# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**1. การตรวจและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ติดมากับผลพริกกะเหรี่ยงหลังเก็บเกี่ยว**

นำผลพริกกะเหรี่ยงที่ปลูกจากตำบลสบเมย อำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน มาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับผลพริกโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) มีวิธีการดังนี้ คือ นำกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm จำนวน 1 แผ่น มาประกบติดกับกระดาษฟางที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm จำนวน 3 แผ่น โดยให้กระดาษกรองวางอยู่ด้านบน แล้วนำไปจุ่มในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ชุ่ม จากนั้นนำไปวางในจานอาหาร โดยสุ่มผลพริกวางบนกระดาษชื้น จานละ 10 ผล ทำการทดลอง 4 ซ้ำ หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จึงนำเชื้อราที่เจริญบนผลพริกมาตรวจมาทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยศึกษาลักษณะต่างๆ ของเชื้อรา เช่น ลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อภายใต้*กล้อง* steriomicroscope จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเส้นใยหรือสปอร์เชื้อราแต่ละชนิดที่ขึ้นบนผลพริก ไปเลี้ยงบนอาหาร WA (water agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญแล้ว จึงย้ายลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ นำเชื้อราที่แยกได้ มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน จึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm ตัดขอบนอกของโคโลนีแล้วย้ายชิ้นวุ้นดังกล่าวไปวางตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหาร PDA โดยให้ด้านที่เชื้อราเจริญอยู่สัมผัสกับอาหาร จานละ 1 ชิ้น ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาลักษณะรูปร่างและโครงสร้างของเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์

**2. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผิวใบและผิวผลของพริกกะเหรี่ยง**

ทำการเก็บตัวอย่างใบและผลพริกกะเหรี่ยงจากแปลงปลูกตำบลสบเมย อำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน และตัวอย่างใบและผลพริกกะเหรี่ยงจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเลือกต้นพริกที่สมบูรณ์ ไม่แสดงอาการของโรค มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดังนี้

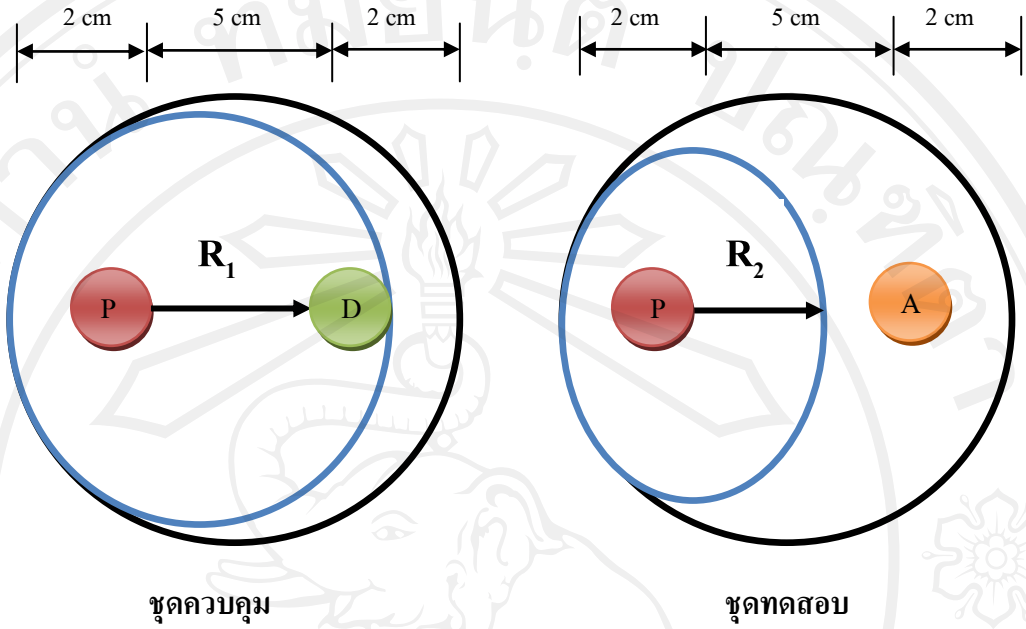
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำตัวอย่างใบพริกและผลพริกที่เก็บเกี่ยวแล้ว มาแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยนำใบและผลของพริกกะเหรี่ยง แช่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ pipette ดูดมา 1 ml นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเจือจางต่อไปแบบเดิม จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้นที่ $10^{-5}$ และ $10^{-6}$ มา 0.2 ml spread plate ลงบนอาหาร NA (Nutrient agar) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวโดยนำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ เพื่อเก็บไว้ใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

**3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ติดมากับผลพริกกะเหรี่ยงในสภาพห้องปฏิบัติการ**

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก stock culture ในข้อ 3.1 ที่เตรียมไว้มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี Dual culture หรือ Bi-culture ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในตู้ถ่ายเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุบนอาหาร PDA แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm เจาะเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคบริเวณขอบโคโลนีวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.0 cm จากนั้นจึงนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm แตะลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆ แล้วนำมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในด้านตรงข้ามกับเชื้อราสาเหตุโรค โดยเว้นระยะห่างจากขอบจานอาหาร 2.0 cm สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น (ภาพ 1) จากนั้นนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) สังเกตการเปลี่ยนแปลงและทำการบันทึกผลเมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนมีรัศมี 5 เซนติเมตร โดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุในชุดควบคุมและชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพ1** ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี Dual culture (P: Pathogen, D: Distilled water (Control), A: Antagonistic bacteria, R: Radial growth of pathogenic fungi)

นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth; PIRG) หลังจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistic for Window version 8.0

สูตรคำนวณ PIRG

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

$R_1$ = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม

$R_2$ = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**4. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์**

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยงทำการจำแนกเชื้อ โดยศึกษาคุณสมบัติด้านสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี

**4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย**

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร NA และศึกษาการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ พร้อมทั้งศึกษาความสามารถในการสร้างสปอร์ของเชื้อ รูปร่าง ขนาด และตำแหน่งของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ก)

**4.2 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี**

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆ มาทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี ในการผลิตเอนไซม์ 7 ชนิด คือ เซลลูเลส (cellulase), ฟอสฟาเตส (phosphatase), ไคติเนส (chitinase), อะไมเลส (amylase), ยูรีเอส (urease), ออกซิเดส (oxidase), แคตาเลส (catalase) นอกจากนี้ได้ ทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis), ทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมทาบอลิซึม (citrate utilization), ทดสอบการรีดิวซ์ไนเทรต (nitrate reduction) ทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (motility), ทดสอบ VP (voges-proskauer), ทดสอบ MR (methyl red), ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole (indole production), ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (formation of $H_2S$), ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่ NaCl 6.5%, ทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจน-ไม่มีออกซิเจน (Oxidation-Fermentation: OF) และ ทดสอบ Phenol red (PR) โดยการศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลต่อสารเคมีที่เติมลงในอาหารและดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทโดยเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน ได้แก่ *B. subtilis* ไอโซเลท T01 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท T03 (ภาคผนวก ก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**5. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดพริกกะเหรี่ยง**

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยง มาทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดพริกกะเหรี่ยง

**5.1 การเตรียมเมล็ดพริกกะเหรี่ยง**

นำเมล็ดพริกกะเหรี่ยงจากตำบลสบเมย อำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน มาฆ่าเชื้อที่ผิวตามวิธีการของ Errakhi *et al*. (2007) โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง นำไปผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที

**5.2 การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์**

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรียมา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร NA ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในจานอาหาร 20 ml ต่อจานอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดเชื้อแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเบาๆ แล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ$10^8$cfu/ml

**5.3 การทดสอบการงอกของเมล็ดพริกบนกระดาษชื้น**

นำเมล็ดพริกที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่ในสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคจากการทดลองที่ 3 โดยมีความเข้มข้น $10^8$ cfu/ml เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะบนกระดาษชื้น โดยนำเมล็ดพริกวางบนกระดาษเพาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm ซึ่งภายในบรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่นไว้ด้านบน และกระดาษฟาง 3 แผ่นที่ชุบน้ำจนชุ่มไว้ด้านล่าง วางเมล็ดพริกจำนวน 25 เมล็ดต่อจาน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ CRD ตรวจสอบการงอกของเมล็ดพริก โดยวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ดพริกกะเหรี่ยงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

**5.4 การทดสอบการงอกของเมล็ดพริกในสภาพโรงเรือน**

นำเมล็ดพริกที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่ในสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคจากการทดลองที่ 3 โดยมีความเข้มข้น$10^8$ cfu/ml เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะในกระบะเพาะซึ่งบรรจุดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) ตรวจสอบการงอกของเมล็ดพริกแล้ววิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย

**6. การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์และประเมินความสามารถของสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยง**

**6.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์**

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยงมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์

**6.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เซลล์สด**

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย 1 ml ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 ml จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ $10^8$ cfu/ml ทำการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ปริมาตร 20 ml ลงบนต้นพริกกะเหรี่ยง

**6.3 การเตรียมและการพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบผงละลายน้ำ**

มีขั้นตอน คือ เริ่มจากเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท เลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่บรรจุในขวดชมพู่ 2 ขวด ปริมาตร 150 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงทำการปรับปริมาตรด้วย NB ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 80 ml ผสมเข้ากับสารประกอบต่างๆ ซึ่งทำการทดลอง 2 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 (สูตร 1) นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีปริมาตร 40 ml ผสมเข้ากับสารประกอบต่างๆ ได้แก่ sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 1 g, talcum 98.5g และ calcium carbonate 0.5 g จากนั้นผสมให้เข้ากันดี นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 $^0$C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง blender จะได้ชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง เก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 2 (สูตร 2) นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีปริมาตร 40 ml ผสมเข้ากับสารประกอบต่างๆ ได้แก่ talcum 99.0g และ Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 g จากนั้นผสมให้เข้ากันดี นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 $^0$C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง blender จะได้ชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง เก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**6.4 การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบผงละลายน้ำ ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง**

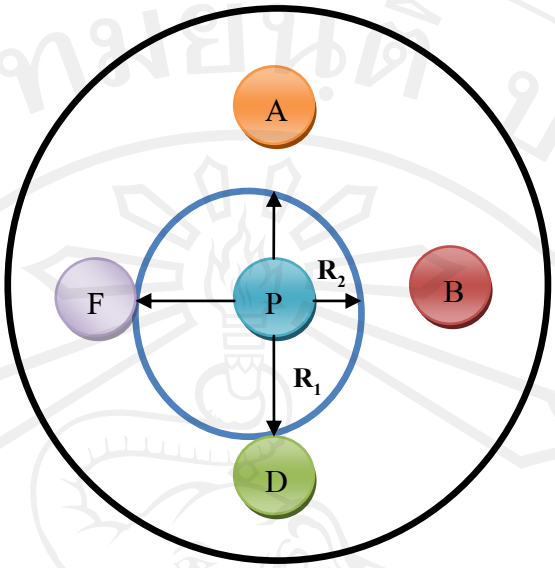
ตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งแรกหลังจากผลิตเสร็จ และตรวจนับเดือนที่ 9 โดยทำการชั่งสารชีวภัณฑ์ที่ผลิตในรูปแบบผงละลายน้ำ 0.5 g นำไปทำ serial dilution แล้วตรวจนับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธี Drop plate บนอาหาร NA บันทึกผล

**6.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยงในสภาพห้องปฏิบัติการ**

นำสารชีวภัณฑ์ในทั้ง 2 สูตรจากข้อ 7.3 มาประเมินความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยง โดยทำการทดสอบด้วยวิธี Dual culture เริ่มจากใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 mm ตัดขอบนอกของเส้นใยเชื้อราบริเวณขอบโคโลนีวางบนอาหาร PDA โดยวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากนั้นนำสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผงละลายน้ำ 0.3 g วางลงบนอาหาร PDA โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.0 cm ใช้น้ำกลั่นและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นชุดควบคุม (ภาพ 2) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ CRD นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลเมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนมีรัศมี 2.5 cm โดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุในชุดควบคุมและชุดทดสอบ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ PIRG

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพ2** ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ของสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุ โรคโดยวิธี Dual culture (P: Pathogen, D: Distilled water (Control), A: Antagonistic bacteria, B: Bioproduct formulation, F: Product Formulation, R: Radial growth of pathogenic fungi)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ (PIRG)

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

$R_1$ = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม

$R_2$ = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**6.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยงในสภาพเรือนทดลอง**

นำสารชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้มาทดสอบประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยงโดยใช้สารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผงละลายน้ำนำมาทดสอบกับต้นพริกกะเหรี่ยงในเรือนทดลอง โดยฉีดพ่นบนต้นพริกที่มีอายุ 60 วัน ปริมาณ 20 ml/ต้น หลังจากนั้นฉีดพ่นต้นพริกทุกๆ 15 วัน ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น การทดลองใช้แผนการทดลองแบบ RCBD การทดลองมี 7 กรรมวิธี โดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นด้วยส่วนประกอบของสูตรสารชีวภัณฑ์ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ SF

กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ SL

กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นด้วยสารชีวภัณฑ์สูตร SFF2

กรรมวิธีที่ 6 ฉีดพ่นด้วยสารชีวภัณฑ์สูตร SFF2

กรรมวิธีที่ 7 ฉีดพ่นด้วยสารเคมี captan

ประเมินการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยนำผลผลิตพริกกะเหรี่ยงที่ได้ทั้งหมดมาตากแห้ง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำผลพริกมาเพาะบนกระดาษชื้น ตรวจสอบเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวที่พบบนผลพริกโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและการใช้สารเคมี captan

นอกจากนี้นำต้นพริกกะเหรี่ยงอายุ 30 วันมาทดสอบและประเมินประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ โดยนำสารชีวภัณฑ์สูตร 2 ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกกะเหรี่ยงในสภาพเรือนทดลอง

**การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค**

เตรียม spore suspension ของ *C. capsici* ด้วยการเลี้ยงเชื้อรา *C. capsici* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 ก่อนเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ และปรับให้มีความเข้มข้น $10^6$ spore/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การทดสอบ**

ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนใบพริกอัตรา 2 มิลลิลิตร/ใบ เป็นเวลา 1 วัน ก่อนฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของ *C. capsici* ที่มีความเข้มข้น $10^6$ spore/ml โดยฉีดพ่นบนต้นพริกที่มีอายุ 30 วัน บันทึกผลการทดลองโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การทดลองใช้แผนการทดลองแบบ RCBD การทดลองมี 7 กรรมวิธี โดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นด้วยส่วนประกอบของสูตรสารชีวภัณฑ์ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ SF

กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ SL

กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นด้วยสารชีวภัณฑ์สูตร SFF2

กรรมวิธีที่ 6 ฉีดพ่นด้วยสารชีวภัณฑ์สูตร SFF2

กรรมวิธีที่ 7 ฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *C. capsici* ที่มีความเข้มข้น $10^6$ spore/ml

ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ประเมินความรุนแรงของโรคด้วยสายตา โดยใช้เกณฑ์การประเมินระดับการเกิดโรค โดยแบ่งความรุนแรงเป็น 5 ระดับ (ดัดแปลงจาก รัตติรส และสมศิริ, 2549) ดังนี้

ระดับ 1 ไม่เกิดแผลบนใบ หรือไม่พบใบที่แสดงอาการของโรค

ระดับ 2 แผลเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กบนใบ พบแผล 1-20%

ระดับ 3 แผลเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กบนใบ พบแผล 21-30%

ระดับ 4 แผลเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก และขนาดใหญ่บนใบ พบแผล 31-50%

ระดับ 5 แผลเป็นจุดสีน้ำตาลถึงดำขนาดใหญ่บนใบ แผลกระจายทั่วทั้งใบมากกว่า 50%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved