม (Citrate and Propionate utilization medium)

สตาร์ช อการ์ (starch agar)

อินโดล โปรดักชั่น มีเดียม (Indole production medium)

กลีเซอรอล อการ์ (Glycerol agar)

มิลก์ อการ์ (Milk agar)

ซอลท์ โทเลอแรนซ์ มีเดียม (Salt tolerance medium)

นิวเตรียนท์ เจลาติน (Nutrient gelatin)

วัสดุและอุปกรณ์

กระดาษกรองวงกลมสำหรับตรวจสอบยาปฏิชีวนะ (paper disc for antibiotic examination) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จาก Tokyo Seisakusho Co., Ltd. และกระดาษกรอง GS ขนาด 0.22 ไมโครมิลลิเมตร - 25 มิลลิเมตร ตู้บ่มเชื้อชนิดเขย่า Psychrotherm incubator shaker, (New Brunswick), ตู้บ่มเชื้อของ Memert รุ่น RO-8 Western Germany, เครื่องวัด pH Suntex digital pH SP-5A, และเครื่องปั่นเหวี่ยงแรงสูง Beckman centrifuge J2-21

วิธีการทดสอบโดยวิธีขีดไขว้ (cross streak method)

การทดสอบด้วยวิธีนี้ อาศัยปฏิกิริยาจากการสร้างสารของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ใช้ลูป (loop) แตะเชื้อสเตบี้ตัวที่ทำให้เกิดโรคสแต็ป ในที่นี้ขอเรียกว่า testing organism ขีดเป็นเส้นยาวผ่านเส้นผ่าศูนย์กลางบนจานอาหาร YMA กับ testing organism โดยมิให้เชื้อสัมผัสกัน นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 27°ซ สังเกตบริเวณยับยั้ง (รูปที่ 1)

วิธีการทดสอบโดยวิธีชิมผ่าน (paper disc diffusion method)

เป็นการทดสอบด้วยวิธีการชิมของสารที่จะทำการทดสอบซึ่งอยู่ในกระดาษกรอง กล่าวคือ เลี้ยงจุลินทรีย์ 17 สายพันธุ์ ลงในแต่ละขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA ชนิดเหลว บนเครื่องเขย่าชนิดรีซิบโปรคอล (receiprocal) ที่ 27°ซ บ่มไว้เป็นเวลา 3-7 วัน แล้วนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแรงสูงที่ 10,000 รอบ - 20 นาที นำน้ำใสมากรองผ่านมิลลิฟอร์ ฟิลเตอร์ (millipore filter) จากนั้นจุ่มกระดาษกรองลงบนฟิวเตรท (filtrate) แล้วนำไปวางลงบนกลางจานอาหาร YMA ที่มีเชื้อสเตบี้ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 27°ซ วัดขอบเขตการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตบี้ที่เรียกว่า clear zone หรือ inhibition zone (รูปที่ 2)

การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)

เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อลงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 50 มิลลิลิตร นำไปเข้าตู้บ่มเชื้อชนิดเขย่าอุณหภูมิ 27°ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ใช้ 8% ปริมาตร/ปริมาตร ของเชื้อที่บ่มไว้ 12 ชม. นี้ เป็นหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าต่อไป

การเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

ใส่หัวเชื้อในปริมาณดังกล่าวข้างต้นลงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่ประกอบด้วย 1% bacto-peptone, 1% bacto-glucose, 2% soytone, 0.1% K_2SO_4 และ 0.001% $MnSO_4.H_2O$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วางขวดในตู้บ่มชนิดเขย่าแบบโรตารี่ที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27°ซ เลี้ยงเชื้อไว้ตั้งแต่ชั่วโมงเริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 72 เพื่อตรวจสอบหาสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นแทนกลูโคส เช่น ซูโครส แป้ง และโมแลส เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด และใช้สารแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ รวมทั้งเกลือแร่ หรือโลหะที่ใช้ปริมาณน้อย (trace metals) ชนิดอื่น ๆ อีกด้วย ทำโดยวิธีเดียวกันกับเมื่อใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

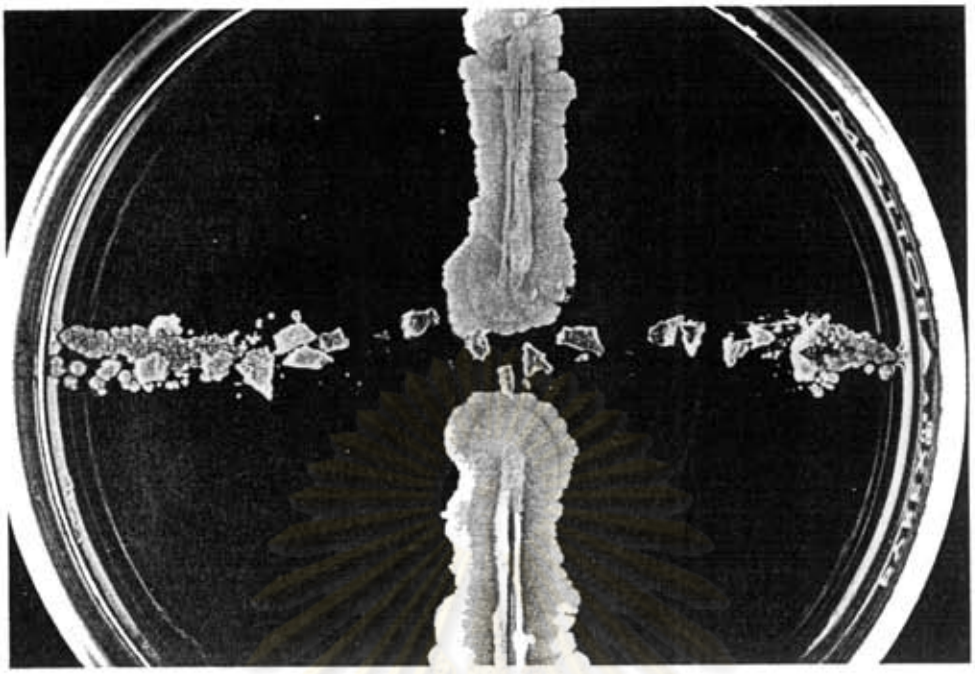
การทดสอบหาสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพของ C-33 โดย paper disc diffusion method

นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อที่เก็บจากขวดเขย่าหลังจากทำการบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา เช่น ชั่วโมงที่ 16, 24, 28, 36, 50 และ 72 นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแรงสูงที่ 10,000 รอบ - 20 นาที นำน้ำใสมากรองผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ (millipore filter) จุ่มกระดาษกรองวงกลม (paper disc) ลงบน filtrate แล้วนำไปวางลงบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อของสเคบี้ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 27°ซ วัดขอบเขตการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเคบี้ที่เรียกว่า clear zone หรือ inhibition zone กำหนดให้ 1 หน่วยของปฏิกิริยายับยั้ง (Unit of activity) ของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือ Biological active substance (BAS) มีค่าเท่ากับขนาดของ inhibition zone 3 ซม. ต่อ 1 มิลลิลิตร ของน้ำเชื้อ (broth culture)

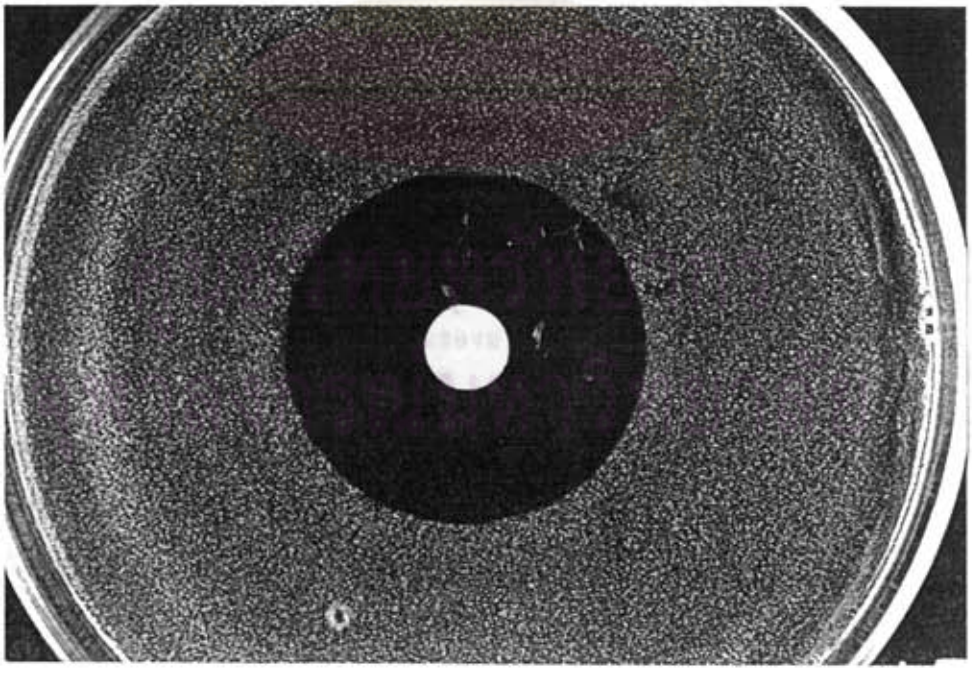
การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C-33 ทางอนุกรมวิธาน

นำจุลินทรีย์สายพันธุ์ C-33 ที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง *S. scabies* ได้สูงสุด มาตรวจสอบชนิดทางอนุกรมวิธาน (Sneath et.al., 1986) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) โดยศึกษาถึงลักษณะโคโลนี ตลอดไปจนถึงการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา (Physiological characteristics) โดยการศึกษาถึงการเจริญในอาหารชนิดต่าง ๆ การเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ (reagents) ที่ใช้ทดสอบ ตลอดไปจนถึงการทนเกลือ และอุณหภูมิสูง รวมทั้งการศึกษารูปแบบของการเจริญ (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ดูได้จากภาคผนวก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งของสายพันธุ์ C-33 ต่อสเคปี้ด้วยวิธี cross streak



รูปที่ 2 แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งของสายพันธุ์ C-33 ต่อสเคปี้ด้วยวิธี paper disc method

ผลของการวิจัย

ขอบเขตของการยับยั้ง (Clear zone or Inhibition zone)

เมื่อนำจุลินทรีย์ 17 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากบริเวณดินที่ทำการเพาะปลูกต้นมันฝรั่ง มาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อการเจริญของสเตรปโตมัยซีส สเคบี้ ด้วยวิธีขีดไขว้ (cross streak method) ให้ผลตามตารางที่ 1 และด้วยวิธีชิมผ่าน (paper disc diffusion method) ดังตารางที่ 2 ในจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่ทดสอบ พบว่า สายพันธุ์ C-33 จะให้ขอบเขตการยับยั้งได้สูงสุด มีค่าเฉลี่ย 3.7 ซม.

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารแหล่งคาร์บอน

เมื่อใช้ปริมาณ 1% ของสาร เช่น กลูโคส ซูโครส โมแลส หรือแป้ง เป็นสารแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มเชื้อ ตรวจสอบหาปริมาณของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (BAS) พบว่า ที่ชั่วโมง 36 หลังจากการบ่ม ค่าของ BAS ที่ได้จากกลูโคสจะเป็นค่าสูงสุด (รูปที่ 3) และเมื่อแบ่งปริมาณของกลูโคสเป็น 0.5, 0.7, 1.0, 1.3 และ 1.5% ดังรูปที่ 4 ปรากฏว่าปริมาณกลูโคสที่ใช้ดังกล่าว ไม่มีผลต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

สารแหล่งไนโตรเจน

สารแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ได้แก่ กากถั่วเหลืองสกัดด้วยเอนไซม์ หรือซอยโทน (Soytone) กากถั่วเหลือง (Soybean meal) และกากถั่วเหลืองสกัดไขมัน (Hydrolyzed soybean meal) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน พบว่าที่ชั่วโมง 36 ของการบ่ม เมื่อใช้ 2% ซอยโทน จะให้ค่าของ BAS สูงกว่าค่าของสารอีก 2 ชนิด (ตารางที่ 3) สารแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างจะเป็นกรด แต่ซอยโทนเป็นสารที่รักษาเสถียรภาพของความเป็นกรดด่างได้ดี มีรายงานการเติม $CaCO_3$ ลงไปในอาหารเพื่อดีพีเอชให้สูงขึ้นมา ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพเห็นได้อย่างชัดเจน

จากการเปรียบเทียบสารแหล่งไนโตรเจนคือ เปปโตน (peptone) ผงสกัดมอลท์ (malt extract), ผงสกัดยีสต์ (yeast extract) และทริปโตน (tryptone) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน พบว่าอาหารที่มี malt extract จะให้ผลผลิตได้สูงกว่าตัวอื่น ๆ (รูปที่ 5) และปริมาณของ malt extract ที่เหมาะสมที่สุดคือ เมื่อใช้ 1% (รูปที่ 6)

แร่ธาตุต่าง ๆ

ความต้องการแร่ธาตุปริมาณน้อย (trace metals) ชนิดต่าง ๆ เพื่อช่วยในการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์นั้น มีความจำเป็นและสำคัญต่อจุลินทรีย์มากกว่าที่จะต้องการเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ จากตารางที่ 4 แร่ธาตุที่นำมาใช้ได้แก่ $MnSO_4$, $MgCl_2$, K_2SO_4 และ $FeSO_4$ พบว่า 0.0016% K_2SO_4, 0.0001% $MnSO_4$, 0.0005% $MgCl_2$ และ 0.0028% $FeSO_4$ เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มผลผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง หรือพีเอช

เมื่อแปรอุณหภูมิของการบ่มเชื้อและพีเอชของมีเดียม พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารคือ ที่ 27°ซ (รูปที่ 7) และพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสาร จะอยู่ในช่วง 7.0-8.5 (รูปที่ 8)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 การแสดงฤทธิ์ของจุลินทรีย์ที่ยับยั้งการเจริญของสเคมี่ โดยวิธี cross streak method

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ผลการทดสอบ
A 11	+
A 12	+
A 13	-
A 14	+
A 15	+
A 16	+
A 17	+
B 21	+
B 22	+
B 23	+
B 24	+
B 25	-
B 26	+
B 27	+
C 31	+
C 32	+
C 33	+

+ หมายถึง สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสเคมี่

- หมายถึง ไม่สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสเคมี่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ขอบเขตการยับยั้งของจุลินทรีย์ต่อสเคมี้ด้วยวิธี paper disc diffusion method

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ขอบเขตการยับยั้ง (ซม.)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
A 11	0.90	0.80	0.85
A 12	1.10	0.90	1.00
A 13	-	-	-
A 14	0.80	0.80	0.80
A 15	2.20	2.00	2.10
A 16	1.40	1.30	1.35
A 17	0.60	0.40	0.50
B 21	2.00	1.90	1.95
B 22	0.50	0.60	0.55
B 23	1.80	1.60	1.70
B 24	-	-	-
B 25	-	-	-
B 26	2.60	2.40	2.50
B 27	1.90	1.70	1.80
C 31	2.10	2.00	2.05
C 32	0.80	0.60	0.70
C 33	3.80	3.60	3.70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 สารแหล่งไนโตรเจนและแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

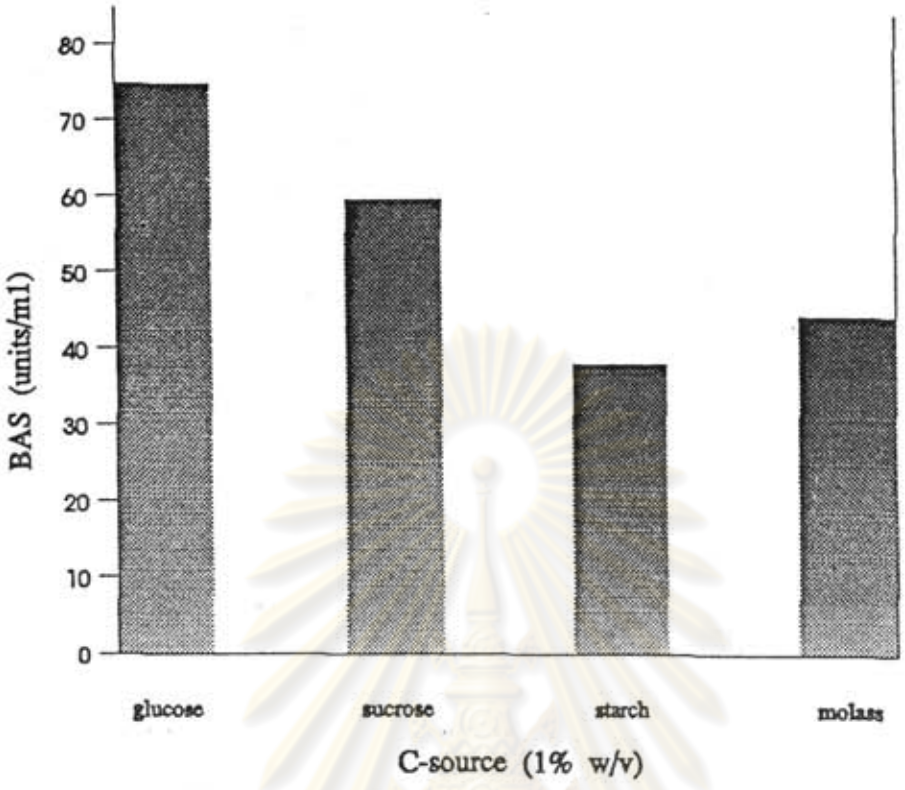
N-SOURCES + 1% peptone	BAS (units/ml)		Final pH	
	% $CaCO_3$		% $CaCO_3$	
	0.0	0.5	0.0	0.5
2% Soytone	53.3	61.66	7.57	7.60
2% Soybean meal	28.33	41.67	5.65	7.80
2% Hydrolyzed soybean-meal	33.33	50.00	5.50	7.44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

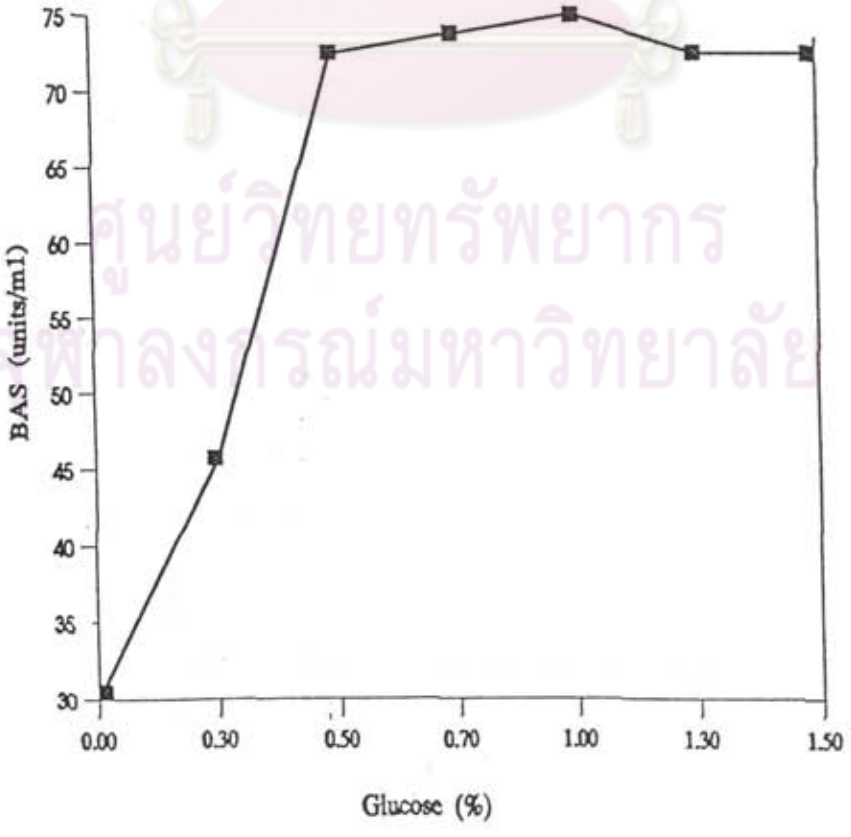
ตารางที่ 4 ผลของปริมาณแร่ธาตุ (trace metal) ต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ชนิดแร่ธาตุ	ปริมาณ (% w/v)	BAS (units/ml)
$MnSO_4.H_2O$	0.0000	40.00
	0.0010	58.33
	0.0015	51.66
	0.0020	48.33
$MgCl_2.6H_2O$	0.0000	58.33
	0.0005	66.66
	0.0007	53.33
	0.0010	50.00
	0.0013	46.66
K_2SO_4	0.0000	36.67
	0.1000	50.00
	0.1200	58.33
	0.1600	61.66
	0.2400	61.66
$FeSO_4.7H_2O$	0.0000	50.00
	0.0020	55.00
	0.0024	60.00
	0.0028	61.66
	0.0032	58.33

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

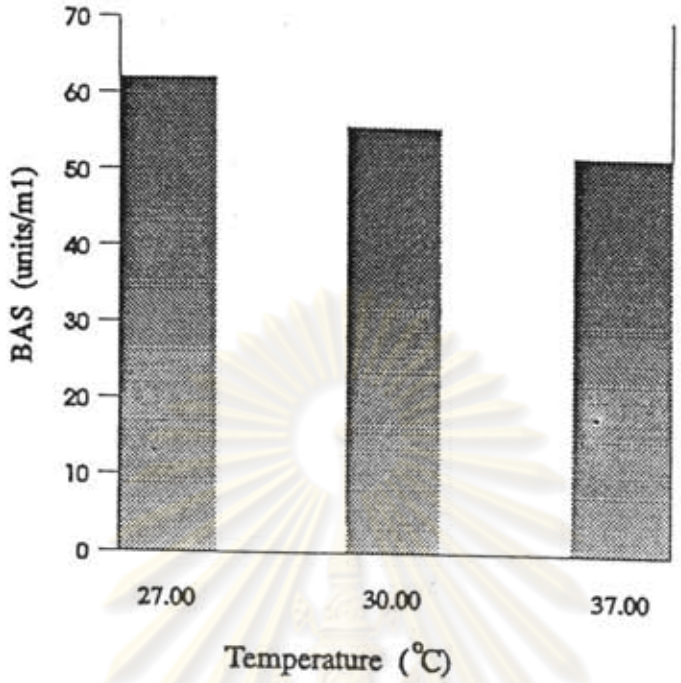


รูปที่ 3 ผลของสารแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต BAS ที่ 36 ชม.

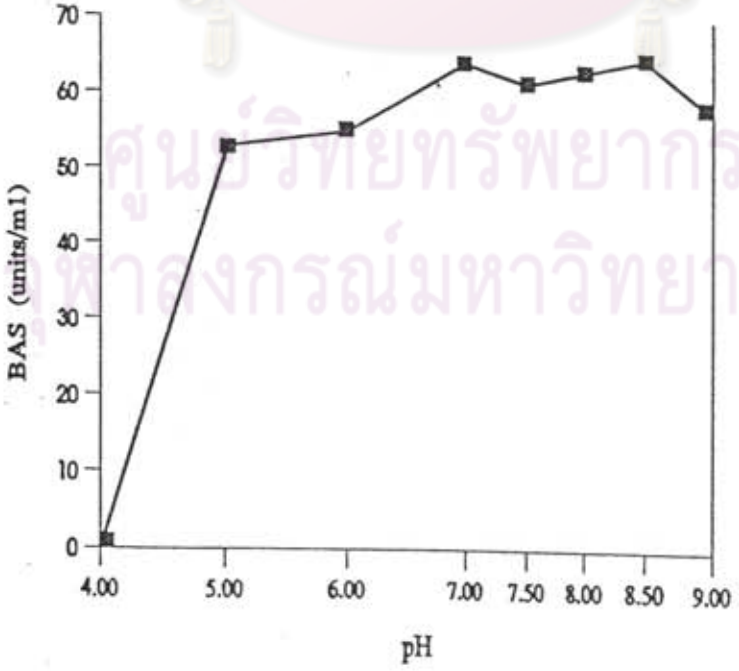


รูปที่ 4 ปริมาณของกลูโคสที่มีผลต่อการผลิต BAS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

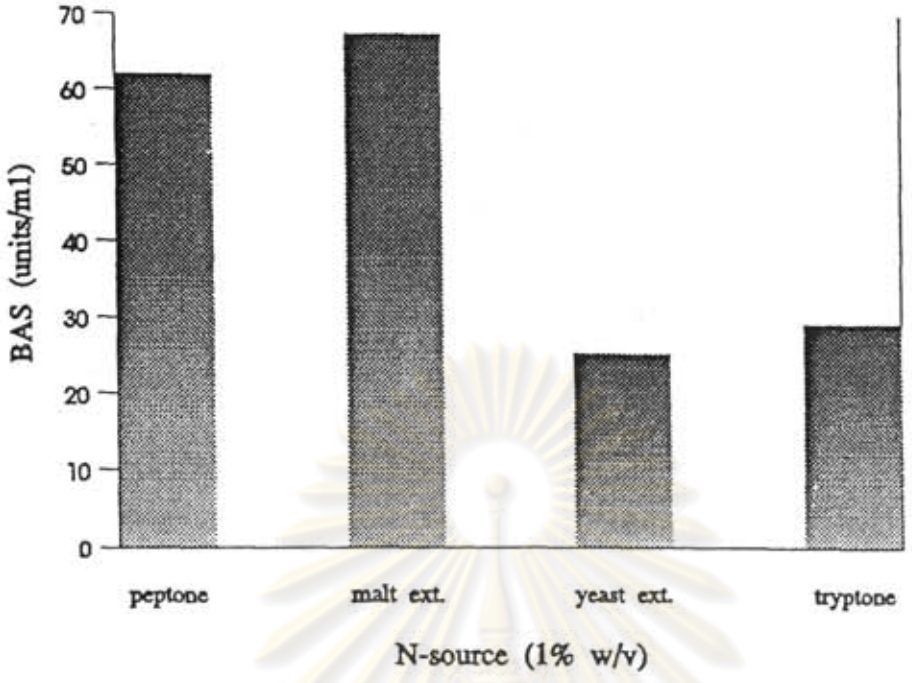


รูปที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต BAS

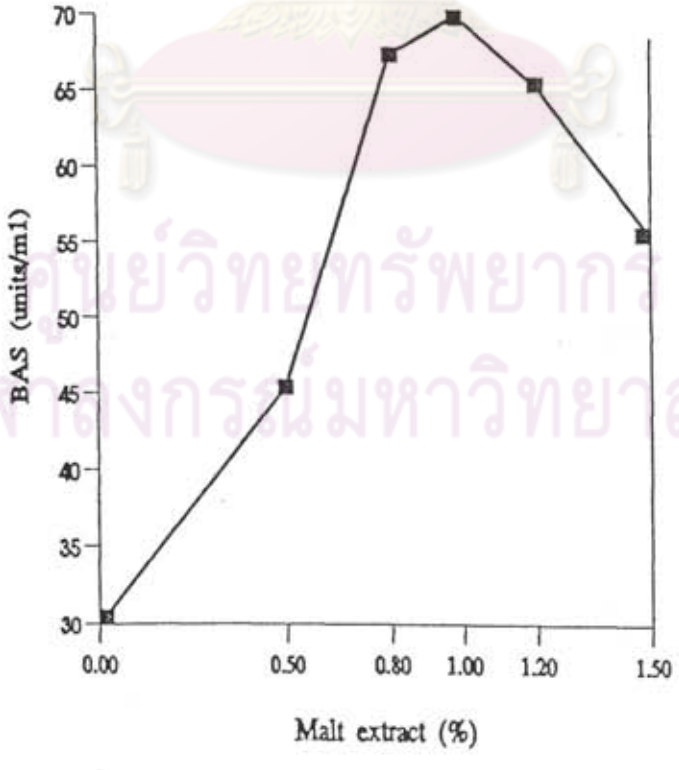


รูปที่ 8 ผลของพีเอชในมีเดียมต่อการผลิต BAS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 ผลของสารแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต BAS



รูปที่ 6 ปริมาณของผงสกัดมอลท์ต่อการผลิต BAS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจสอบชนิดของ C-33 ทางอนุกรมวิธาน

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ C-33 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้ง สเตรปโตมัยซีส สเคบี้ ได้ดีที่สุด พบว่า มีลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์ อการ์ (nutrient agar) เป็นสีขาวขุ่นแห้ง เมื่อย้อมสีและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน มีเอนโดสปอร์รูปไข่อยู่กลางเซลล์ เชื้อมีสมบัติในการย่อยเคซีน (casein) แป้ง (starch) และใช้ซิเตรท (citrate) ให้ผลบวกเมื่อทดสอบคาตาเลส (catalase test) และวี-พี (V-P test) (ซึ่งใช้ความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0) ให้ผลลบเมื่อทดสอบอินดอล (indole test) ผลิตกรดออกมาเมื่อเลี้ยงในเบซัล มีเดียม (basal medium) ที่มีน้ำตาลกลูโคส (glucose) แมนนิทอล (mannitol) และไซโลส (xylose) สามารถเจริญได้ในอาหารนิวเตรียนท์ บรอท (nutrient broth) ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 6.8 เดกซ์โทรส บรอท (dextrose broth) ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ซอลท์ โทเลอเรนซ์ มีเดียม (salt tolerance medium) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2.0%, 5.0%, 7.0% และ 10.0% สามารถเจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิ 55°ซ ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ของสายพันธุ์ C-33

ลักษณะ	รายละเอียด
โคโลนีบนนิวเตรียนท์ อการ์	ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-5 มม. แห้ง กระด้าง ไม่เป็นมัน สีขาวขุ่น
รูปร่างของเซลล์	เป็นท่อน
การย้อมสีแกรม (Gram stain)	ติดสีน้ำเงิน
เอนโดสปอร์	เป็นรูปไข่ อยู่ตรงกลางเซลล์

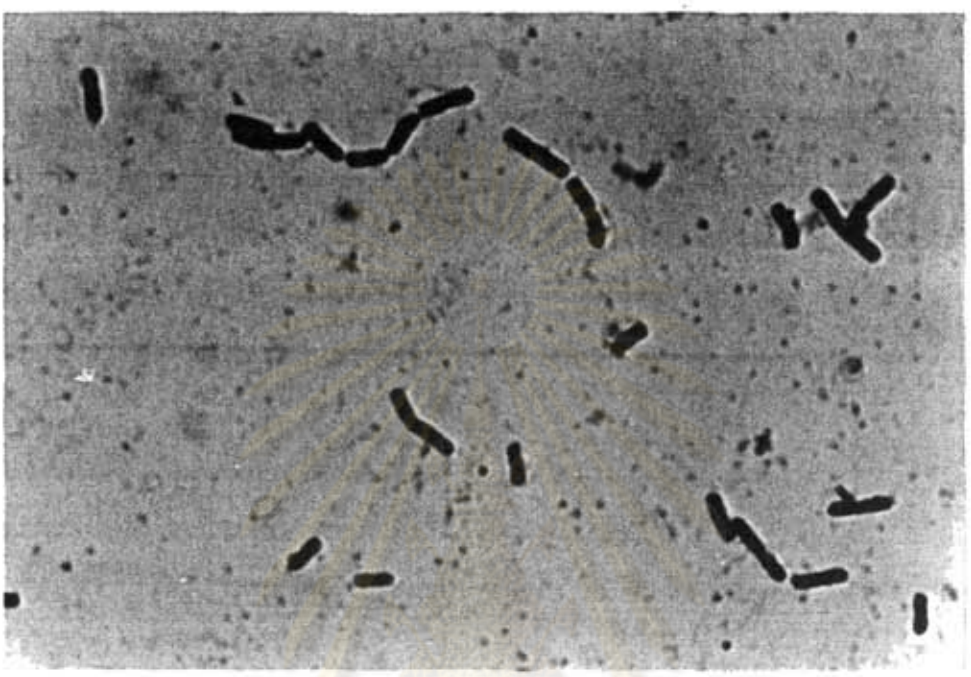
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสรีระวิทยา (physiological characteristic) ของสายพันธุ์ C-33

ชนิดของลักษณะการตรวจสอบ	ผลการตรวจสอบ
คาตาเลส (catalase)	+
วี-พี (V-P)	+
อินดอล (indole)	-
เคซีน (casein)	+
แป้ง (starch)	+
ซิเตรท (citrate)	+
การผลิตกรดจากน้ำตาล	
กลูโคส (glucose)	+
แมนนิทอล (mannitol)	+
ไซโลส (xylose)	+
พี-เอช จาก วี-พี บรอท	< 6.0
การเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (%)	
2	+
5	+
7	+
10	+
การเจริญในแซบบรอดเดกซ์โทรส pH 5.7	+
การเจริญในนิวเตรียนท์บรอท pH 6.8	+
การเจริญในแอนแอโรบิค อการ์	+
การเจริญในสภาวะอุณหภูมิ 55°ซ	+

