บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผิวของผลไม้ตัวอย่าง 3 ชนิด ได้แก่ สตรอเบอรี่ มะม่วง และส้ม

แยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวของผลไม้ตัวอย่าง 3 ชนิดที่ไม่เป็นโรคจากแปลงที่ไม่ใช้สารเคมี ด้วยอาหาร NA โดยนำผลไม้ทั้งสามชนิดมาแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 1 นาที นำ suspension ที่ได้มาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} จากนั้นใช้ steriled micropipette ดูด suspension มา spread plate ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำจานอาหารไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน หลังจากนั้นทำการแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย นำมาเลี้ยงในอาหาร NA จากนั้น จึงนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาเก็บไว้ใน NA slant เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 2 การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสจากผลไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ สตรอเบอรี่ มะม่วง ส้ม และกล้วย

แยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากแผลของผลไม้ทั้ง 4 ชนิดที่แสดงอาการของโรค โดยการเขี่ยสปอร์ของเชื้อมาวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากที่เชื้อเจริญ ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ hyphal tip isolation จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ของผลไม้แต่ละชนิด และทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค สังเกตอาการของโรคหลังจากการปลูกเชื้อ จากนั้นจึงเก็บเชื้อที่ได้ใน PDA slant เพื่อนำไปทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลไม้ทั้ง 4 ชนิด

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากการทดลองที่ 2 โดยวิธี dual culture technique หรือ biculture technique (ภาพที่ 1) ใช้ cork borer เบอร์ 1 เจาะปลายเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บริสุทธิ์ อายุ 5 วัน ออกเป็นชิ้นกลมๆ (culture disc) มาวางบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหารประมาณ 2 ซม. ใช้ loop แตะเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 ลากขนานกับเชื้อราสาเหตุ โดยลากห่างจากจุดศูนย์กลางของเชื้อ 5 ซม. ทำ 4 ซ้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับชุดควบคุม ทำการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เช่นเดียวกัน โดยใช้น้ำกลั่นแทนแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำผลการทดลองของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆ ที่มีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ (ชาตรี, 2544)

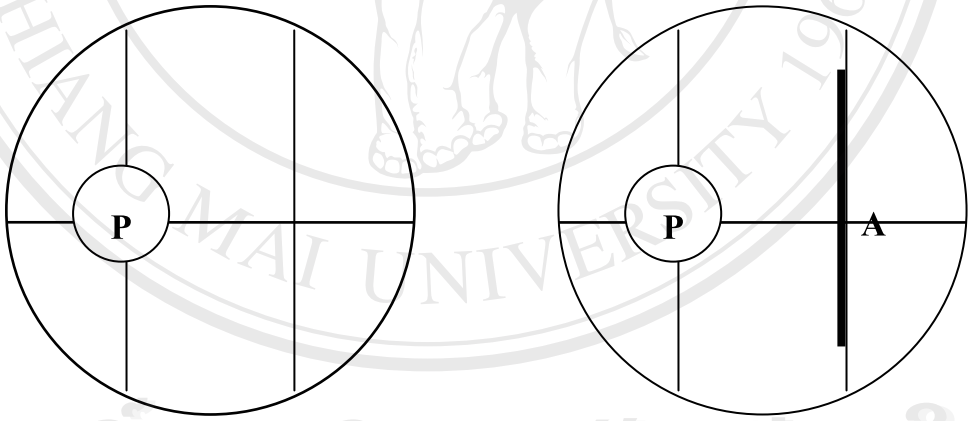
ตามสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = ความยาวรัศมีของเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของเชื้อราสาเหตุในชุดทดลอง

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอรี่ มะม่วง ส้ม และกล้วย เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอรี่ มะม่วง ส้ม และกล้วย ได้ทุกชนิด และมีประสิทธิภาพดี เพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป



ชุดควบคุม **ชุดทดสอบ**

P = เชื้อราสาเหตุ

A = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ภาพที่ 1 ลักษณะการวางเชื้อราสาเหตุ และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี dual culture technique หรือ biculture technique

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 การศึกษาความเปลี่ยนแปลงของเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลไม้ทั้ง 4 ชนิด เมื่ออยู่ร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้

เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลไม้ทั้ง 4 ชนิดในอาหาร PDA จากนั้น ใช้ cork borer เบอร์ 1 ทำการเจาะจากปลายเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ของผลไม้ทั้ง 4 ชนิด นำไปวางตรงกลางของจานเพาะเชื้อที่มี PDB อยู่ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 ° C รอจนเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาด 10 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้จากการทดลองที่ 3 ที่มีอายุ 3 วันใน nutrient broth (NB) มา 1 loopful ใส่ในจานเพาะเชื้อรา แล้วบ่มต่ออีก 3 วัน สำหรับชุดควบคุมใช้ NB แทนแบคทีเรียปฏิปักษ์ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโคโลนีและเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 5 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ดวงพร, 2537)

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้จากการทดลองที่ 3 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลไม้ทั้ง 4 ชนิดมาจำแนกชนิดโดยศึกษาคุณสมบัติทางด้านต่างๆของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ ได้แก่ ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง (Cultural characteristic), คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (Morphology characteristic), คุณสมบัติในการเคลื่อนที่ (Motility characteristic) และคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี (Biochemical characteristic)

5.1 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง

ศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NA เช่น สี รูปร่าง ระดับความนูน ลักษณะของผิวหน้า ขอบโคโลนี เป็นต้น

5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบลักษณะการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง โดยการย้อมสีแกรมแล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งศึกษาความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียโดยการต้ม bacterial suspension ใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนเย็นจึงนำไป streak บนอาหาร NA และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง

ผลบวก มีการเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร NA (สร้างเอนโดสปอร์)

ผลลบ ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ไม่สร้างเอนโสปอร์)

5.3 การศึกษาคุณสมบัติในการเคลื่อนที่

นำเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 24 ชั่วโมงมา stab ลงในอาหาร motility test บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24-48 ชั่วโมง

ผลบวก เชื้อกระจายไปจากแนวที่ stab

ผลลบ ไม่มีการกระจายของเชื้อไปจากแนวที่ stab

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี

5.4.1 การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ catalase

หยด 3 % H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด และแห้ง เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบอายุ 24 ชั่วโมงมา 2 loopful แตะลงในหยดของ H_2O_2 ทำการผสมให้เข้ากัน

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ ไม่เกิดฟองแก๊ส

5.4.2 การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ oxidase

วางกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย 1% tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วแตะเชื้อจาก nutrient agar slant อายุ 24 ชั่วโมง ลากบนกระดาษกรอง

ผลบวก เกิดสีม่วงเข้มขึ้นภายใน 10 วินาที

ผลลบ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

5.4.3 การทดสอบการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการ streak เชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร Simmons' citrate agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร

ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี

5.4.4 การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง

นำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงมาเลี้ยงใน starch agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 2- 3 วัน หลังจากนั้นหยด lugal 's iodine ลงบนอาหาร

ผลบวก อาหารเป็นสีน้ำเงิน แต่บริเวณรอบๆโคโลนี ไม่มีสี

ผลลบ เป็นสีน้ำเงินทั้งหมด

5.4.5 การศึกษาความสามารถในการสร้างสาร fluorescein

นำเชื้อแบคทีเรียมา streak ลงบนอาหาร King B medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปส่องดูลักษณะโคโลนีภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

ผลบวก พบการเรืองแสงของโคโลนี

ผลลบ ไม่พบการเรืองแสงของโคโลนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 6 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลไม้ทั้ง 4 ชนิด

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้จากการทดลองที่ 3 มาทดสอบกับผลไม้ทั้ง 4 ชนิด โดยแบ่งการทดลอง ดังนี้

6.1 ทดสอบประสิทธิภาพโดยทำการฉีดพ่น suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนผลไม้ทั้ง 4 ชนิด ก่อน 1 วันฉีดพ่น suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

เตรียม suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้มาเพิ่มปริมาณเชื้อโดย streak ลงบนอาหาร NA ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหาร 10 ml.ต่อจานอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ฆ่าเชื้อแล้วขูดแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเบาๆ แล้วใช้ sterile micropipette ดูดเอา bacterial suspension 1 ml. ใส่ในหลอดทดลองที่ที่มีน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 ml. จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 3 x 10^8 cfu / ml. ทำการฉีดพ่น suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ปริมาตร 10 ml. ลงบนผลไม้ทั้ง 4 ชนิดที่แข็งแรง ไม่เป็นโรค หลังจากนั้น 1 วันจึงทำการฉีดพ่น suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ความเข้มข้น 2 x 10^6 spore/ ml. ปริมาตร 10 ml. ตามลงไป ทำการบันทึกผลทุกๆ 3, 5 และ 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เพียงอย่างเดียว

6.2 ทดสอบประสิทธิภาพโดยทำการฉีดพ่น suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ลงบนผลไม้ทั้ง 4 ชนิด ก่อน 1 วันฉีดพ่น suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

เตรียม suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ความเข้มข้น 2 x 10^6 spore/ml. ปริมาตร 10 ml. ฉีดพ่นลงบนผลไม้ทั้ง 4 ชนิดที่แข็งแรง ไม่เป็นโรค หลังจากนั้น 1 วัน จึงทำการฉีดพ่น suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ความเข้มข้น 3 x 10^8 cfu / ml. ตามลงไป ทำการบันทึกผลทุกๆ 3, 5 และ 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เพียงอย่างเดียว

6.3 การประเมินและบันทึกผล

ประเมินความเสียหายที่เกิดขึ้นกับผลไม้ทั้ง 4 ชนิดจากการทดลองที่ 6.1 และ 6.2 โดยการประเมินพื้นที่ของผลไม้ทั้ง 4 ชนิดที่ถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลาย โดยแบ่งระดับความรุนแรงเป็น 5 ระดับ (สืบศักดิ์, 2540) ดังนี้

0 = ไม่มีแผลเลย
1 = มีแผลเป็นพื้นที่ 1-25 %
2 = มีแผลเป็นพื้นที่ 26-50 %
3 = มีแผลเป็นพื้นที่ 51-75 %
4 = มีแผลเป็นพื้นที่ 76-100 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของการเกิดโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนผลที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเกิดโรค}}$$

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved