สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจำนวน 30 ตัวอย่างจากแหล่งที่มีไคติน-ไคโตซานสะสมอยู่ เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคติน ตัวอย่างดินที่เก็บเป็นดินที่สันนิษฐานว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายไคตินได้ เช่น ดินจอมปลวก ดินสวนที่มีซากแมลง ดินป่ามีใบไม้ผุและซากแมลง หรือดินจากป่าชายเลน เป็นต้น ศึกษาลักษณะและข้อมูลบางประการของดิน เช่น ลักษณะการใช้ดิน สีของดิน ชนิดของพืชที่เจริญอยู่ ลักษณะของเนื้อดินจากการสัมผัสและปริมาณอินทรียวัตถุที่ดูจากสายตา เลือกเก็บดินจากบริเวณที่มีซากแมลง, เปลือกไม้ผุผัง, และบริเวณที่มีเส้นใยราหรือบริเวณที่มีการเจริญของเห็ดรา

2. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคตินจากตัวอย่างดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมใส่ในฟลาส์กอาหารเหลว Colloidal chitin medium ที่ประกอบด้วย colloidal chitin 1%w/v , triammonium citrate 0.625 g/l, NaCl 0.250 g/l, KH_2PO_4 0.375 g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0.125 g/l, และ Na_2CO_3 0.375 g/l ปรับ pH ที่ 7.0 เขย่าด้วย rotary shaker 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ทำการ streak ตัวอย่างดินที่ผ่านการบ่มลงบนอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 3-5 วัน สังเกตการเจริญของแอคติโนมัยซิทส์ที่ย่อยสลายไคตินได้โดยจะเห็นบริเวณใส (clear zone) รอบๆโคโลนีเมื่อเทียบกับส่วนอื่นของอาหารที่ขุ่น และทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak เชื้อลงบน Colloidal chitin selective agar แล้วเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้บนอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 4°C

3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของแอคติโนมัยซิทส์ที่คัดแยกได้

เปรียบเทียบความสามารถของแอคติโนมัยซิทส์ที่คัดแยกได้จากข้อ 2 ในการย่อยสลาย colloidal chitin บน Colloidal chitin agar โดยอ่านผลด้วยการเทสารละลาย 1% Congo red ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 15 นาที เทสีออกแล้วล้างด้วยสารละลาย 1 M NaCl อ่านผลโดย colloidal chitin ที่ไม่ถูกย่อยสลายจะติดสีแดง ส่วนที่ถูกย่อยสลายจะไม่มีสี ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี (cz) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ (cs) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ค่าเฉลี่ยเพื่อคัดเลือกเชื้อที่ให้สัดส่วนของ cz/cs อยู่ในระดับสูง

4. ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคโตซาเนสของเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ที่ย่อยสลายไคตินที่คัดแยกได้

ทดสอบความสามารถการผลิตเอนไซม์ไคโตซาเนสของแอคติโนมัยซิทส์ที่ย่อยสลายไคตินที่คัดแยกได้จากข้อ 2 บนอาหาร Colloidal chitosan agar โดยอ่านผลด้วยการเทสารละลาย 1% Congo red ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 15 นาที เทสีออกแล้วล้างด้วยสารละลาย 1 M NaCl อ่านผลโดย colloidal chitosan ที่ไม่ถูกย่อยสลายจะติดสีแดง ส่วนที่ถูกย่อยสลายจะไม่มีสี ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี (cz)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 1 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 246492
เลขเรียกหนังสือ

ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ (cs) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ค่าเฉลี่ยเพื่อคัดเลือกเชื้อที่ให้สัดส่วนของ cz/cs อยู่ในระดับสูง

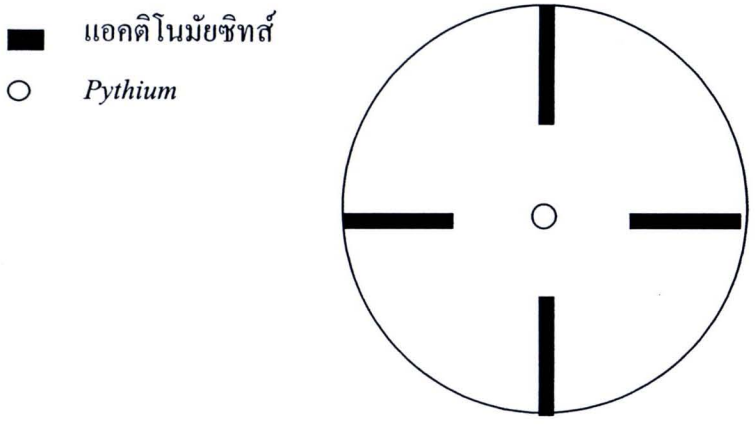
5. ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ที่ย่อยสลายไคตินที่คัดแยกได้

ทดสอบความสามารถการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซิทส์ที่ย่อยสลายไคตินที่คัดแยกได้จากข้อ 2 บนอาหาร Carboxymethyl cellulose (CMC) mineral salt agar ที่ประกอบด้วย carboxyl methyl cellulose (CMC) 5.0 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 4.0 g/l, K_2HPO_4 6.0 g/l, yeast extract 1.0 g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 g/l, และ agar 15 g/l ปรับ pH ที่ 7.0 อ่านผลด้วยการเทสารละลาย 1% Congo red ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 15 นาที เทสีออกแล้วล้างด้วยสารละลาย 1 M NaCl อ่านผลโดย CMC ที่ไม่ถูกย่อยสลายจะติดสีแดง ส่วนที่ถูกย่อยสลายจะไม่มีสี ประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยคิดเป็นสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี (cz) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ (cs)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซิทส์ที่คัดเลือกได้ในการยับยั้ง *Pytium aphanidermatum* ที่เป็นเชื้อราสาเหตุของโรค seedling damping off ของถั่วเหลืองในระดับปฏิบัติการบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

6.1 ใช้ loop ถ่ายเชื้อแอคติโนมัยซิทส์มาขีดบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เป็นเส้น 4 เส้น จากขอบจานในแนวที่ตรงข้ามกัน โดยเว้นบริเวณตรงกลาง ตามรูปที่ 2 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชั่วโมง

6.2 ใช้ cork borer ตัดวุ้นส่วนขอบโคโลนีของเชื้อรา *P. aphanidermatum* จากอาหาร PDA (mycelium plug) แล้ววาง mycelium plug ลงตรงกลางของอาหารทดสอบที่มีแอคติโนมัยซิทส์เจริญ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชั่วโมง สังเกตการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยแอคติโนมัยซิทส์ โดยถ้าเชื้อแอคติโนมัยซิทส์สามารถยับยั้งเชื้อราได้ จะไม่เห็นการเจริญของเชื้อราเข้าไปใกล้บริเวณที่มีเชื้อแอคติโนมัยซิทส์เจริญอยู่



รูปที่ 2. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของจุลินทรีย์ (Antagonistic test)

7. การคัดเลือกและจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ที่จะใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์สำหรับงานวิจัย

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ที่จะใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์สำหรับงานวิจัยโดยพิจารณาจากเชื้อที่สามารถย่อยสลาย ไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลสได้และมีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *P. aphanidermatum* คือยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี

นำแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ มาทำการจำแนกชนิดโดยศึกษาโครงสร้าง การสร้างและการจัดการเรียงตัวของ conidia ของเชื้อ ด้วยวิธีการทำ slide culture ใช้ loop เขี่ย conidia ของเชื้อ ลงในหยดของ nutrient agar (NA) ที่หลอมเหลว ที่อยู่บน slide ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิดด้วย cover glass บ่มใน slide culture chamber ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำ slide ไปอังไอน้ำร้อนจนวุ้นแห้ง แล้วย้อม slide ด้วยสี Carbon fuchsin แล้วศึกษาดูลักษณะของเส้นใยและการจัดเรียงตัวของโคนิเดียของแอคติโนมัยซิทส์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

8. ศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum*

ศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* โดยเตรียม mycelium plug (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm) จากขอบโคโลนี ของ *P. aphanidermatum* ที่อายุ 7 วัน วางตรงกลางจานเพาะเชื้อ PDA ที่มี สารไคโตซานที่ละลายน้ำปริมาณ 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 µg/ml ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA ที่มีไคโตซานแต่ละความเข้มข้นทุกวันเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบน PDA ที่ไม่มีไคโตซานเป็นจานควบคุม คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเจริญเทียบกับการเจริญของเชื้อราในจานควบคุม แต่ละความเข้มข้นของไคโตซานทำ 3 ซ้ำ วัดการเจริญทุกวันจนเชื้อราในจานควบคุมเจริญถึงขอบจานเพาะเชื้อ

9. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้ในอาหารที่มี colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้งเป็นองค์ประกอบหลัก

9.1 ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในอาหาร colloidal chitin medium

การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ ในอาหาร colloidal chitin medium ที่มีส่วนประกอบของ colloidal chitin 1%w/v โดยใส่ spore suspension ของแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ 10^8 cfu/ml ปริมาณ 1 ml ในอาหาร 100 ml ที่อยู่ใน 250 ml Erlenmeyer flask เขย่าให้อากาศใน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C ติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวัด cell mass และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสใน cell free supernatant

การศึกษาประสิทธิภาพเอนไซม์ไคติเนส ทำโดย เติม 1 ml ของ supernatants ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ลงใน 1 ml ของ

1%w/v colloidal chitin ใน citrate phosphate buffer pH 5 บ่มที่ 50°C นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสหาปริมาณ reducing sugar โดยวิธี dinitrosalycilic acid (DNS) method (Driss et al., 2005)

9.2 ติดตามผลของปริมาณของคอลลอยดอลไคตินที่มีต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ในอาหารเหลว โดยแปรผันปริมาณของคอลลอยดอลไคตินจากเปลือกกุ้ง 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0% ในสูตรอาหาร Colloidal chitin medium (ดังข้อ 2) โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นสารละลายเส้นใยของแอคติโนมัยซิทส์ 10^8 cfu/ml ปริมาณ 1 ml ใส่ในอาหาร 100 ml ที่อยู่ใน 250 ml Erlenmeyer flask บ่มใน rotary shaker at 200 rpm ที่ 30°C นาน 5 วัน ติดตามการเจริญโดยวัด cell mass ของเชื้อปฏิปักษ์

9.3 เปรียบเทียบผลของ pH ที่มีต่อการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ในอาหารเหลวที่มี colloidal chitin โดยปรับ pH ของ Colloidal chitin medium ให้เป็น pH 5, 6, 7, และ 8 เปรียบเทียบ cell mass ของเชื้อปฏิปักษ์ที่สูงสุดในแต่ละ pH

9.4 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ในอาหารเหลวที่มี colloidal chitin โดยบ่มให้เชื้อเจริญที่ 25, 30, 35, และ 40°C เปรียบเทียบ cell mass ของเชื้อปฏิปักษ์ที่สูงสุดในแต่ละอุณหภูมิที่เลี้ยง

10. ทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซาน เชื้อปฏิปักษ์ และผลิตภัณฑ์ไคโตซานกับเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค Seedling damping off ในถั่วเหลือง

ทดสอบประสิทธิภาพของการใช้ chitosan อย่างเดียว การใช้เชื้อปฏิปักษ์อย่างเดียว และการใช้ chitosan ร่วมกับเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ศึกษาผลการปกป้องถั่วเหลืองต่อการเกิดโรค 2 แบบ คือ ติดตามเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองและเปอร์เซ็นต์การรอดจากการเป็นโรคของต้นกล้าถั่วเหลืองในสภาวะที่ดินถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *P. aphanidermatum*

10.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซิทส์มีการสร้างสปอร์ หลังจากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ aseptic technique เตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ให้มีแอคติโนมัยซิทส์ 10^8 cfu/ml ปริมาณที่ใส่คือ 1 ml ต่อดิน 1 Kg จะได้เชื้อราที่ 10^5 cfu/g ดิน

10.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพาะเลี้ยงลงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้รามีการสร้างสปอร์ หลังจากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ aseptic technique เตรียมสารละลายสปอร์ของรา (spore suspension) ให้มีเชื้อราที่ 10^8 cfu/ml ใส่ 1 ml ต่อดิน 1 Kg จะได้เชื้อราที่ 10^5 cfu/g ดิน

10.3 การเตรียมเมล็ดและต้นกล้าถั่วเหลือง

นำเมล็ดถั่วเหลืองมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 30 วินาที แล้วแช่ด้วยสารละลาย 0.1% ไฮโปคลอไรด์ นาน 5 นาที ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง แล้วแช่เมล็ดถั่วเหลืองไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงหรือจนเมล็ดถั่วเหลืองขยายขนาดเต็มที่ นำไปใช้สำหรับทดสอบการติดตามเปอร์เซ็นต์การงอกถั่วเหลือง

การเตรียมต้นกล้าถั่วเหลืองให้เตรียมฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดเหมือนเบื้องต้น แต่ให้นำเมล็ดมาเพาะให้งอกบนกระดาษทิชชูในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเมล็ดเริ่มงอกโดยมีรากยาวประมาณ 3-4 cm จึงนำไปใช้ปลูกในการติดตามเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้าถั่วเหลืองจากโรครา และโคนต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum*

10.4 การติดตามเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองในสภาวะที่มีการติดเชื้อราก่อโรค *P. aphanidermatum* การวางแผนการทดลองออกแบบเป็น complete randomized design โดยมีการจัดเตรียมดินทั้งหมด 6 treatments (ทรีทเมนท์) ทำ 3 ซ้ำ

ทรีทเมนท์ที่ 1 ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เรียกเป็นชุดควบคุม “Control”

ทรีทเมนท์ที่ 2 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำให้มีการปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* เรียกเป็น “P”

ทรีทเมนท์ที่ 3 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคลุกด้วยสารละลายสปอร์ของเชื้อปฏิปักษ์ เรียกเป็น “A”

ทรีทเมนท์ที่ 4 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อคลุกด้วยสารละลายสปอร์ของเชื้อปฏิปักษ์ แล้วให้มีการปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* เรียกเป็น “A+P”

ทรีทเมนท์ที่ 5 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อคลุกด้วยสารละลายไคโตซาน (400mg/l) แล้วทำให้มีการปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* เรียกเป็น “C+P”

ทรีทเมนท์ที่ 6 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อคลุกด้วยสารละลายสปอร์ของเชื้อปฏิปักษ์ และสารละลายไคโตซาน(400mg/l) แล้วทำให้มีการปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* เรียกเป็น “A+C+P”

ติดตามเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเป็นต้นกล้า การทดลองทำทรีทเมนท์ละ 3 กระถาง (ทำ 3 ซ้ำ) ใช้เมล็ดถั่วเหลือง 10 เมล็ดต่อกระถาง

10.5 การติดตามเปอร์เซ็นต์การรอดจากโรคของต้นกล้าถั่วเหลือง เตรียมดินและเตรียมเชื้อเช่นเดียวกับการทดสอบติดตามเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเป็นต้นกล้า แต่ใช้ถั่วเหลืองที่ผ่านการเพาะให้มีรากงอกยาว 3-4 cm เพาะลงในดินที่เตรียมแบบเดียวกับข้อ 10.5 การทดลองทำทรีทเมนท์ละ 3 กระถาง (ทำ 3 ซ้ำ) ใช้ต้นกล้าถั่วเหลือง 10 ต้นต่อกระถาง ติดตามเปอร์เซ็นต์การรอดไม่เป็นโรคของต้นถั่วเหลือง

10.6 การประเมินผลที่ได้จากการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้จากต้นถั่วเหลืองที่เจริญ โดยแยกออกเป็นการวัดการเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการรอดของต้นกล้าถั่วเหลือง นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยทำ Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนท์ด้วยวิธี Least significant difference (LSD) โดยใช้ระดับนัยสำคัญ คือ α=0.05