บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกและเก็บรวบรวมแอคติโนมัยซีสจากดินและวัสดุที่ใช้สำหรับปลูกปทุมมา

1.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย

ทำการแยกและเก็บรวบรวมแอคติโนมัยซีสจากดินในบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย โดยทำการสุ่มเก็บดิน 6 จุด เก็บจุดละประมาณ 1 กิโลกรัม นำดินที่เก็บได้มาผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 7 วัน นำดินที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ร่อนดินโดยใช้ตะแกรง จากนั้นตักดินใส่กระดาษฟอยล์ (foil) 15 กรัม จึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.2 การเก็บรวบรวมตัวอย่างจากวัสดุที่ใช้สำหรับปลูกปทุมมา

ทำการเก็บตัวอย่างวัสดุที่ใช้สำหรับปลูกปทุมมาจากสวนปลูกปทุมมา อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 4 จุด โดยเก็บตัวอย่างวัสดุปลูกปทุมมาที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว 1, 2, 3 และ 4 ปี แต่ละจุดเก็บมาประมาณ 1 กิโลกรัม จากนั้นนำตัวอย่างมาผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 7 วัน นำวัสดุปลูกปทุมมาที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วร่อนวัสดุปลูกปทุมมาที่บดแล้วโดยใช้ตะแกรง จากนั้นนำวัสดุปลูกปทุมมาที่ร่อนได้ไปชั่งประมาณ 15 กรัม ต่อหนึ่งห่อกระดาษฟอยด์ แล้วนำไปทำการอบที่อุณหภูมิ 120 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3 การแยกแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างดินและวัสดุปลูกปทุมมา

โดยการนำตัวอย่างดินและวัสดุปลูกปทุมมาที่เก็บรวบรวมได้ในข้อ 1.1 และ 1.2 นำมาแยกแอคติโนมัยซีสโดยทำตามขั้นตอน ดังนี้

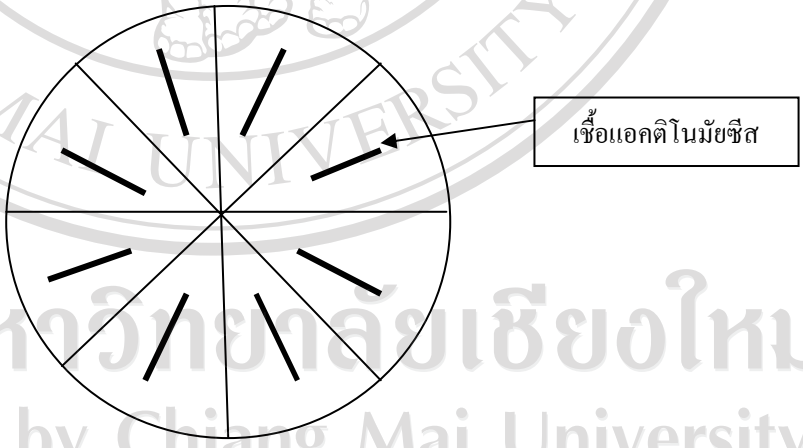
1.3.1 นำดินและวัสดุปลูกปทุมมาที่ได้จากการอบมาโรยลงบนอาหาร Soil-extract Agar โดยใช้ช้อนตักสาร โรยบางๆ ให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 7-14 วัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.3.2 สังเกตลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีส ซึ่งมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาว แล้วคัดเลือกแอคติโนมัยซีสออกมาโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (autoclave) เขี่ยสปอร์หรือโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งมาขีดบนผิวหน้าอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน จะพบแอคติโนมัยซีสเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ 5) จากนั้นจึงเขี่ยแอคติโน-มัยซีสมาขีดลงบนผิวหน้าของแผ่นเซลลูโลส (Cellulose Membrane Filters) ที่วางบนอาหาร SCA อีกครั้งเพื่อให้ได้แอคติโนมัยซีสที่บริสุทธิ์ (ภาพที่ 6) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน จึงลอกเอา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผ่นเซลลูโลสออก จะพบแอคติโนมัยซีสเจริญบนผิวหน้าอาหาร จึงเลือกเก็บแอคติโนมัยซีสเพื่อใช้เป็น stock culture ในหลอดอาหาร Yeast Starch Agar (YSA) ซึ่งเก็บรักษาในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 5 การแยกแอคติโนมัยซีสให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak Plate Technique บนผิวหน้าอาหาร Starch Casein Agar เพื่อให้ได้ลักษณะของโคโลนีเดี่ยว (ที่มา: Sembiring *et al.,* 2000)

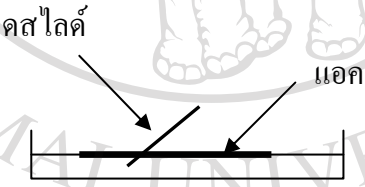


ภาพที่ 6 แผนภาพแสดงลักษณะการแยกแอคติโนมัยซีสจากดินและจากวัสดุปลูกปทุมมา โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Starch Casein Agar เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีส (ดัดแปลงจากวิธีของ Williams *et al*., 1989)

นำแอคติโนมัยซีสแต่ละไอโซเลท (isolate) มาทำการเลี้ยงบนอาหาร Yeast Starch Agar (YSA) โดยทำการขีดบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญบนอาหารของแอคติโนมัยซีสแต่ละไอโซเลท และนำแอคติโนมัยซีสแต่ละไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร Inhibitory Mold Agar-2 (IMA-2) โดยวิธี streak plate แล้วปักแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่มีโคโลนีของแอคติโนมัยซีส เจริญอยู่หนาแน่น โดยให้ทำมุมประมาณ 45 องศากับผิวหน้าอาหาร เพื่อให้เส้นใยเจริญขึ้นไปบนสไลด์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 7) แล้วนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีแอคติโนมัยซีสที่เจริญขึ้นติดอยู่บนแผ่นสไลด์มาย้อมสีแบบ simple stain โดยหยดด้วยสารละลาย crystal violet 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจดูลักษณะของ mycelium, conidium, sporangium, โครงสร้างอื่นๆ และการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของ Miyadoh *et al*. (1997) และ Stanley *et al*. (1989) เพื่อจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีสในเบื้องต้น



ภาพที่ 7 การทำ slide culture เพื่อตรวจดูลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซีส

3. การแยกเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากหัวพันธุ์ปทุมมาและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคเหี่ยว

ทำการเก็บรวบรวมหัวพันธุ์และต้นปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่สีชมพูที่เกิดโรคเหี่ยว จากสวนปลูกปทุมมา มาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ (เกวลิน, 2547) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 นำชิ้นพืชไปฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ชิ้นพืชในสารละลาย sodium hypochloride (clorox) 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 นำชิ้นพืชมาหั่นละเอียดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้แบคทีเรียไหลออกมาจากรอยตัด จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลมสั้น (loop) แตะไปขีดบนอาหาร Tetrazolium Chloride Medium (TZC) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 วัน เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร TZC จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะเยิ้มสีขาวขุ่นตรงกลางโคโลนีมีสีชมพูอ่อนหรือสีแดง แตะเชื้อไปขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TZC อีก 1-2 ครั้ง เพื่อเตรียมเชื้อบริสุทธิ์และเก็บไว้ใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคเหี่ยวในปทุมมา โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่แยกได้ใน TZC broth ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้นำเซลล์แขวนลอย (cell suspension) เทราดลงบนหัวพันธุ์และลำต้นปทุมมา สังเกตอาการของต้นพืชว่าเกิดโรคเหี่ยวหรือไม่

4. การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

4.1 การเตรียมแอคติโนมัยซีสเพื่อใช้ในการทดสอบ

นำแอคติโนมัยซีสที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อบนอาหาร Glucose Soybean Medium (GSM) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้แอคติโนมัยซีสสร้างสารปฏิชีวนะ เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณอาหารที่มีการเจริญเติบโตของแอคติโนมัยซีสหนาแน่น แล้วนำ culture disc มาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.2 การเตรียมเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเพื่อใช้ในการทดสอบ

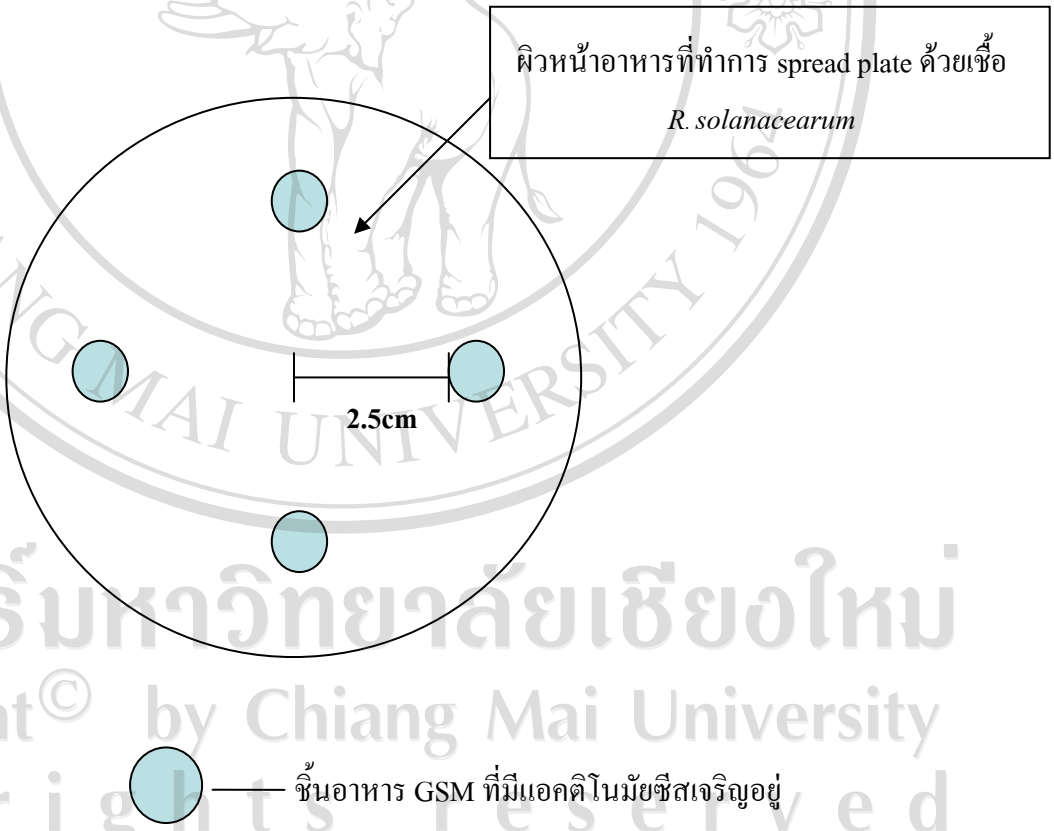
นำเชื้อ *R. solanacearum* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TZC มาย้ายเลี้ยงในบนอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) เป็นระยะเวลา 1-2 วัน แล้วนำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาทดสอบในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสต่อเชื้อ *R. solanacearum* โดยวิธี Dual Culture

ในการทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสที่ทำการเก็บรวบรวมจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย และวัสดุที่ใช้ปลูกปทุมมา จำนวน 88 ไอโซเลท เพื่อทำการคัดเลือกแอคติโนมัยซีสไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทำโดยวาง

culture disc ของแอคติโนมัยซีสจำนวน 4 ไอโซเลท บนผิวหน้าอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่ได้ทำการ spread plate ด้วยเชื้อ *R. solanacearum* ไว้แล้ว แต่ละ culture disc วางห่างจากจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 8) วาง culture disc ของแอคติโนมัยซีส หลังจากทำการ spread plate ทันที ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ทดสอบแอคติโนมัยซีสแต่ละไอโซเลท และในชุดควบคุมทำการ spread plate บนผิวหน้าอาหารด้วยเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* อย่างเดียว จากนั้นเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน สังเกตประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ โดยตรวจสอบจากการเกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหาร ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น เพื่อคัดเลือกแอคติโนมัยซีสไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดี สำหรับนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



ภาพที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโดยวิธี dual culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในสภาพเรือนปลูก

นำแอคติโนมัยซีสที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* (ที่คัดเลือกได้ในข้อ 4) มาทดสอบความสามารถในการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพเรือนปลูกทดลอง ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. เตรียมพันธุ์และต้นปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่สีชมพูเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* โดยการนำหัวปทุมมาเพาะลงในถุงขนาด 8×12 นิ้ว ซึ่งมีดินผสมแกลบและทราย ในอัตราส่วน 2:7:1 ตามลำดับ

2. การเตรียมแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกจากข้อ 4 คือ แอคติโนมัยซีสไอโซเลท C4-8, C4-10 และ S22 นำมาเลี้ยงในอาหาร Starch Casein Broth (SCB) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3. การเตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ของเชื้อ *R. solanacearum* เพื่อใช้ทดสอบ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* ใน TZC broth ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในการทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสทั้งสามไอโซเลทเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้แบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

5.1 การใช้แอคติโนมัยซีสควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* ทันทีหลังปลูกหัวพันธุ์ปทุมมา

ทำการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวด้วยการราดเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ลงบนหัวปทุมมาที่เพิ่งปลูกลงในวัสดุปลูก โดยใช้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ต่อต้น (ถุง) แล้วจึงนำแอคติโนมัยซีสไอโซเลท C4-8, C4-10 และ S22 ที่เตรียมไว้ในรูปสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ราดลงบนหัวปทุมมาและวัสดุปลูก เช่นเดียวกับที่ได้ปฏิบัติกับเชื้อสาเหตุ สำหรับชุดควบคุมทำการปลูกเชื้อโรคอย่างเดียวไม่ราดด้วยแอคติโนมัยซีส สังเกตอาการพร้อมบันทึกผลทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การใช้แอคติโนมัยซีสควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* เมื่อหัวปทุมมาเริ่มงอก

ทำการปลูกเชื้อสาเหตุและใช้แอคติโนมัยซีสราดเช่นเดียวกับข้อ 5.1 แต่ทำเมื่อหัวปทุมมางอกแล้ว ประมาณ 2 สัปดาห์ หลังปลูก บันทึกผลจนครบ 12 สัปดาห์ เช่นเดียวกัน

5.3 การใช้แอคติโนมัยซีสควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* เมื่อปทุมมาอายุ 3 เดือน

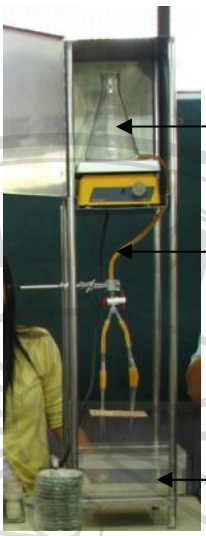
ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1 และ 5.2 แต่ทำเมื่อปทุมมามีอายุ 3 เดือน หลังปลูก

การทดลองในข้อ 5.1, 5.2 และ 5.3 ทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 3 ต้น (ถุง)

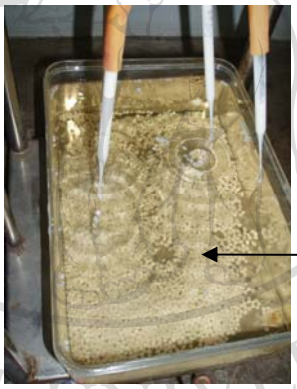
6. การผลิตแอคติโนมัยซีสในรูปของชีวภัณฑ์

ในการผลิตแอคติโนมัยซีสให้อยู่ในรูปเม็ด (pellet) ทำโดยนำแอคติโนมัยซีสที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ แอคติโนมัยซีสไอโซเลท C4-8 ซึ่งให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของปทุมมาที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract-Malt Extract-Glucose Broth (YMGB) เป็นเวลา 3 วัน หลังจากได้สปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของแอคติโนมัยซีส จากนั้นจึงนำมาผลิตในรูปเม็ดโดยการเทลงใน sodium alginate 10 กรัม ที่ผสมกับ hydrous aluminum silicate 100 กรัม เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1,000 มิลลิลิตร ลงไปทีละน้อย แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปเทลงใน flask ที่มีสายยางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ยึดด้วยขาตั้งซึ่งวางบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร (ภาพที่ 9) ที่บรรจุสารละลาย calcium gluconate (Ca-gluconate) 0.1M และ calcium chloride ($CaCl_2$) 0.25M ซึ่งแยกกันไว้ด้านล่าง ของเหลวจากส่วนผสมที่มีแอคติโนมัยซีสจะหยดลงในสารละลายและแข็งตัวเป็นเม็ด (ภาพที่ 10) นำแอคติโนมัยซีสที่จับตัวเป็นเม็ดผึ่งให้แห้ง (ภาพที่ 11) จากนั้นจึงทำการทดสอบความมีชีวิตรอดของแอคติโนมัยซีส หลังจากการผลิตในรูปเม็ด โดยมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 4 องศาเซลเซียส และ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการตรวจสอบความมีชีวิตรอดของแอคติโนมัยซีสทุกๆ สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

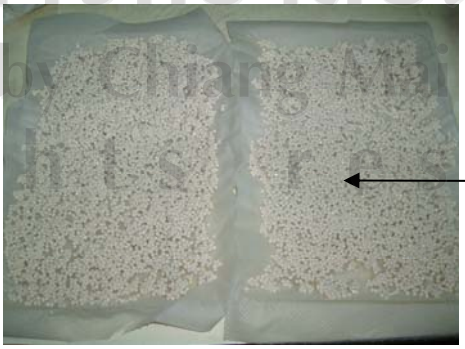


ภาพที่ 9 อุปกรณ์ในการผลิตแอคติโนมัยซีสในรูปของชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด



ภาพที่ 10 ของเหลวที่มีแอคติโนมัยซีสผสมกับ sodium alginate และ hydrous aluminum silicate หยดลงในสารละลายและแข็งตัวเป็นเม็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 11 การนำแอคติโนมัยซีสที่เคลือบด้วย calcium chloride มาผึ่งให้แห้ง

7. การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ในการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซีส ทำการทดสอบโดยเลี้ยงแอคติโนมัยซีสลงบนอาหารสำหรับทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส เป็นเวลา 7 วัน โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำสารละลาย Congo Red 1 เปอร์เซ็นต์ เทลงบนผิวหน้าอาหาร เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อทำการย้อมสี แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เพื่อสังเกตความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซีส โดยจะปรากฏเป็นวงใส (clear zone) บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved