บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเพิ่มประชากรของแบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการศึกษาจากกองขยะอินทรีย์หมักและขยะเหลวที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อรา

ในขั้นต้น นำขยะเปียกที่ได้มาจากสถานกำจัดขยะเทศบาลเมืองขอนแก่น ที่อยู่ลึกลงไปในกองขยะประมาณ 5 นิ้ว และลึกลงไปอีก 20 นิ้ว ในปริมาณตัวอย่างละ 10 กรัม และขยะเหลวจากพื้นผิวดิน ในปริมาตร 10 มล. ในกรณีของขยะเปียกแต่ละตัวอย่าง ให้ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อในปริมาตร 1 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในถุงพลาสติก เขย่าด้วยเครื่อง Stomacher เพื่อให้ชื้อจุลินทรีย์หลุดจากเศษขยะ นำน้ำเชื้อผสมของแต่ละตัวอย่างที่ได้ในปริมาตร 5 มล. ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว nutrient broth ในปริมาตร 100 มล. บรรจุใน Erlenmyer flask ขนาด 250 มล.จำนวนตัวอย่างละ 1 flasks (สำหรับขยะเหลว ถ่ายเชื้อผสมในปริมาตร 1 มล. ลงไปผสมกับอาหารเหลว nutrient broth ในปริมาตร 100 มล. บรรจุใน Erlenmyer flask ขนาด 250 มล. จำนวน 1 flasks นำแต่ละตัวอย่างไปบ่มที่ 37^{o}C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ในทำนองเดียวกัน ให้ทำการชักตัวอย่างจากดินบริเวณสถานกำจัดขยะเทศบาลเมืองขอนแก่น ด้วยการ ชั่งตัวอย่างดิน 5 กรัม ละลายใน 0.85% normal saline ปริมาตร 100 ml เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ชิ้นดินตกตะกอน ดูดส่วนใสในปริมาตร 1 ml ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว nutrient broth ในปริมาตร 100 มล. บรรจุใน Erlenmyer flask ขนาด 250 มล. บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการศึกษาจากขยะอินทรีย์หมัก

นำอาหารเหลวทุก flask ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียเจริญ มาทำการเจือจางเพื่อให้ได้ค่าความเจือจางที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ทำการแยกเชื้อด้วยเทคนิค spread plate technique ลงบนอาหารแข็ง nutrient agar plate โดยทำเป็น triplicate นำ ไปบ่มที่อุณหภูมิ37^{o}C

นำจานอาหารทุกจานมาทำการคัดเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย โดยนำแต่ละโคโลนีมาทำ cross-streak ลงในอาหาร nutrient agar plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C ตามที่กำหนดมาแล้วในตอนต้น ปฏิบัติเช่นนี้กับทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา เพื่อให้ได้เชื้อ isolate ที่บริสุทธิ์เป็นโคโลนีเดี่ยว

3. การเตรียมเชื้อราทดสอบ

เลี้ยงเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่ 30^{o}C เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัด

เส้นใยของเชื้อราที่เจริญบริเวณรอบนอกของโคโลนี นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA slant บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน เตรียมสปอร์และ mycelium suspension ด้วยอาหารเหลว potato dextrose broth ผสม 0.1% tween 80 ปริมาตร 3 ml. ใส่ลงในหลอดอาหาร PDA slant แล้วใช้ loop ปลอดเชื้อขูดเส้นใยราที่สร้างสปอร์เบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดกระจาย ปรับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นให้ได้สปอร์ประมาณ 10^7 สปอร์ ด้วยการนับค่าจากเครื่อง Haemacytometer ด้วยการใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อในการเจือจา นำสปอร์ที่เจือจางแล้วไปทำ spread plate ลงบน PDA agar plate ปล่อยให้หน้าวุ้นในจานอาหารแห้ง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะวุ้นจากผิวอาหารทะลุถึงก้นจานอาหารเป็นหลุมเพื่อเตรียมไว้สำหรับการหยอดสารออกฤทธิ์ของแบคทีเรียต้านเชื้อรา

4. การเตรียมสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่คาดว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์มาทำการ inoculate ลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 ml บรรจุใน Erlenmyer flask นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นของเชื้อ optical density (OD) และปรับค่า OD ให้ได้ค่าประมาณ OD = 0.1 ปิเปต inoculate ลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 150 ml บรรจุใน Erlenmyer flask ขนาด 250 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ ให้ทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ส่วนใสที่ได้จะใช้สำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี well diffusion method

5. การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารต้านเชื้อรายับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี well diffusion method (Mckeen, 1986)

นำสปอร์ suspension ของเชื้อรามาเพาะลงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี spread plate technique ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำ spread plate แล้วจำนวน 2 หลุม ใช้ Autopipette ดูด supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 µl หยดลงในหลุมที่ 1 ส่วนหลุมที่ 2 หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (หลุมควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตการณ์เกิด Inhibition zone และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น

6. ศึกษาการหาอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารต้านเชื้อรา ปริมาตร 1 loopfull ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 50 ml เจือจางความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ค่า optical density ที่absorbance 600 nm เท่ากับ 0.5 ดูดเชื้อปริมาตร 10 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 25^0, 30^0, 35^0, 40^0 และ 45°C บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm จากแต่ละอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เวลา 6, 12, 24, 48 และ 72

ชั่วโมง นำส่วนใสของแต่ละช่วงเวลาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี well diffusion method

7. การเตรียมตะกอนสารต้านเชื้อราก่ึงบริสุทธิ์

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 50 ml เจือจางความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ค่า optical density ที่ absorbance 600 nm เท่ากับ 0.5 ดูดเชื้อปริมาตร 10 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 rpm. ที่ 4^{0}C นาน 20 นาที นำส่วนใสหรือ supernatant มาทำการตกตะกอนด้วย 85% saturated ammonium sulfate solution ที่อุณหภูมิ ที่ 4^{0}C นาน 24 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่ 4^{0}C นาน 30 นาที ละลายตะกอนด้วย 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ในปริมาตรที่น้อยที่สุด

8. การทดสอบความเสถียรของสารต้านเชื้อรา

8.1 <u>การทดสอบความเสถียรของสารต้านเชื้อราที่อุณหภูมิต่างกัน</u>

ดูด supernatant ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อจำนวน 6 หลอด นำแต่ละหลอดไปแช่ในอ่างปรับอุณหภูมิที่ปรับระดับอุณหภูมิ 40^0, 50^0, 60^0, 70^0 และ 100^{0}C เป็น เวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี well diffusion method

8.2 <u>การทดสอบความคงตัวของสารต้านเชื้อราที่ค่ากรด-ด่าง (pH)</u>

ชั่งตะกอนสารต้านเชื้อราปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายใน 50 mM Sodium phosphate buffer ปริมาตร 0.2 ml. ที่ปรับค่า pH ไว้ทีระดับต่างๆ ดังนี้ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี well diffusion method

9. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici แบบปลูกในกระถาง

เชื้อราที่นำมาทดสอบคือ เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นเชื้อราก่อโรค tomato wilt ในต้นมะเขือเทศ โดยขั้นตอนการเตรียมเชื้อราสำหรับทดสอบและขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแบบปลูกในกระถาง ปฏิบัติดังนี้

นำดินปลูกต้นไม้มาคลุกเคล้ากับแกลบดำเพื่อให้ดินร่วนสุย บรรจุลงถุงพลาสติกจำนวน 5 ถุง โดยมีน้ำดินดินถุงละ 2 กิโลกรัม นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (เครื่อง Autoclave) ที่ 15

ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แยกดินปลอดเชื้อส่วนหนึ่งไปเพาะกล้าต้นมะเขือเทศ ดินที่เหลือใช้สำหรับการปลูกต้นมะเขือเทศภายใต้การทดสอบแบบต่างๆ

นำต้นกล้ามะเขือเทศที่เพาะชำมานาน 2-3 สัปดาห์ เลือกที่มีความยาวของลำต้นประมาณ 4 นิ้ว ทำความสะอาดรากด้วยการล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ใช้กรรไกรปลิดเชื้อตัดปลายรากแก้วออกประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อให้เกิดบาดแผลที่ราก แยกต้นกล้ามะเขือเทศที่ตัดรากแก้วออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (control seedling) กลุ่มที่ 1 นี้จะนำลงปลูกในกระถางโดยตรง นำกระถางไปตั้งไว้ในที่แดดรำไร รดน้ำวันละครั้งตอนเย็น; กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง (seedling under test) ต้นกล้ามะเขือเทศในกลุ่มที่ 2 นี้ จะถูกนำไปแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีปสอร์ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici แขวนลอยอยู่ในจำนวน $1x10^9$ spores per ml จากนั้นจึงนำลงปลูกในกระถาง นำกระถางไปตั้งไว้ในที่แดดรำไร รดน้ำวันละครั้งตอนเย็น; กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มทดลอง (seedling under test) มีหลักปฏิบัติคล้ายกับต้นกล้ามะเขือเทศในกลุ่มที่ 2 ที่เพิ่มขึ้นคือ หลังการปลูกต้นมะเขือเทศลงกระถาง นำกระถางไปตั้งไว้ในที่แดดรำไร ให้รดด้วยน้ำ supernatant ที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียภายใต้การทดสอบ สลับกับการรดน้ำธรรมดา วันละครั้ง ปฏิบัติเช่นนี้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

10. การศึกษาลักษณะและเทียบเคียงบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียเป้าประสงค์ในระดับสกุล (Genus)

10.1 การศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียเป้าประสงค์ระดับกายภาพ

10.1.1 การย้อมสี Gram staining

10.1.2 การย้อมสี endospore

10.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีตามหนังสือ Bergey Mnaual of Determinative Bacteriology

การทดสอบทางชีวเคมี มีดังนี้ ทดสอบ catalase test, mobility test, indole test, starch hydrolysis, nitrate reduction, gelatin liquefaction, urease test, citrate utilization, litmus milk test และ การ fermentation ของน้ำตาลชนิดต่างๆ