

การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา

Aspergillus flavus

Isolation and Screening of Bacterial Antagonistic for Controlling

*Aspergillus flavus*วาสนา เนียมแสวง^{1*}Wasana Naiumsawang^{1*}

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้แยกเชื้อแบคทีเรียจากดินด้วยวิธี spread plate บนอาหาร NA คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 48 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ด้วย dual culture technique พบว่า มีเพียง 5 ไอโซเลท ได้แก่ IKPS 4 27 36 42 และ 46 ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ โดยไอโซเลท IKPS 4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 56.67 ± 8.819 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไอโซเลท IKPS 4 มาจัดจำแนก พบว่า เป็นจีส *Bacillus* sp. จากนั้นนำมาศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 96 ชั่วโมง เป็นสถานะเหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง *A. flavus* ได้ดีที่สุด เมื่อนำ culture supernatant มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *A. flavus* ด้วย poisoned food method พบว่าที่ culture supernatant 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพดีที่สุดเท่ากับ 65.01 ± 15.28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า เส้นใยมีขนาดเล็กและสั้นกว่าเส้นใยปกติ จากนั้นนำ culture supernatant มาควบคุมการเจริญของ *A. flavus* บนเมล็ดถั่วลิสง ด้วยวิธีจุ่มเคลือบเมล็ด บ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ที่การใช้ culture supernatant 100 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยราได้ดีที่สุดในระยะเวลา 3 วัน

คำสำคัญ: แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Aspergillus flavus* เทคนิค dual culture

¹ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

* Corresponding author e-mail: wasana@webmail.npru.ac.th

Receive: 3 December 2018, Revised: 27 March 2019, Accepted: 11 April 2019

Abstract

Antagonist bacteria were isolated from soil for determination of antifungal potential. Antagonistic activities of 48 isolates on *Aspergillus flavus* were evaluated by dual culture technique. The results indicated that 5 isolates, IKPS 4, IKPS 27, IKPS 36, IKPS 42 and IKPS 46 exhibited the highest antifungal activities, which was isolate IKPS 4 gave the highest activity at $56.67 \pm 8.819\%$. Isolate IKPS 4 was identified as *Bacillus* sp. The best condition of antifungal substance production was optimized for 96 hrs at pH 7.0, 30°C . The poisoned food method was conducted to evaluate antifungal activity of the bacterial culture supernatant. At the concentration of 100% supernatant, the highest antifungal activity ($65.01 \pm 15.28\%$) was observed. Morphology of *A. flavus* under light microscope indicated that the effected mycelium was smaller and shorter than unaffected mycelium. Growth inhibition of fungal on seeds were conducted by dip coating method. The seeds coated with the culture supernatant at 100 and 50.00% concentrations had the highest fungal growth inhibition at 3 days.

Keywords: Antagonistic bacteria, *Aspergillus flavus*, Dual culture technique

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสภาวะอากาศและสิ่งแวดล้อมเหมาะสมและเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา จึงทำให้อาหารและผลผลิตทางการเกษตรรวมถึงวัตถุดิบที่นำมาเป็นอาหารของคนและสัตว์ เช่น เมล็ดธัญพืช ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ปลาข้าวกากถั่วเหลือง ถั่วลิสง เนื้อมะพร้าว เฮเซลนัต ถั่วพิสตาชิโอ และอัลมอนต์ เกิดการปนเปื้อนเชื้อราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อชีวิต ทั้งยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของอาหารรวมถึงวัตถุดิบ การปนเปื้อนของเชื้อและสารพิษจากเชื้อราพบได้ทั่วไปในถั่วลิสง ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่กระบวนการปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา และการขนส่ง (อาภากร, 2554) พบได้ทั้งในถั่วลิสงปน และถั่วลิสงแห้ง (ชาครียา และสุนันทา, 2555) เชื้อราที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงมักเป็นเชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. เช่น *A. flavus* *A. niger* และ *A. clavatus* (Shukla et al., 2009) เชื้อรา *A. flavus* จะสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxins) ชนิด บี 1 บี 2 จี 1 และจี 2 โดยส่วนใหญ่แล้วจะพบอะฟลาทอกซินบี 1 มากที่สุด เป็นชนิดที่มีความเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็งรุนแรงที่สุด (นพดล และเพชรรัตน์, 2552) ก่อให้เกิดโรคมะเร็งในคนและสัตว์ สารพิษชนิดนี้จะสะสมอยู่ภายในตับทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ และยังพบว่ามีส่วนในการทำลายระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อน เช่น ไวรัสตับอักเสบบี (Ding et al., 2012) การแก้ปัญหาในพืชผลทางการเกษตรทำได้โดยการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicides) ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วได้ผลดี มักจะได้ผลในระยะแรกเนื่องจากเชื้อสามารถปรับตัวเกิดการดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมเชื้อราชนิดนี้ จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถควบคุมได้ ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าสามารถนำมาใช้ในการ

ป้องกันเชื้อราได้ และสามารถพัฒนาเพื่อจำหน่ายทางการค้าได้ (บุษราคัม และคณะ, 2555) มีรายงานการใช้แบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Actinomyces* sp. *Pseudomonas* sp. *Bacillus* sp. และ *Serratia* sp. เป็นต้น เพื่อใช้ผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น β -1, 3-glucanase cellulase protease chitinase และ pafugin เป็นต้น (Kaur *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009) เมื่อพิจารณาแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งเหล่านี้ พบว่ามีศักยภาพในการนำไปใช้ผลิตสารยับยั้งเชื้อราและใช้เป็นเชื้อควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชได้ และที่สำคัญคือ ไม่เกิดสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรค *A. flavus* รวมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งเชื้อรา และเพื่อเป็นแนวทางในการนำสารยับยั้งเชื้อราไปประยุกต์ใช้ทางการค้าในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างดินที่นำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ตัวอย่างดินจำนวน 5 แหล่ง ได้แก่ ดินนาข้าวหมู่บ้านตะแบกงาม หมู่บ้านหนองโพธิ์ และหมู่บ้านหนองโสน ดินปุ๋ยหมักหมู่บ้านหนองโสน และดินมูลไส้เดือนฝอยหมู่บ้านหนองโสน ในพื้นที่ตำบลห้วยหมอนทอง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม กำหนดจุดเก็บตัวอย่าง 3 จุดต่อ 1 แหล่งพื้นที่ โดยการเก็บตัวอย่างดินบริเวณผิวหน้าดินที่มีความลึกประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำมารวมกันแล้วบดดินให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยโกร่งที่สะอาด ใส่ดินในภาชนะที่มีฝาปิด นำไปทดสอบทันทีหรือเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. เชื้อก่อโรค

เชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม เตรียมโดยนำเชื้อรา *A. flavus* ที่เก็บบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มา sub culture บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน

3. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินจาก 5 แหล่ง ๆ ละ 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำ serial dilution เลือกกระดบความเจือจางที่ 10^{-2} ถึง 10^{-4} ทำการ spread plate บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak plate บนอาหาร NA

4. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ด้วยวิธี dual culture (ดัดแปลงจากวิธีของ ปวีณา และคณะ, 2555)

เพาะเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน และเพาะแบคทีเรียในอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cork borer เจาะเชื้อราไปวางบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหารเพาะเลี้ยง 2.5 เซนติเมตร พร้อมทั้งขีดเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเพาะเลี้ยงในแนวตรงข้ามเชื้อรา และห่างจากขอบจานอาหาร 2.5 เซนติเมตร โดยในแต่ละไอโซเลททำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยวัดความยาวรัศมีของเชื้อรา

เปรียบเทียบกับจานอาหารที่ไม่ปลูกเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (control) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA โดยการเชื่อมื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูก ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม นาน 16-18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเซลล์ OD 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 เติมห่วงเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับค่า pH ระดับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ นำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (บัวสาย และคณะ, 2555) ปั่นแยกเซลล์ที่ 7826 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำ culture supernatant มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* ด้วยวิธี dual culture โดยคัดเลือกอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งมากที่สุดเพื่อนำไปศึกษาทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อไป

6. การผลิตและทดสอบสารยับยั้งเชื้อรา

6.1 การเตรียมสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบ

ทำตามวิธีข้อ 5 เก็บส่วนใสที่ได้มารองด้วย filter membrane ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร ทดสอบประสิทธิภาพของสารใน culture supernatant ด้วยวิธี dual culture

6.2 การเตรียมเชื้อราทดสอบ

นำเชื้อราที่เพาะไว้มาตัดด้วย cork borer โดยตัดเส้นใยที่บริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา พร้อมทั้งวุ้นอาหารออกเป็นชิ้นกลม นำไปปลูกตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 วัน

6.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus*

6.3.1 การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี dual culture โดยใช้ cork borer ตัดเส้นใยที่บริเวณขอบโคโลนีเชื้อราออกเป็นชิ้นกลม นำไปปลูกในจานอาหาร PDA โดยมีระยะห่างจากจุดกึ่งกลางจานอาหาร 2.5 เซนติเมตร พร้อมทั้งซิดสารยับยั้งเชื้อรา (culture supernatant) ที่ทดสอบบนจานอาหารเพาะเลี้ยงในแนวตรงข้ามเชื้อรา และห่างจากขอบจานอาหาร 2.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับจานอาหารที่ไม่ปลูกเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (control)

6.3.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี poisoned food นำสารยับยั้งเชื้อรา (culture supernatant) ที่ทดสอบจากข้อ 6.3.1 มาทำการเจือจาง 5 ระดับ ได้แก่ 6.25 12.50 25.00 50.00 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นผสมลงในอาหาร PDA อัตราส่วนสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบ 5 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 15 มิลลิลิตรต่อจาน ด้วยวิธี pour plate หมุนวนจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปมา ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งเจาะตัดจากโคโลนี อายุ 5 วัน วางตรงกลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้อาหาร PDA ที่ไม่ได้ผสมสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจสอบสังเกตลักษณะโครงสร้างของเชื้อราด้วยวิธี direct microscopic ซึ่งทำได้โดยเขี่ยเชื้อราที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ มาทำ wet mount บนสไลด์ และวัดการเจริญของเส้นใย โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางแล้วคำนวณหา

ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (percent inhibition of radial growth : PIRG) (หลุทัย และพรอนันต์, 2557) ดังนี้

$$\text{PIRG} = \frac{(R1-R2) \times 100}{R1}$$

R1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

โดยประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งจากค่า PIRG ดังนี้

> 80.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูงมาก

> 61.00-79.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูง

> 51.00-60.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับปานกลาง

< 50.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับต่ำ

7. ศึกษาแนวทางในการประยุกต์ใช้สารยับยั้งเชื้อราทดสอบในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดถั่วลิสง

7.1 การเตรียมเมล็ดถั่วลิสงดิบ

นำเมล็ดถั่วลิสงดิบใส่ลงในบีกเกอร์ปราศจากเชื้อประมาณ 20 เมล็ดต่อบีกเกอร์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยตู้อบลมร้อน จากนั้นนำเมล็ดถั่วลิสงออกมาพักให้เย็น

7.2 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

นำเชื้อรา *A. flavus* มาเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้ส่วนของสปอร์มาทำเป็นเซลล์แขวนลอย โดยล้างด้วย tween 80 ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อให้ทั่วผิวน้ำของเชื้อรา จากนั้นใช้ loop ที่เผาฆ่าเชื้อแล้วขูดผิวหน้าของอาหารให้สปอร์แขวนลอยในน้ำ กรองสปอร์ด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเพื่อให้สปอร์ของเชื้อราแขวนลอยในน้ำ นำสารแขวนลอยที่ได้ไปตรวจนับด้วยเครื่อง hemacytometer แล้วเจือจางเพื่อให้ได้สปอร์เริ่มต้นที่ 6.5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดัดแปลงจากวิธีของ เดชาวุฒิ และคณะ (2558)

7.3 การควบคุมการเจริญของ *A. flavus* บนเมล็ดถั่วลิสง

นำเมล็ดถั่วลิสงจากข้อ 7.1 มาจุ่มลงในสารยับยั้งเชื้อราทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100 50.00 25.00 12.50 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมทุกเมล็ดเป็นเวลา 1 นาที ทดสอบ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และชุดควบคุมผลบวก โดยใช้ยาปฏิชีวนะคิโตโนโซลความเข้มข้น 40 พีพีเอ็ม จากบริษัท biolab ประเทศไทย จากนั้นเติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่ 6.5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร คลุกด้วยปากคืบ ให้ทั่วทุกเมล็ด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลทุกวันโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

8. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

นำเชื้อ unknown ที่ได้นาย้อมสีแบบแกรม และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ศึกษารูปร่าง ลักษณะ และคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นทดสอบด้วยวิธีการทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase coagulase oxidase และการทดสอบการสร้าง indole เป็นต้น (ชมพูนุท, 2558)

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป R (<http://cran.r-project.org/bin/window/base/>) SPSS version 3.5.0 (Venables *et al.*, 2009) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) พร้อมทั้งคำนวณค่าความถี่ ร้อยละ และค่าเฉลี่ย โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (อภิพันธ์, 2561)

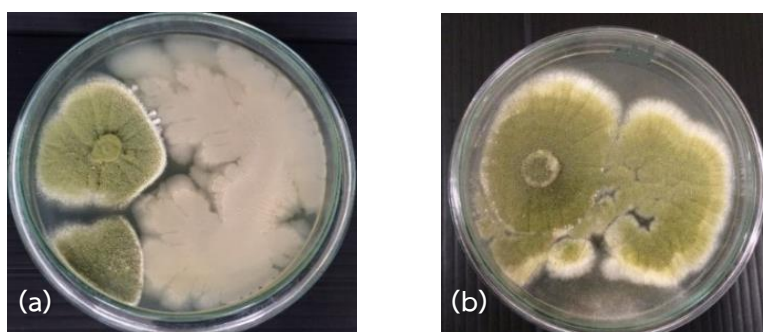
ผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดิน

จากตัวอย่างดินทั้งหมดจำนวน 5 แหล่ง ในเขตตำบลห้วยหมอนทอง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ทั้งหมด 48 ไอโซเลท

2. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ด้วยวิธี dual culture

จากการคัดแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา พบว่า มีเพียง 5 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ได้ ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท IKPS 4 IKPS 27 IKPS 36 IKPS 42 และ IKPS 46 โดยไอโซเลท IKPS 4 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดเท่ากับ 56.67 ± 8.819 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ IKPS 36 IKPS 46 IKPS 27 และ IKPS 42 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* เท่ากับ 38.33 ± 1.667 23.33 ± 12.019 20.00 ± 11.547 และ 13.33 ± 8.819 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ดังภาพที่ 1 และตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ด้วยวิธี dual culture (a) ขูดทดสอบ (b) ขูดควบคุม

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรีย และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus*
บนอาหาร PDA ด้วยวิธี dual culture

ตัวอย่างดิน	จำนวน ไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท ที่ยับยั้ง <i>A. flavus</i>	รหัสไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>A. flavus</i> (%)
นาข้าว	11	1	IKPS 4	56.67±8.819 ^b
นาข้าว	11	0	-	-
นาข้าว	14	2	IKPS 27	20.00±1.547 ^a
			IKPS 36	38.33±1.667 ^{ab}
ปุ๋ยหมัก	8	1	IKPS 42	13.33±8.819 ^a
มูลไส้เดือนฝอย	4	1	IKPS 46	23.33±12.019 ^a
control				100±0.00 ^c

หมายเหตุ: control คือ เชื้อราทดสอบ

ตัวอักษรในคอลัมน์ที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH ระดับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 บ่มนาน 96 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า pH 7.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสูงสุด เท่ากับ 56.00±2.309 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH 8.0 6.0 5.0 และ 4.0 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราเท่ากับ 52.00±0.000 48.67±4.667 46.47±8.819 และ 44.67±12.347 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบด้วยวิธี Poisoned Food

จากการทดสอบสารยับยั้งเชื้อราไอโซเลท IKPS 4 ในอาหาร PDA ที่ 5 ระดับความเข้มข้น พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูงสุดเท่ากับ 65.01±15.28 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 50.00 25.00 12.50 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 และ ภาพที่ 2 เมื่อตรวจสอบลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* เทียบกับชุดควบคุม พบว่าเส้นใยที่เจริญบนอาหารที่ผสมสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบ มีลักษณะผิดปกติ มีขนาดความกว้างและความยาวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เจริญในอาหารที่ไม่ผสมสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบ ดังภาพที่ 3 เมื่อนำผลการทดสอบมาเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบแต่ละระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

5. การศึกษาแนวทางในการประยุกต์ใช้สารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดถั่วลิสง

ภายหลังจากใส่สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราเริ่มต้นที่ 6.5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ในระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้น ตั้งแต่วันที่ 4 เริ่มจะมีเชื้อราเจริญขึ้นบนเมล็ดถั่วลิสง บางเมล็ด ส่วนที่ระดับความเข้มข้นที่ 25.00 และ 12.50 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้เพียงระยะเวลา 2 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่น) จะมีเชื้อราเจริญบนเมล็ดถั่วลิสงตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลอง

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบของไอโซเลท IKPS 4 ในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	ค่า pH	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา <i>A. flavus</i> (%)
25	4.0	22.45±10.333 ^{ab}
	5.0	26.40±9.820 ^a
	6.0	34.54±7.442 ^a
	7.0	39.54±5.312 ^{ab}
	8.0	36.89±3.897 ^a
30	4.0	44.67±12.347 ^a
	5.0	46.67±8.819 ^a
	6.0	48.67±4.667 ^a
	7.0	56.00±2.309 ^a
	8.0	52.00±0.00 ^a
35	4.0	24.63±13.214 ^{ab}
	5.0	30.65±10.325 ^a
	6.0	37.86±8.602 ^a
	7.0	43.76±5.211 ^a
	8.0	41.65±2.541 ^a

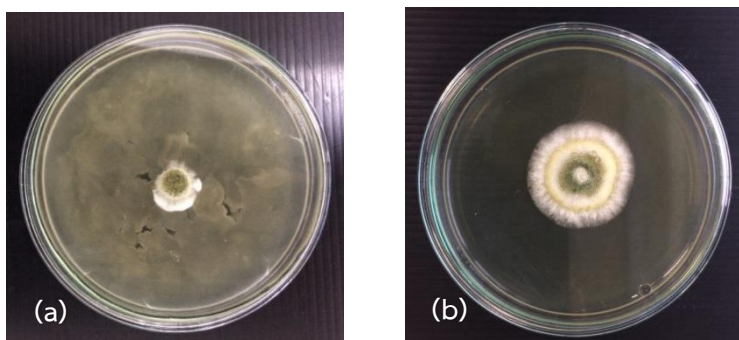
หมายเหตุ: ตัวอักษรในคอลัมน์ที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบ ในอาหาร PDA ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ด้วยวิธี poison food technique บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน

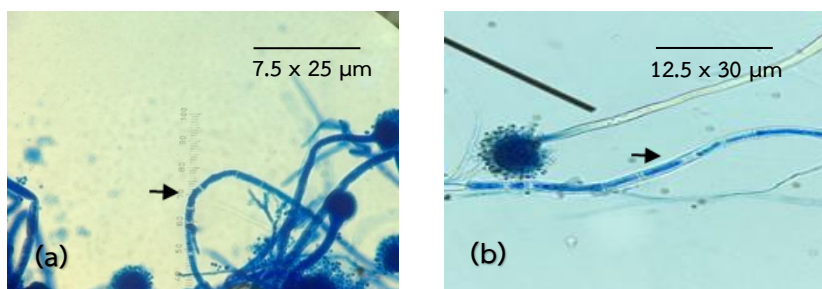
ระดับความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย
	ค่าเฉลี่ย PIRG (%)
control	100.00 ± 8.82^d
100	65.01 ± 15.28^c
50.00	45.51 ± 11.67^c
25.00	31.88 ± 20.00^b
12.50	16.09 ± 23.33^b
6.25	16.40 ± 3.33^a

หมายเหตุ: control คือ ยาปฏิชีวนะคีโตนาโซล

ตัวอักษรในคอลัมน์ที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหาร PDA ด้วยวิธี poison food technique เป็นเวลา 3 วัน (a) อาหารที่ผสมสารยับยั้งเชื้อรา (b) อาหารที่ไม่ผสมสารยับยั้งเชื้อรา



ภาพที่ 3 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า (a) เส้นใยที่ทดสอบด้วยสารยับยั้งเชื้อรา (b) เส้นใยปกติ

6. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท IKPS 4 พบว่า โคโลนีมีสีขาวใส รูปร่างนูน เยิ้ม ยืด ขอบหยัก ผิวหน้าด้าน เมื่อย้อมสีแบบแกรม พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการสร้างเอนโดสปอร์ การทดสอบทางชีวเคมี พบว่า nitrate of citrate catalase test ให้ผลเป็นบวก การทดสอบการใช้น้ำตาล พบว่า สามารถเจริญได้ในอาหารทดสอบน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และมอลโทส ดังตารางที่ 4 จากคุณสมบัติดังกล่าว สามารถระบุว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* sp.

ตารางที่ 4 การจำแนกและพิสูจน์ชนิดของแบคทีเรีย

ลักษณะชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Motile	-
TSI	-
Indole	-
MR-VP	-
Citrate	+
OF	+
Nitrate	+
Catalase test	+
Glucose	+
Galactose	-
Fructose	-
Maltose	+
Mannitol	-
Mannose	-
Sucrose	+

หมายเหตุ: + คือ Positive, - คือ Negative

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาค้นคว้านี้ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินได้ทั้งหมด 48 ไอโซเลท เนื่องจากดินเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะความลึกของดินเกี่ยวข้องกับปริมาณอินทรีย์วัตถุ ความชื้น ปริมาณออกซิเจนในดิน ซึ่งตามปกติแบคทีเรียจะมีประชากรหนาแน่นที่สุดในดินชั้นบน 0-25 เซนติเมตร (พุกษา, 2561) การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ด้วยวิธี dual culture พบว่า มีเพียง 5 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ คือ ไอโซเลท IKPS 4 IKPS 27 IKPS 36 IKPS 42 และ IKPS 46 โดยไอโซเลท IKPS 4 สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุดเท่ากับ 56.67 ± 8.819 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของบัวสาย และคณะ (2555) ที่ได้ทำการศึกษาการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช โดย

คัดแยกแบคทีเรียได้ 50 ไอโซเลท จากดิน 10 ตัวอย่าง เบื้องต้นทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช 12 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลท สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชได้น้อย 1 สายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากในดินมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบคือที่ค่า pH 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 65.01 ± 15.28 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลทำให้เส้นใยเชื้อราเล็ก สิบ ผิดรูปไป สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ajay *et al.* (2008), Vaishali *et al.* (2004) และ Vijayakshmi *et al.* (2011) ที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* spp. ในการผลิตสารยับยั้ง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และค่า pH ที่ระดับ 5.0-8.0 และสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิไลวรรณ (2560) ที่ได้ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการละลายฟอสเฟต พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงที่สุด และปริมาณความเข้มข้นของสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนเมล็ดถั่วลิสงได้นาน 3 วัน และเมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาจำแนกลักษณะชีวเคมี พบว่า เป็นเชื้อในจีนัส *Bacillus* sp. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ขวเลิศ และคณะ (2559) ที่ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคและสารพิษจากเชื้อรา พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* หรือ *B. amyloliquefaciens* ที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าของเงาะและผลิตเป็นชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวได้ แบคทีเรีย *B. tequilensis* และ *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* ควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และยับยั้งการสร้างสารอะฟลาท็อกซินในผลิตผลเงาะ โดยกลไกการยับยั้งของสารเกิดจากการย่อยสลาย β -1,3-glucan และ chitin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา (Li *et al.*, 2008)

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 48 ไอโซเลท นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วย dual culture technique พบว่า มีเพียง 5 ไอโซเลท ได้แก่ IKPS 4 IKPS 27 IKPS 36 IKPS 42 และ IKPS 46 ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ โดยไอโซเลท IKPS 4 ยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดเท่ากับ 56.67 ± 8.819 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาจัดจำแนกลักษณะชีวเคมี พบว่า เป็นจีนัส *Bacillus* สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรค พบว่า ค่า pH 7.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะเหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุด นำมาปรับระดับความเข้มข้น 5 ระดับ พบว่าที่ 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพดีที่สุดเท่ากับ 65.01 ± 15.28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า เส้นใยมีขนาดเล็กและสั้นกว่าเส้นใยปกติ จากนั้นนำสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบมาควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนเมล็ดถั่วลิสง พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดในระยะเวลา 3 วัน การวิจัยนี้เป็นการใช้ culture supernatant ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ซึ่งจะต้องมีการทำบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างและสมบัติของสารที่เชื้อผลิตขึ้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทำปฐพีและศึกษาโครงสร้างและสมบัติของสารที่เชื้อผลิตขึ้นต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราทดสอบ *A. flavus* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

เอกสารอ้างอิง

- ชมพู พุท กักดีเจริญ. (2558). Bacterial Identification. *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม*, 22(2), 15-18.
- ขวเลิศ ตรีภรณ์สวัสดิ์ เนตรา สมบูรณ์แก้ว ศุภรา อัคระสาระกุล สุพี วนศิริกุล ชุตินา วิฐุจัตต์ อัจฉราพร ศรีจุฑาณู อารีรัตน์ การุณสถิตชัย และวีรภรณ์ เดชนาบุญชาชัย. (2559). *การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หลังการเก็บเกี่ยว*. รายงานโครงการวิจัย คลังผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร.
- ชาคริยา ฉลาด และสุนันทา ช้องสาย. (2555). จุลินทรีย์และสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารที่จำหน่ายในจังหวัดตรัง. *วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*, 4(2), 56-69.
- เดชาวุฒิ วานิชสรรพ นิทัศน์ นิลฉวี ทวีศักดิ์ รัตนคม และพรณนิการ์ กงจักร. (2558). ขั้นตอนวิธีนับจำนวนเชื้อบนแผ่นฮีโมซิโตมิเตอร์ด้วยเทคนิคประมวลผลภาพและดีพีสแกน. *วารสารเทคโนโลยีสารสนเทศ*, 11(2), 56-61.
- นพดล มีมาก และเพชรรัตน์ ศักดินันท์. (2552). อะฟลาทอกซินในอาหารโคนมจากภาคตะวันตกของประเทศไทย. *วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*, 1(1), 20-26.
- บุษราคัม อุดมศักดิ์ สุรีย์พร บัวอาจ ญัฐธิดา โฆสิตเจริญกุล และอมรรัตน์ ภูไพบูลย์. (2556). การคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica*. ใน *กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555*, หน้า 855-898. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- บัวสาย เพชรสุริยวงศ์ นงพงา คุณจักร และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. (2555). การแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา. ใน *การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 50 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: สาขาวิทยาศาสตร์, สาขาทฤษฎีเกษตรกรรมชาติและสิ่งแวดล้อม* (หน้า 124-131). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปวีณา สังข์แก้ว เสมอใจ ชื่นจิตต์ และวสันต์ เพชรรัตน์. (2555). การคัดเลือกและเตรียมสูตรสำเร็จเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* เพื่อควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 43(2)(ฉบับพิเศษ), 21-24.
- พฤกษา หล้าวงษา. (2561). *จุลินทรีย์ในดิน : แบคทีเรีย*. สืบค้นเมื่อ 9 สิงหาคม 2561, จาก: <https://ag.kku.ac.th/land/File%20cours/1503593761005601.pdf>.

- วิไลวรรณ ไชยสร. (2560). การคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการละลายฟอสเฟต. *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 36(2), 11-24.
- หฤทัย ไทยสุชาติ และพรอนันต์ บุญก่อน. (2557). การควบคุมเชื้อราปนเปื้อนในกระเทียมด้วยสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพห้องทดลอง. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.*, 42(4), 771-780.
- อทิพันธ์ เสียมไหม ฌานิกา แซ่แง ชุกลิ้น ปวีณา ดิกิจ และนฤมล มีบุญ. (2561). การประยุกต์ใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว. *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 37(ฉบับพิเศษ), 39-53.
- อาภากร ศิลป์ประเสริฐ. (2554). *ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมเชื้อรา Aspergillus flavus*. วิทยาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
- Ajay, K., Pragati, S. and Shrivastava. (2009). Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Experimental Biology*, 47(1), 57-62.
- Ding, X., Li, P., Bai, Y. and Zhou, H. (2012). Aflatoxin B-1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China. *Food Control*, 23(1), 143-148.
- Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., kaur, G.S. and Saini, H.S. (2007). Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(2), 1-8.
- Li, L.B., Zhang, C.Y., Li, S.N., Li, J., Guo, X.J. and Zhu, B.C. (2008). Isolation and identification of the antagonistic bacterial strain 8-59 against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Agriculture University of Hebei*, 31(3), 64-68.
- Shukla S., Saluja, A.K. and Pandya, S.S. (2009). Antioxidant activity and free radical scavenging potential of *Gmelina arborea* Linn. *Pharmacologyonline*, 1, 1035-1043.
- Vaishalij, P., Sachin, R.T. and Bharat, B.C. (2004). Bioprocess development for the production of an antifungal molecule by *Bacillus licheniformis* BC98. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(4), 231-235.
- Venables, W.N., Smith, D.M. and The R Core Team. (2009). *A introduction to R, Notes on R: A programming environment for data analysis and graphics version 3.5.0*. Retrieved 23 April 2018, from: <https://cran.r-project.org>.
- Vijayakshmi, K., Premalatha, A. and Suseela, R.G. (2011). Antimicrobial protein production by *Bacillus amyloliquefaciens* MBL27: Optimization of culture conditions using Taguchi's experimental design. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(8), 931-937.

Wang, S., Xin, F., Liu, X., Wang, Y., An, Z., Qi, Q. and Wang, P.G. (2009). N-terminal deletion of peptide: N-glycanase results in enhanced deglycosylation activity. *PLOS One*, 4(12), 1-16.