จากผลการศึกษาดังกล่าวเบื้องต้น (ตารางที่ 5 และ 6) สายพันธุ์ C-33 มีลักษณะคล้าย *Bacillus licheniformis* (Sneath et al., 1986) (รูปที่ 9)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 รูปร่างลักษณะสายพันธุ์ C-33 จากกล้องจุลทรรศน์
(กำลังขยาย 1000 เท่า)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัยและอภิปราย

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์จำนวน 17 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้ง *S. scabies* ซึ่งทำให้เกิดโรคหูดหรือสแคปในมันฝรั่ง ที่ได้มาจากดินที่บริเวณผิวของหัวมัน พบว่าสายพันธุ์ C-33 ซึ่งตรวจสอบทางอนุกรมวิธาน มีลักษณะคล้าย *Bacillus licheniformis* เป็นสายพันธุ์ที่ให้ขอบเขตการยับยั้งได้ดีที่สุด วัดค่าเฉลี่ยได้ 3.7 ซม. ในการคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพนั้น แหล่งของจุลินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง ทั้งจุลินทรีย์ตัวที่ก่อโรคและตัวที่ควบคุม ควรมาจากสิ่งแวดล้อมเหมือนกัน หรือแหล่งเดียวกัน มิฉะนั้นเวลานำไปใช้จะไม่สามารถแสดงฤทธิ์ได้เหมือนในห้องปฏิบัติการ *Bacillus* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่เอื้ออำนวยต่อการศึกษามาก เช่น เลี้ยงง่าย เจริญเติบโต รวดเร็ว ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี และสามารถผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ซึ่งขึ้นกับชนิดและสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพนั้นพบว่า *Bacillus* sp. ให้ผลดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Weinhold and Bowman, 1968; Mackeen et.al., 1986 และ Azad et.al., 1987)

การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อการวิจัยครั้งนี้ ใช้ 2 วิธี คือ วิธีการขีดไขว้ โดยให้เชื้อแสดงฤทธิ์ยับยั้งกันโดยตรง วิธีนี้ง่าย รวดเร็ว เหมาะสำหรับดูผลโดยประมาณการ อีกวิธีคือการชิมช่านหรือชิมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยดูบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบที่อิ่มตัวด้วย น้ำเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ปราศจากเชื้อเสียก่อน วิธีนี้จะเป็นวิธีที่เที่ยงตรงกว่าวิธีแรกมาก เพราะถ้าเชื้อสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาน้อยเกินไป ผลการยับยั้งจะไม่ปรากฏ

การหาสภาวะที่เหมาะสำหรับการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในขวดเขย่า โดยเลือกใช้สูตรอาหารสำหรับผลิตเบซิเทรซินจาก *B. licheniformis* (Haavik and Thomassen, 1973) พบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดเมื่อเทียบกับซูโครส แป้ง และกากน้ำตาล ดังรูป 3 และ 4 ผลของการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาทั่วไปที่ว่ากลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิสมได้เร็ว จึงเกิดการยับยั้งการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และเซกันดารีเมตาบอไลท์อื่น ๆ (วนิดา เรืองศรี, 2532; Drew 1977; Egorov et.al., 1986) แต่ผลการศึกษาครั้งนี้ไปสอดคล้องกับการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์บางท่าน (Snoke, 1961; Haavik, 1974) ซึ่งพบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการผลิตเบซิเทรซินจาก *B. licheniformis* และยังกระตุ้นการผลิตสารปฏิชีวนะตัวอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น โพลีมิกซิน และแอคติโนมัยซินของจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย

สารแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพมาก การศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบระหว่างซอยโทน กากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองสกัดไขมัน พบว่า ซอยโทนจะให้ผลผลิตสูงที่สุด ทั้งนี้เพราะว่าซอยโทนมีปริมาณสารไนโตรเจน/กรัมสูง และยังมีคุณสมบัติที่ดีกว่าสารแหล่งไนโตรเจนอื่นที่นำมาศึกษาครั้งนี้ คือความสามารถในการคงสภาพความเป็นกรด-ด่าง (buffer capacity) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไว้ได้ดีกว่าสารแหล่งไนโตรเจนอื่น และเมื่อเติม $CaCO_3$ ลงไปในอาหารเพื่อเพิ่มความเป็นกรด-เอชให้สูงขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับรายงานที่เคยมี (Haavik, 1974)

เมื่อเปรียบเทียบชนิดสารแหล่งไนโตรเจนกลุ่มอื่นคือ เปปโตน มอลท์เอ็กซ์แทรค ยีสต์เอ็กซ์แทรค และทริปโทน ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน พบว่า เมื่อใช้ปริมาณ 1% ของมอลท์เอ็กซ์แทรค จะให้ผลผลิตของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงกว่าสารแหล่งไนโตรเจนตัวอื่น แต่เมื่อเทียบกับเปปโตนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ และมีคุณสมบัติในการพยุงความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ผลผลิตที่ได้ก็ไม่น่าจะแตกต่างกันมากนัก ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดได้แก่ ซอยโทน และผงสกัดมอลท์

จากการศึกษาปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ตามตารางที่ 4 พบว่า เมื่อใช้ $FeSO_4.7H_2O$ 0.028 กรัม/ลิตร K_2SO_4 1.60 กรัม/ลิตร $MgCl_2.6H_2O$ 0.005 กรัม/ลิตร และ $MnSO_4.H_2O$ 0.010 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ทั้งนี้เนราะเกลือแร่แต่ละชนิดล้วนแต่มีความสำคัญต่อจุลินทรีย์ทั้งสิ้น Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, K^+ ต่างเป็นอิออนที่แบคทีเรียต้องการ (Gottschalk, 1986) จะเห็นว่า K^+ ต้องการในปริมาณที่สูงสุดเมื่อเทียบกับอิออนตัวอื่น ๆ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ 27°ซ ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งเป็นอุณหภูมิในช่วงเดียวกันกับอุณหภูมิที่เหมาะต่อการลงหัวของมันฝรั่ง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2531) ดังนั้นถ้านำสายพันธุ์ C-33 นี้ไปใช้ในแปลงปลูกมันฝรั่งก็หมดปัญหาในเรื่องอุณหภูมิ เพราะหัวมันฝรั่งจะถูกสเตรปโตมัยซีส สเคบี้ เข้าทำลายในช่วงนี้

ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ชีวภาพมาก การศึกษาครั้งนี้พบว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในช่วง 7.0-8.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด อย่างไรก็ตาม ค่าความเป็นกรดด่างที่อยู่ในช่วง 5.0-6.0 มีการผลิตที่ดีพอควร ส่วนความเป็นกรดด่างที่ 4 นั้น สายพันธุ์ C-33 ไม่สามารถผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เพราะเป็นสภาวะที่รุนแรงเกินไป

โดยทั่วไป วิธีการควบคุมโรคพืชมักใช้สารเคมีในรูปต่าง ๆ ถึงแม้จะสะดวกและรวดเร็ว แต่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมมาก ทำให้เกิดพิษตกค้างสะสมในผลผลิตของพืช ในดิน น้ำ และอากาศ ซึ่งเป็นโทษมหันต์ต่อชีวิตมนุษย์ สัตว์ และทำลายสภาวะแวดล้อมด้วย การศึกษาหาวิธีป้องกันโรคสแคปที่เกิดจาก *S. scabies* ในมันฝรั่ง โดยการควบคุมทางชีวภาพนั้น ในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นการวิจัยนี้นับได้ว่าเป็นผลงานวิจัยแรกที่ศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งสเคบี้ และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่อต้านโรคสแคปในมันฝรั่งด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

จากความสำคัญของมันฝรั่ง ซึ่งเป็นพืชอาหารหลักและพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยที่กำลังเพิ่มเนื้อที่การเพาะปลูกต้นมันฝรั่งมากขึ้นทุกปี มีการใช้พื้นที่ทำการเพาะปลูกปีละ 2 ครั้งขึ้นไป ดังนั้นคงจะต้องประสบปัญหาการระบาดของโรคสแคปอย่างแน่นอนในภายหน้า โครงการวิจัยควบคุมโรคทางชีวภาพ เพื่อป้องกันการเสื่อมโทรมของสภาพแวดล้อม น่าที่จะได้รับการสนับสนุนและมีการศึกษากันอย่างจริงจังและเร่งด่วน เพื่อข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางสำหรับนำไปใช้ในการควบคุมป้องกันโรคสแคป ก่อนที่เราจะประสบปัญหาชนิดหลีกเลี่ยงไม่ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. กรมส่งเสริมการเกษตร (2531) การปลูกมันฝรั่ง. พิมพ์ครั้งที่ 2, คำแนะนำที่ 105 กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
2. กรมศุลกากร (2532) ข้อมูลได้จากกรมศุลกากร, กระทรวงการต่างประเทศ.
3. คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา (2527) พืชเศรษฐกิจ 1. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
4. ชงชัย ทองอุทัยศรี (2529) มันฝรั่ง. เอกสารเผยแพร่สัมมนาวิชาการมันฝรั่ง ครั้งที่ 1 ณ สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, หน้า 1-19.
5. ปราณี ธัมเมอลิงค์ (2528) ปัญหาและการป้องกันกำจัดโรคมันฝรั่งเพื่อเพิ่มผลผลิต. เอกสารประกอบการอบรมกลุ่มผู้ทำงานโครงการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง.
6. มาโนช ทองเจียม (2531) มันฝรั่ง. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.
7. มาโนช ทองเจียม (2528) มันฝรั่ง. วิทยาสารกองพืชสวน 3(3): 1-25.
8. วนิดา เรืองศรี (2532) สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลินจี โดยเพนนิซิเลียมไครโซจีนัม A 88, วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
9. สถาปัตย์ ปรีดา (2517) บ้านไร่ปลายนา. สำนักพิมพ์คลังวิทยา กรุงเทพมหานคร.
10. Alexander, M. (1961) Introduction to soil microbiology. John Wiley, New York, p. 381.
11. Azad, H.R., David, J.R., Schnathorst, W.C. and Kado, C.F. (1987) Influence of Verticillium wilt and susceptible potato genotypes on population of antagonistic rhizophere and rhizoplane bacteria and free nitrogen fixer. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26 : 99-104.
12. Bernlohr, R.W. and Novelli, G.D. (1963) Bacitracin biosynthesis and spore formation : The physiological role of an antibiotic. Arch. Biochem. Biophys. 103 : 94-104.
13. Burr, T.J., Schroth, M.N. and Suslow, T. (1978) Increased potato yield by treatment of seed pieces with specific strains of

Pseudomonas fluorescens and *P. Putida*. Phytopathology, 68 : 1377-1383.

14. Callow, R.K. and Work, T.S. (1952) Antibiotic peptides from Bacillus *licheniformis* licheniformains A, B and C Biochem. J. 51 : 558-567.

15. Davis, J.R. McDole, R.E. and Calliman, R.H. (1976) Fertilizer effects on common scab of potato and the relation of calcium and phosphatephosphorus. Phytopathology, 66 : 1236-1241.

16. Demain, A.L. (1968) Regulatory mechanisms and the industrial production of microbial metabolites. Lloydia 31 : 395-418.

17. Drew, S.W. (1977) Effect of primary metabilite on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31: 343-356.

18. Egorov, N.S., Loriya, Z.K., Vyborynkh, S.N. and Khamrun, R. (1986) Effect of the composition of the medium on bacitracin synthesis and spore formation by *Bacillus licheniformis* 28 KA. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya 22 : 107-111.

19. Gottschalk, G. (1986) Bacterial metabolism 2nd ed. Springer Verlag, New York.

20. Haavik, H.I. and Thomassen, S. (1973) A bacitracin negative mutant of *Bacillus licheniformis* which is able to sporulate. J. Gen. Microbial. 76 : 451-454.

21. Haavik, H.I. (1974) Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : Effect of glucose. J. Gen. Microbiol. 81 : 383-390.

22. Hayashida, S. Choi, M.Y., Nanri, N. and Miyaguchi, M. (1989) Control of potato common scab with an antibiotic biofertilizer produced from swine feces containing *Streptomyces albidoflavus*-CH 33. Agric. Biol. Chem. 53 (2) : 349-354.

23. Hooker, W.J. (1983) Compendium of potato diseases. The Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, p. 1-125.

24. Kosuge, T. and Nester, Z. W., eds. (1989) Plant microbe interaction. McGraw-Hill Publishing, New York.

25. McKeen, C.D., Reilly, C.C. and Pusey, P.L. (1986) Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilla fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathology, 76 : 136-139.

26. Millard, W.A. and Tylor, C.B. (1927) Antagonism of microorganisms as the controlling factor in inhibition of scab by green manuring. Ann. Appl. Biol. 14 : 202-216.

27. Sanford, G.B. (1926) Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*. Phytopathology, 16 : 525-547.

28. Sarkar, N. and Paulus, H. (1972) Functional of peptide antibiotics in sporulation. Nature New Biology. 239 : 228-230.

29. Smith, O. (1977) Potatoes : Production, Storing, Processing. Avi Publishing Co., Connecticut. p. 515.

30. Sneath, P.H.H., Mair, N.S., Sharpe, M.L. and Holt, S.G., eds. (1986) Bergey's mannual of systematic bacteriology. Vol. 2, William & Wilkins, London.

31. Snoke, J.E. (1961) Formation of bacitracin by protoplasts of Bacillus licheniformis. J. Bacteriol. 81: 986-989.

32. Weinhold, A. and Bowman, T. (1968) Selective inhibition of the potato scab pathogen. Plant and Soil, XXVIII (1) : 13-22.

ภาคผนวก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. นิวเตรียน อการ์ (nutrient agar)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
แบคโต เปปโตน	5.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำ	1,000.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

2. แอนแอโรบิค อการ์ (anaerobic agar)

ทริปติเคส	20.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
โซเดียมไทโอไกลโคเลท	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

pH = 7.2

ใส่หลอดทดลองขนาด 15.0 มม. โดยใส่อาหารให้ลึก 75.0 มม. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิความดันมาตรฐาน

3. วี-พี บรอท (Voges Proskaver broth)

โปรติโอส เปปโตน	7.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำกลั่น 5.0 กรัม

pH = 6.5

ใส่หลอดขนาด 20.0 มม. หลอดละ 5.0 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิความดันมาตรฐาน

4. <u>แซบบรอด เดกซ์โทรส บรอท</u> (Sabouraud dextrose broth)

นีโอเปปโตน	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

pH = 5.7

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิความดันมาตรฐาน

5. <u>เบซัล มีเดียม</u> (basal nedium)

ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต	1.0	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
ผงสกัดยีสต์	0.2	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

ปรับ pH 7.0 แล้วจึงเติมบรอมครีซอล เพอเพิล (0.04% น้ำหนัก/ปริมาตร)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิความดันมาตรฐาน

น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ดี-กลูโคส, ดี-แมนนิทอล และ ดี-ไซโลส

6. <u>ซิเตรตและโปรพิโอเนตยูติไลเซชัน มีเดียม</u> (citrate and propionate utilization medium)

ไตรโซเดียม ซิเตรต	1.0	กรัม
(โซเดียมโปรพิโอเนต	2.0	กรัม)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.2	กรัม

ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	1.0	กรัม
เทรสอีลีเมนท์ โซลูชัน	40.0	กรัม (Trace element solution)
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	920.0	มล.
ฟีนอล เรด (0.04% น้ำหนัก/ปริมาตร)	20.0	มล.

pH = 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

<u>เทรซอีลีเมนท์ โซลูชั่น</u> (Trace element solution) ประกอบด้วย

เอทธีลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตต	500.0	มก.
(ethylenedianinetetraacetate)		
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	10.0	มก.
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	10.0	มก.
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	20.0	มก.
โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	20.0	มก.
คอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2.2H_2O$)	1.0	มก.
นิกเกิลคลอไรด์ ($NiCl_2.6H_2O$)	2.0	มก.
โซเดียมโมลิบเดต ($NaMoO_4.2H_2O$)	3.0	มก.
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

7. <u>สตาร์ช อการ์</u> (starch agar)

แป้งมันฝรั่ง	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	10.0	มล.
นิวเตรียนท์ อการ์	100.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. อินโดล โปรดักชัน มีเดียม (Indole production medium)

ทริปโตน	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

ใส่หลอด ๆ ละ 5.0 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิความดันมาตรฐาน

9. กลีเซอรอล อการ์ (glycerol agar)

นิวเตรียน อการ์	1,000.0	มล.
ผงสกัดยีสต์	10.0	กรัม
กลีเซอรอล	20.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิความดันมาตรฐาน

10. มิลก์ อการ์ (milk agar)

ผงนมสกัด	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	กรัม

ผงวุ้น 1 กรัม ในน้ำกลั่น 50.0 มล.

แยกฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิความดันมาตรฐานเมื่ออุณหภูมิถึง 45°ซ จึงผสมกันเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

11. ซอลท์ โทเลอแรนซ์ มีเดียม (Salt tolerance medium)

นิวเตรียนท์ บรอท	100.0	มล.

โซเดียมคลอไรด์ 2.0%, 5.0%, 7.0% และ 10.0% น้ำหนัก/ปริมาตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

12. นิวเตรียนท์ เจลาติน (nutrient gelatin)

เจลาติน	120.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

ปรับ pH = 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิความดันมาตรฐาน

สารเคมีที่ใช้ทดสอบและสีย้อม

1. สารละลายโคแวค (Kovac's solution)

พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-dimethylaminobenzaldehyde)	5.0	กรัม
เอมิล หรือ บิวธิลแอลกอฮอล์ (Amyl or butyl alcohol)	75.0	มล.
กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น	25.0	มล.

ละลายสีย้อมทั้งหมดเข้าด้วยกันใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

2. สารละลายทดสอบ Voges-Prokauer (Voges-Prokuer test reagent)

สารละลาย ก.

แอลฟาแนฟทอล (Alpha-naphthol)	5.0	มล.
95% เอทธานอล	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีน้ำตาล

สารละลาย ข.

โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีน้ำตาล

3. สารละลายคริสตอลไวโอเล็ต (crystal violet solution)

คริสตอลไวโอเล็ต	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มล.

4. สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate solution)

โซเดียมไบคาร์บอเนต	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. สารละลายแกรมส์ไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีน คริสตอล	10.0	กรัม
โปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI)	0.5	กรัม
โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มล.

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นช้า ๆ แล้วจึงเติมไอโอดีน คริสตอลลงไป และเติมโปตัสเซียมไอโอไดด์หลังสุด

6. สารละลายอะซีโตน แอลกอฮอล์ (Acetone alcohol solution)

อะซีโตน	50.0	มล.
95% เอทธานอล	50.0	มล.

7. สารละลายซาฟรานิน (Safranin staining solution)

ซาฟรานีน	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มล.

8. สารละลายมาลาไคท์กรีน (Malachite green)

มาลาไคท์กรีน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	95.0	มล.

ละลายมาลาไคท์กรีนในน้ำกลั่นจนหมด ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วัน กรองก่อนนำไปใช้

9. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide solution)

มีความเข้มข้น 3%

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (30%)	10.0	มล.
น้ำกลั่น	90.0	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย