บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การศึกษา การแยกเชื้อสาเหตุโรค และทดสอบความสามารถของเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า โรคเหี่ยวเหลือง และโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ

ทำการศึกษาลักษณะอาการจากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคทางดินที่เก็บตัวอย่างมาจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่โครงการขยายผลโครงการหลวงสบโขง ตำบลสบโขง อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ ทำการศึกษาลักษณะอาการและบันทึกรายละเอียดของโรค

3.1.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรค และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศ

นำตัวอย่างของโรคมาทำการแยกเชื้อโดยวิธีต่างๆดังนี้

3.1.1.1 วิธีแยกเชื้อจากชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการของโรคภายในสภาพกล่องที่มีความชื้นสูง (moist chamber)

นำตัวอย่างต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคทางดินมาตัดบริเวณโคนต้นเหนือดิน ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง และล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปวางในกล่องความชื้นซึ่งภายในมีสำลี ซึ่งเทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปให้พอชุ่ม ปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง นำเส้นใยของเชื้อที่เจริญออกมจากแผล มาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยขอบโคโลนีมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และเก็บไว้ศึกษาต่อไป

3.1.1.2 วิธีการแยกชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการของโรคโดยวิธี tissue transplanting method

นำตัวอย่างต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคทางดินมาตัดบริเวณโคนต้นเหนือดิน มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 2x2 มิลลิเมตร โดยตัดบริเวณริมแผลตรงรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นแผลและส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อปกติ จากนั้นนำมาแช่ด้วย clorox 10% นาน 3 นาที แล้วนำไปวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งมีการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเกิดขึ้นบริเวณรอบชิ้นส่วนพืช จึงย้ายเชื้อราดังกล่าวลงบนอาหาร PDA จานใหม่ 1-2 ครั้ง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.1.3 วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยวิธี Streak Plate

นำตัวอย่างต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคทางดินมาตัดบริเวณโคนต้นเหนือดิน ใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดตามขวางของลำต้น ล้างชิ้นส่วนพืชใน clorox 10% นาน 2-5 นาที ขึ้นอยู่กับความหนาของชิ้นพืช ล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง แล้ววางชิ้นส่วนพืชในหยดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และทำให้เนื้อเยื่อพืชแตกโดยการบดหรือใช้มีดสับให้ละเอียดทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้เชื้อออกมาในน้ำ แล้วใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วมาแตะของเหลวที่ได้จากการบด มาทำการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TZC หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่ 25 – 28 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง และทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

หลังจากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรคต่าง ๆที่แยกได้ มาทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจดูลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สำหรับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่แยกได้ ทำการศึกษาลักษณะการเจริญ สีของโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษารูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัวของเซลล์ และการติดสี โดยการย้อมสีแบบแกรม แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ก)

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test) ของเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมต้นมะเขือเทศ โดยการเพาะจากเมล็ด และเตรียมเชื้อรา *S. rolfsii* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่แยกได้จากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรค โดยนำเอา mycelial disc ของเชื้อราสาเหตุโรคที่เจาะด้วย cork borer มาเลี้ยงเชื้อบนข้าวฟ่าง บ่มเชื้อไว้ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราสาเหตุโรคทำการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนต้นกล้ามะเขือเทศ โดยการคลุกเมล็ดข้าวฟ่างลงบนบริเวณโคนต้น จากนั้นนำไปบรรจุในถุงพลาสติกในสภาพที่มีความชื้นสูง แล้วทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกระยะการเกิดโรค และลักษณะอาการของโรค

สำหรับการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยนำ suspension ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งทำการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ (O.D.) ให้ได้ 1.0 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 8 x 10^8 cfu/ml จากนั้นราดลงบริเวณโคนต้นกล้ามะเขือเทศ จากนั้นนำไปบรรจุในถุงพลาสติกในสภาพที่มีความชื้นสูง แล้วทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกระยะการเกิดโรค และทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ด้วยชุดตรวจสอบ Agristrip ของบริษัท BIOREBA, Switzerland โดยนำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบหยดลงใน cuvette 1 หยด จากนั้นเติม extraction buffer ลงไป 3 หยด แล้ววางแถบทดสอบลงใน cuvette นาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10-15 นาที แล้วสังเกตแถบสีที่เกิดขึ้น ผลบวกจะเกิดแถบสีแดงสองเส้น ผลลบจะเกิดแถบสีแดงหนึ่งเส้น

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทางดินในสภาพห้องปฏิบัติการ

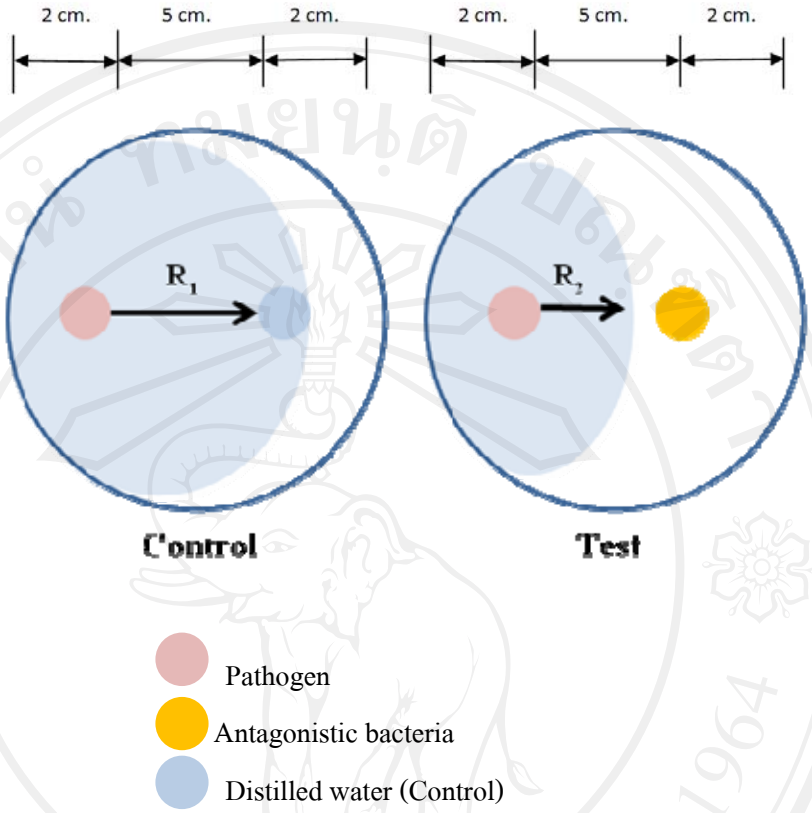
3.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากพริกกะเหรี่ยงและมะเขือเทศ

แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบรากมะเขือเทศ และพริกกะเหรี่ยงทำการแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี soil dilution plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เริ่มจากการนำดินที่ต้องการแยกเชื้อมาจำนวน 1 กรัม ใส่ลงใน tube ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ดินกระจายตัว ต่อจากนั้นทิ้งสารแขวนลอยของดินให้ตกตะกอนแล้วจึงใช้ pipette ดูดมา 1 มิลลิลิตร นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร อีกครั้ง เขย่าให้เข้ากัน แล้วเจือจางต่อไปแบบเดิม แล้วนำระดับความเข้มข้นที่ 10^{-4}, 10^{-5} มา 0.1 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยดินไปเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ที่เตรียมไว้ด้วยวิธี spread plate บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน รอจนกระทั่งมีเชื้อแบคทีเรียเจริญออกมา ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โคโลนีเดี่ยว ๆ โดยนำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ เพื่อเก็บไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อสาเหตุโรค

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก stock culture ในข้อ 3.2.1 ที่เตรียมไว้มาทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค เริ่มจากการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก stock culture เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบร่วมกับเชื้อสาเหตุโรค โดยเชื้อราสาเหตุโรคทำการทดสอบด้วยวิธี Dual culture เริ่มจากใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคบริเวณขอบโคโลนีวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.0 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แตะลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆ แล้วนำมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในด้านตรงข้ามกับเชื้อราสาเหตุโรค โดยเว้นระยะห่างจากขอบจานอาหาร 2.0 เซนติเมตร สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น (ภาพ 1) วางแผนการทดลองแบบ LSD (Least Significant Difference)โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลเมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนมีรัศมี 5 เซนติเมตร โดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุในชุดควบคุมและชุดทดสอบ และนำข้อมูลที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี Dual Culture

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG) $= \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

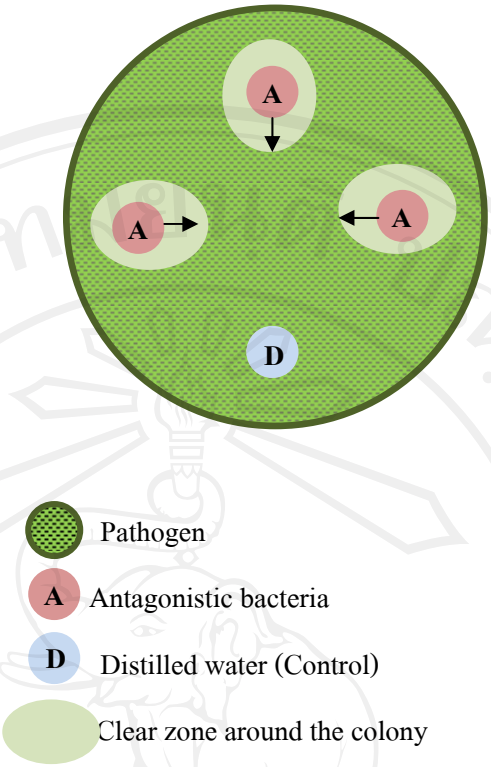
R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth; PIRG) ตามสูตร (Tronsmo, 1992) ดังภาพ 1

สำหรับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ทำการทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion เริ่มแรกเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยการใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* อายุ 24-48 ชั่วโมง แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดเชื้อแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าอาหารเบา ๆ แล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ (O.D.) ให้ได้ 1.0 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 8 x 10^8 cfu/ml จากนั้นใช้สารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่หลอมไว้แล้ว ผสมเชื้อและอาหารให้เข้ากัน แล้วเททับลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เทอาหาร NA ทิ้งไว้ รอจนอาหารเย็นและแข็งตัว แล้วจึงนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบนผิวหน้าอาหาร จำนวน 4 ชิ้น ต่อ 1 จาน หยด suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนกระดาษกรองชิ้นละ 20 µl ในแต่ละไอโซเลท โดยในชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อหยดแทน (ภาพ2) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการบันทึกผล โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผ่นกระดาษกรองรวมบริเวณใส (clear zone) ทั้งแนวตั้งและแนวนอนของการทดสอบในแต่ละไอโซเลท นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความกว้างบริเวณใส ดังภาพ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยวิธี Disc Diffusion

คำนวณหาความกว้างบริเวณใสโดย

$$\text{ความกว้างของบริเวณใส (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางกระดาษกรองรวมบริเวณใส (มิลลิเมตร)} - \text{ความกว้างของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์}}{2}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

3.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆ มาทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี ในการผลิตเอนไซม์ 6 ชนิด คือ เซลลูเลส (cellulase), ฟอสฟาเตส (Phosphatase), ไคติเนส (Chitinase), อะไมเลส (Amylase), ยูรีเอส (Urease) และแคตาเลส (Catalase) โดยการศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลต่อสารเคมีที่เติมลงในอาหาร (ภาคผนวก ก) ทำการทดสอบโดยการนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรแตะกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ แล้วนำไปวางบนผิวหน้าอาหารร่วมกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นบนอาหารทดสอบแต่ละชนิด และทำการบันทึกผลโดยการตรวจดู clear zone ที่เกิดขึ้นของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท สำหรับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส ทำการตรวจสอบโดยดูการเกิดฟองก๊าซ ดังนี้

3.3.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการทดสอบบนอาหาร Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC) (ภาคผนวก ก) แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบโดยวิธี congo red test พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้จะปรากฏผลของการเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

3.3.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตส

ทำการทดสอบบนอาหาร Czapek's medium (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้จะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

3.3.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

ทำการทดสอบบนอาหาร Colloidal Chitin Agar (CCA) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้จะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ทำการทดสอบบนอาหาร starch agar (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้จะสร้างวงใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

3.3.1.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

ทำการทดสอบบนอาหารวุ้นเอียง urea agar (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้อาหารจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น

3.3.1.6 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส

ทำการทดสอบโดยการ หยด H_2O_2 ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทลงไป ทำการผสมให้เข้ากัน จะพบการเกิดฟองก๊าซในแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ (ภาคผนวก ค)

3.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดีจำนวน 5 ไอโซเลทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร NA และศึกษารูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัวของเซลล์และการติดสี โดยการย้อมสีแบบแกรม แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีการย้อมสีแบบแกรม (gram's stain) เริ่มจากทำความสะอาดสไลด์ เช็ดให้แห้ง แล้ว smear โคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ loop จุ่มน้ำแตะลงบนสไลด์ 1-2 loop แล้วใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อมาเพียงเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำ แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายออกเป็นวงเล็ก ๆ ทิ้งให้แห้ง จากนั้นทำการตรึง (fixing of the smear) เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียติดแน่นกับสไลด์ โดยการนำสไลด์ลนผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง แล้วหยดสี crystal violet ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยแอลกอฮอล์ 95% นาน 15 วินาที ล้างผ่านน้ำไหลเบา ๆ หยดสี safranin O ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจดูกล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ก) ตรวจดูลักษณะการติดสีแบบแกรม รูปร่าง การเรียงตัวของแบคทีเรีย

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดีจำนวน 5 ไอโซเลทที่คัดเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ

3.4.1 การเตรียมเมล็ดมะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ลูกผสมทับทิมแดง ของบริษัท เพื่อนเกษตรกร จำกัด มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิว แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง นำไปผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที

3.4.2 การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร NA ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในจานอาหาร 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเบาๆ แล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้แบคทีเรียประมาณ 8×10^8 cfu/ml ของแต่ละไอโซเลท

3.4.3 การทดสอบการงอกของเมล็ดมะเขือเทศบนกระดาษชื้น

นำเมล็ดมะเขือเทศที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่ในสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อ ก่อนนำไปเพาะในกระดาษชื้น (blotter method) โดยนำเมล็ดมะเขือเทศวางบนกระดาษเพาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษกรอง Whatman No.1 จำนวน 1 แผ่น ไว้ด้านบน และกระดาษฟาง 3 แผ่นที่ชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนชุ่มไว้ด้านล่าง วางเมล็ดมะเขือเทศจำนวน 20 เมล็ดต่อจาน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจสอบการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ โดยการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพร้อมทั้งชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์ ประเมินความสามารถของสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค และการทดสอบความมีชีวิตของสารชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้

3.5.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค คือ ไอโซเลท TKC1, TKC7, TKC10 และCMM11 และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดี คือ ไอโซเลท CMM13 มาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์พัฒนาเป็นรูปแบบต่าง ๆ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโดยนำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อใส่ลงไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงแบคทีเรียไว้ 5 มิลลิลิตร แล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มีส่วนประกอบกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 130 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันสำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์แกรมบวก และเขย่าเป็นเวลา 2 วันสำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์แกรมลบ นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ (O.D.) ให้ได้ 1.0 จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปผสมกับส่วนประกอบต่างๆตามสูตรของสารชีวภัณฑ์ในแต่ละรูปแบบ โดยรายละเอียดในการผสมส่วนประกอบต่าง ๆของสารชีวภัณฑ์สำหรับแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร ดังนี้

3.5.1.1 การผลิตสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง (Wettable powder; WP)

สูตรที่ 1 แป้งข้าวโพด 800 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม

สูตรที่ 2 แป้งข้าวเจ้า 800 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม

สูตรที่ 3 Microcrystalline cellulose (MCC) 800 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม

ผลิตโดยนำส่วนผสมในแต่ละสูตรไปทำให้แห้งโดยใช้เตาอบภายใต้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นให้เป็นผงด้วยเครื่อง blender และเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

3.5.1.2 การผลิตสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น (Soluble concentrate; SL) โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร

รูป supernatant

สูตรที่ 1 แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 MCC 50 กรัม tween 20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป cell pellet

สูตรที่ 1 แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 MCC 50 กรัม tween 20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร (ตาราง 3)

ผลิตโดยนำเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm นาน 10 นาที เพื่อแยกแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำแบคทีเรียในรูป supernatant ผสมเข้ากับส่วนผสมตามสูตรรูปแบบ supernatant แล้วเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน สำหรับแบคทีเรียในรูป pellet ทำการ resuspended ด้วย saline (0.75% NaCl) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วผสมกับส่วนผสมในสูตรรูป cell pellet แล้วเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.5.1.3 การผลิตสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบสารละลายน้ำมัน (Emulsifiable concentrate; EC) โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร

สูตรที่ 1 น้ำมันถั่วเหลือง 1 ลิตร ซูโครส 75 กรัม และ tween 20 0.75 มิลลิลิตร

ผลิตโดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเหลวผสมในส่วนผสมตามสูตร แล้วเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน (ตาราง 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 ส่วนประกอบของสูตรชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 5 ไอโซเลท

สูตรสารชีวภัณฑ์			ส่วนประกอบสำหรับแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร
รูปแบบ	**ไอโซเลท**	**ชื่อสูตร**	
ผง	TKC1	T01C	แป้งข้าวโพด 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		T01R	แป้งข้าวเจ้า 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		T01M	Microcrystalline cellulose (MCC) 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
	TKC7	T07C	แป้งข้าวโพด 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		T07R	แป้งข้าวเจ้า 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		T07M	MCC 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
	TKC10	T10C	แป้งข้าวโพด 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		T10R	แป้งข้าวเจ้า 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		T10M	MCC 1000 กรัม น้ำมันพืช 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
	CMM11	C11C	แป้งข้าวโพด 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		C11R	แป้งข้าวเจ้า 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		C11M	MCC 1000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
	CMM13	C13C	แป้งข้าวโพด 1000 กรัม, น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		C13R	แป้งข้าวเจ้า 1000 กรัม, น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
		C13M	MCC 1000 กรัม, น้ำมันถั่วเหลือง 5 มิลลิลิตร และซูโครส 100 กรัม
สารละลายเข้มข้น	TKC1	T01SC	Supernatant : แป้งข้าวโพด 50 กรัม, tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T01SR	Supernatant : แป้งข้าวโพด 50 กรัม, tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T01SM	Supernatant : แป้งข้าวโพด 50 กรัม, tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร

(ต่อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 (ต่อ)ส่วนประกอบของสูตรชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 5 ไอโซเลท

สารชีวภัณฑ์			**ส่วนประกอบสำหรับแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร**
รูปแบบ	**ไอโซเลท**	**ชื่อสูตร**	
สารละลายเข้มข้น	TKC1	T01PC	Cell pellet: แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T01PR	Cell pellet: แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T01PM	Cell pellet: แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
	TKC7	T07SC	Supernatant : แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T07SR	Supernatant : แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T07SM	Supernatant : MCC 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T07PC	Cell pellet: แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T07PR	Cell pellet: แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T07PM	Cell pellet: MCC 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
	TKC10	T10SC	Supernatant : แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T10SR	Supernatant : แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T10SM	Supernatant : MCC 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และเอทานอล 5 มิลลิลิตร

(ต่อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 (ต่อ) ส่วนประกอบของสูตรชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 5 ไอโซเลท

สารชีวภัณฑ์			**ส่วนประกอบสำหรับแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร**
รูปแบบ	**ไอโซเลท**	**ชื่อสูตร**	
		T10PC	Cell pellet: แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T10PR	Cell pellet: แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		T10PM	Cell pellet: MCC 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
สารละลายเข้มข้น	CMM11	C11PC	Cell pellet: แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		C11PR	Cell pellet: แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		C11PM	Cell pellet: MCC 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
	CMM13	C13SC	Supernatant : แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		C13SR	Supernatant : แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		C13SM	Supernatant : MCC 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		C13PC	Cell pellet: แป้งข้าวโพด 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		C13PR	Cell pellet: แป้งข้าวเจ้า 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
		C13PM	Cell pellet: MCC 50 กรัม tween20 8 มิลลิลิตร และ เอทานอล 5 มิลลิลิตร
สารละลายน้ำมัน	TKC1	T01O	น้ำมันถั่วเหลือง 1 ลิตร ซูโครส 75 กรัม และ tween20 0.75 มิลลิลิตร
	TKC7	T07O	น้ำมันถั่วเหลือง 1 ลิตร ซูโครส 75 กรัม และ tween20 0.75 มิลลิลิตร
	TKC10	T10O	น้ำมันถั่วเหลือง 1 ลิตร ซูโครส 75 กรัม และ tween20 0.75 มิลลิลิตร
	CMM11	C11O	น้ำมันถั่วเหลือง 1 ลิตร ซูโครส 75 กรัม และ tween20 0.75 มิลลิลิตร
	CMM13	C13O	น้ำมันถั่วเหลือง 1 ลิตร ซูโครส 75 กรัม และ tween20 0.75 มิลลิลิตร

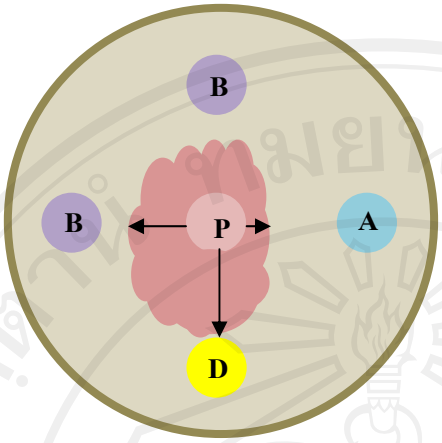
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2 การประเมินความสามารถของสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

นำสารชีวภัณฑ์ในแต่ละสูตรจากข้อ 3.5.1 มาประเมินความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคทำการทดสอบด้วยวิธี Dual culture เริ่มจากใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคบริเวณขอบโคโลนีวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำสารชีวภัณฑ์ในแต่ละรูปแบบ โดยในรูปแบบผง นำมา 0.3 กรัม วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และในรูปแบบสารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันนำมา 30 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.0 เซนติเมตร โดยจะใช้น้ำกลั่น และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชุดควบคุม (ภาพ 3) วางแผนการทดลองแบบ LSD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลเมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนมีรัศมี 2.5 เซนติเมตร โดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุในชุดควบคุมและชุดทดสอบ และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG) ตามสูตร (Tronsmo, 1992) ดังภาพ 3

และสำหรับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ทำการทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลงไปผสมในอาหารเหลว NB จากนั้นเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA ทิ้งไว้จนอาหารเย็นและแข็งตัว จากนั้นนำสารชีวภัณฑ์ในแต่ละรูปแบบ โดยในรูปแบบผงเปียกน้ำนำมา 0.3 กรัม วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และในรูปแบบสารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันใช้ 30 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยจะใช้น้ำกลั่น และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชุดควบคุม (ภาพ 4) วางแผนการทดลองแบบ LSD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการบันทึกผล โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผ่นกระดาษกรองรวมบริเวณใส (clear zone) ทั้งแนวตั้งและแนวนอนของการทดสอบในแต่ละไอโซเลท นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความกว้างบริเวณใส (ภาพ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



P Pathogen

B Bioproduct Formulations

D Distilled water (Control)

A Antagonistic bacteria (Control)

R : Radial growth of pathogenic fungi

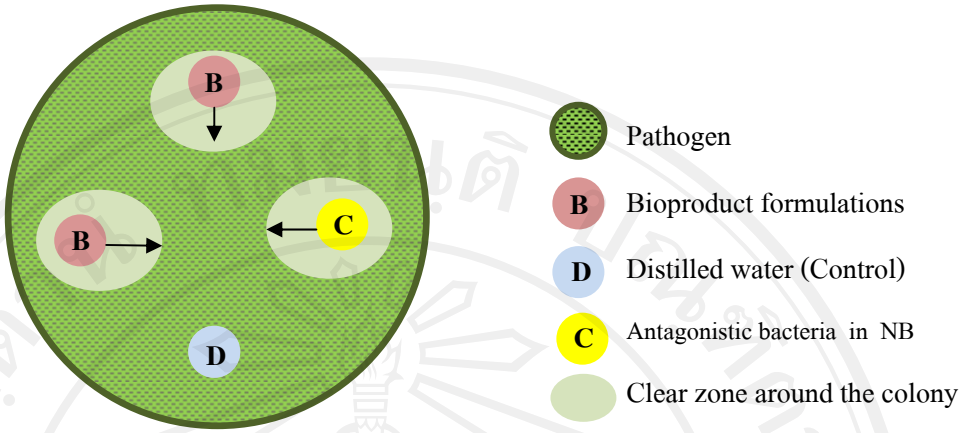
ภาพ 3 ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ของสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี Dual Culture

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG) $= \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ของสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยวิธี Disc Diffusion

คำนวณหาความกว้างบริเวณใสโดย

$$\text{ความกว้างของบริเวณใส (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางกระดาษกรองรวมบริเวณใส (มิลลิเมตร)} - \text{ความกว้างของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์}}{2}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.3 การประเมินความมีชีวิตของสารชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

สารชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้ในรูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC7, TKC10, CMM11 และ CMM13 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง มาทำการทดสอบความมีชีวิต โดยทำการเจือจาง สูตรผง 1 กรัม สูตรสารละลายเข้มข้นและสารละลายน้ำมัน 1 มิลลิลิตร มาเจือจางลงในน้ำ 25 มิลลิลิตร แล้ว streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผล

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง

เริ่มจากการเตรียมต้นกล้ามะเขือเทศ ดินที่ใช้ในการทดลองเป็นดินผสมที่เหมาะกับการปลูกพืช นำไปบรรจุในถุงพลาสติก มัดปากถุงให้แน่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่อดินเย็นตัวลงแล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยการนำเมล็ดมะเขือเทศที่แช่น้ำทิ้งไว้ข้ามคืน มาเพาะลงในถาดเพาะกล้าที่บรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อต้นกล้ามะเขือเทศมีอายุ 20 วัน จึงนำมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการเตรียม inoculums ของเชื้อราสาเหตุโรคโดยทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคมาเลี้ยงเชื้อบนข้าวฟ่าง บ่มเชื้อไว้ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดลอง สำหรับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตรต่อจากอาหาร แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดเชื้อแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าอาหารเบา ๆ แล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งก่อนหน้านี้ได้ปรับให้ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ml เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดลองเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดลอง

หลังจากนั้นนำสารชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค โดยการใช้สารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันทดสอบกับต้นมะเขือเทศในระยะต้นกล้าในเรือนทดลอง การทดลองใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) โดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธี ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมที่ปลูกมะเขือเทศลงในถาดเพาะที่บรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้ออย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 2 ต้นมะเขือเทศที่ราดโคนต้นด้วยส่วนประกอบของส่วนประกอบของสูตรสารชีว ภัณฑ์ที่ไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์

กรรมวิธีที่3 ต้นมะเขือเทศในถาดเพาะที่บรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 4 ต้นมะเขือเทศที่ราดโคนต้นด้วยสูตรสารชีวภัณฑ์ T01R อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 5 ต้นมะเขือเทศที่ราดโคนต้นด้วยสูตรสารชีวภัณฑ์ T01R ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 3 วัน

กรรมวิธีที่ 6 ต้นมะเขือเทศที่ราดโคนต้นด้วยสูตรสารชีวภัณฑ์ T01R หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 3 วัน

นำต้นมะเขือเทศอายุ 30 วันที่ปลูกในถาดเพาะกล้าบรรจุดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วมาทำการทดสอบและประเมินประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ โดยการนำสารชีวภัณฑ์สูตรผง T01R 1 กรัม มาเจือจางลงในน้ำ 25 มิลลิลิตร ทดสอบกับต้นมะเขือเทศโดยหยดสารละลายชีวภัณฑ์ลงไป 2 มิลลิตรต่อหลุม จากนั้นจึงทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค *S. rolfsii* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่เลี้ยงไว้บนเมล็ดข้าวฟ่าง โดยจะใช้ 2 เมล็ดต่อต้น ส่วนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค *R. solanacearum* โดยการหยดสารแขวนลอยของเชื้อปริมาตร 4 มิลลิลิตรต่อต้น ซึ่งต้นมะเขือเทศจะถูกทำแผลที่รากโดยใช้มีดผ่าตัดฆ่าเชื้อแทงลงในดินให้ตัดผ่านราก 4 จุดต่อต้น ในทุกกรรมวิธีเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศชุดควบคุมที่ราดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงนำถาดเพาะไปวางไว้ในถุงพลาสติกที่ภายในใส่น้ำเล็กน้อย มัดปากถุงเพื่อทำเป็น moist chamber หลังจากนั้นสังเกต และบันทึกอาการหลังปลูก ทำการบันทึกข้อมูลความรุนแรงในการเกิดโรค และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ LSD

การวัดค่าความรุนแรงของโรค (Sylvie *et al.,* 2001)

= 1 หมายถึง 0%	ไม่แสดงอาการ (แผลที่โคนต้น หรือเหี่ยว)
= 2 หมายถึง 1-25%	เริ่มแสดงอาการ
= 3 หมายถึง 26-50%	แสดงอาการของโรคชัดเจน
= 4 หมายถึง 51-75%	แสดงอาการของโรครุนแรง
= 5 หมายถึง มากกว่า 75%	แสดงอาการของโรครุนแรงมากจนกระทั่งตาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศ มาจำแนกชนิดและตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซินที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สร้างโดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.7.1 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยชุดทดสอบ API CH 50 kit (API, Bio – Merieux, France) ซึ่งทดสอบการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* และกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Vibrionaceae* โดยอาศัยหลักการทดสอบทางชีวเคมี 50 ชนิดบนอาหารทดสอบ และวิเคราะห์ผลโดยเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

3.7.2 การตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม

3.7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้ NucleoSpin® Tissue เริ่มจากการเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหาร NB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าข้ามคืน 48 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นดูด bacteria suspension 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g นาน 5 นาที เก็บตะกอนและเติมสารละลายบัฟเฟอร์ T1 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และ proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วบ่มไว้ที่ 56 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนจะละลาย หลังจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ B3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมเอทานอล 100% ปริมาตร 210 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วย้าย microcentrifuge tube ลงใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 Xp นาน 1 นาที นำสารละลายที่ไหลผ่านลงมาทิ้ง แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ BW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 Xp นาน 1 นาที นำสารละลายที่ไหลผ่านลงมาทิ้ง แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ B5 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 Xp นาน 1 นาที สารละลายที่ไหลผ่านลงมาทิ้ง หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการย้าย collection tube ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ BE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 Xp นาน 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการตรวจสอบคุณภาพขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel 1 % โดยชั่ง agarose 0.3 กรัม ละลายให้เข้ากันกับ 1X TBE buffer (Tris Borate Buffer) 30 มิลลิลิตร ลงในขวดที่เตรียมไว้ จากนั้นหลอมให้เข้ากันในไมโครเวฟ จากนั้นรอให้เจล (gel) อุ่น แล้วจึงเทเจลลงในถาดเจล (gel tray) ที่เตรียมไว้ เสียบหวี (comb) ที่มีจำนวนช่องตามต้องการลงไปในเจล เพื่อให้เกิดเป็นหลุมเล็ก (well) รอจนเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง จากนั้นนำเจลที่ได้วางลงใน electrophoresis gel tank และเท 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล ผสม loading buffer 2 ไมโครลิตร กับสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน แล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุม (well) ปิดฝาและเปิดสวิตซ์ electrophoresis gel tank ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 20 นาที จากนั้นยอมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 10 นาที นำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

3.7.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วย โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับการตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่สร้างสาร subtilosin sboAFwd (forward primer) (5’ CGCGCAAGTAGTCGATTTCTAACA 3’) และ sboARev (reverse primer) (5’ CGCGCAAGTAGTCGATTTCTAACA 3’) ที่ตำแหน่ง subtilosin ที่พัฒนาโดย Stein *et al*. (2004) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (H_2O)	32.4
5 mM dNTP (2.5 mM each)	6
10X PCR buffer	5
Primer sboAFwd (20 µM)	2
Primer sboARev (20 µM)	2
50 mM $Mgcl_2$	6
Tag DNA polymerase (5 Unit/µl)	1
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี Gradient PCR ในช่วงระหว่าง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่อง Gradient PCR (Bio Rad) โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาดังนี้

initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 30-42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที	

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่อง programmable thermal controller, PTC-100™ (MJ Research) โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาดังนี้

initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที	

จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% agarose gel โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ใน 1X TBE buffer ด้วยเครื่อง electrophoresis gel tank โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imagine System)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved