บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเพื่อใช้ในการย่อยสลายใบชาและการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและฮอร์โมนพืช IAA

เนื่องจากใบชามีลักษณะผิวใบเป็น**ผิวมัน** (waxy leaves) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันกับผิวของใบลำไยซึ่งเป็นใบพืชที่มีการย่อยสลายยาก จึงได้ทำการแยกจุลินทรีย์จากหลายแหล่งเพื่อให้มีโอกาสเพิ่มขึ้นที่จะได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพ ได้ทำการแยกทั้งจากใบลำไย ใบชา และจากดิน เพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายใบมันดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปผสมกับปุ๋ยอินทรีย์และ/หรือปุ๋ยชีวภาพในการทดลองในภาคสนามต่อไป

2.1.1 การแยกแอคติโนมัยซีส (Actinomycetes) จากใบลำไย

เลือกใบลำไยที่อยู่บริเวณใต้ต้นลำไยและมีลักษณะผุพังจากการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ นำใบลำไยดังกล่าวมาชั่งประมาณ 2 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 95 มล. แล้วนำไปเขย่า 20 นาที ดูด suspension 1 มิลลิลิตร (mL) ทำให้สารละลายผสมที่ดูดมาทำการเจือจางลง (dilution)ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} ดูดแต่ละ dilution มา 100 ไมโครลิตร (µL) มาทำ spread plate บนอาหาร IMA (Inhibitory Mold Agar) (ภาคผนวก) ซึ่งมีส่วนผสมของสารกลุ่ม antibiotics ที่ยับยั้งแบคทีเรีย (bacteria) และเชื้อรา (fungi) ทำการเพาะอาหาร (incubate) ทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน ถ้ามีเชื้อจะพบ colony ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แตะ colony แล้วนำมาเขี่ย (streak) บนอาหาร IMA จานใหม่เพื่อแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว(single colony)ทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก)

2.1.2 การแยกแอคติโนมัยซีสจากดินบริเวณโคนต้นลำไย

สุ่มเก็บดินบริเวณโคนต้นลำไย (เลือกที่มีใบลำไยผุพังอยู่ด้วย) นำดินมาชั่ง 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 95 mL นำไปเขย่า 20 นาที จากนั้นดูดมา 1 mL ทำเป็น dilution 10^{-1} และเจือจางต่อไปจนถึง 10^{-5} ดูดแต่ละ dilution มา 100 µL มาทำ spread plate บนอาหาร IMA ที่ผสม ที่ยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา ทำการเพาะอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน ถ้ามีเชื้อจะพบ colony ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ แตะ colony แล้วนำมาเขี่ย บนอาหาร IMA จานใหม่เพื่อแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว ทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหาร NA

2.1.3 การแยกแอคติโนมัยซีสจากผิวใบลำไยและผิวใบชา

เลือกใบลำไยและใบชาที่แห้งและร่วงหล่นอยู่ใต้ต้นโดยเลือกใบที่มีจุดการเข้าย่อยของจุลินทรีย์ ใช้ loop สะกิดจุดที่มีจุลินทรีย์ย่อยใบ มา streak บนอาหาร IMA ซึ่งมีส่วนผสมของสารกลุ่ม antibiotic ที่ยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา ทำการเพาะอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน ถ้ามีเชื้อจะพบ colony ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ แตะ colony แล้วนำมาเขี่ย บนอาหาร IMA จานใหม่เพื่อแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว ทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหาร NA

2.1.4 การประเมินศักยภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellullase) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกได้

นำเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.3 มาทำการประเมินศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) โดยใช้อาหาร CMC (carboxy methyl cellulose) (ภาคผนวก) โดยเริ่มจากการนำเชื้อแต่ละ isolate ที่เก็บไว้นำมาเลี้ยงบนอาหาร IMA จนโตเต็มที่แล้วจึงใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร ตัดเชื้อบริสุทธิ์แอคติโนมัยซีส (Actinomycetes) จากวุ้นอาหารของเชื้อแต่ละชนิด แล้วนำไปวางบนอาหาร CMC ทำการบ่มเพาะไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25-30 °c เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการย่อย cellulose ที่มีในอาหารโดยการย้อมสี หลังการย้อมสีจะมองเห็นการสร้าง clear zone ของเชื้อ Actinomycetes ซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกถึงศักยภาพในการผลิต cellulase การย้อมสีทำโดยเทสารละลาย 0.1 % Congo red จนท่วมเชื้อที่อยู่ในจานอาหาร ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างด้วย NaCl 1M จำนวน 3 ครั้ง ทำการหาค่า clear zone ratio โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ค่า clear zone ratio} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของ colony เชื้อ}}$$

2.1.5 *การประเมินศักยภาพในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA (Indole Acetic Acid)*

เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จาก ข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.3 ได้นำมาทำการประเมินศักยภาพในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA (Indole-3-acetic-Acid) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ซึ่งมีการเติม tryptophan 1 กรัม/อาหารเหลว 1 ลิตร (ภาคผนวก) ใส่อาหาร NB ลงในขวดชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 mL ในปริมาณ 25 mL จากนั้นตัดเชื้อที่ขึ้นในอาหารโดยใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร 1 cork ใส่ลงในอาหารที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นทำการห่อ flask ด้วยแผ่นอลูมินัมฟอยล์ (Aluminum Foil) ทำการเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 7 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หา IAA ในขวดอาหารโดยทำการกรองแยกเชื้อที่ขึ้นใน Erlenmeyer flask ออกจากสารละลายโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายใสที่กรองได้ของแต่ละตัวอย่าง มา 1 mL ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม salkovskii reagent (ภาคผนวก) 2 mL เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร(nm) โดยใช้ spectrophotometer โดยทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลกับสารละลายมาตรฐาน (Standard Solution) (ภาคผนวก) สารเคมีที่ใช้เป็น Standard คือ Indole-3-acetic acid (MW = 175.19) โดยการเตรียม IAA ให้มีความเข้มข้น 10 mM โดยสารละลายนี้จะ ใช้เป็น stock solution (ละลาย IAA ใน 50% Methanol) แล้วจึงเจือจาง สารละลาย IAA 10 mM ให้เป็น 1 mM ด้วย 50% Methanol ใช้สารละลาย IAA ที่มีความเข้มข้น 1 mM นี้ในการเตรียมชุดสารละลายมาตรฐาน (standard series) ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100 และ 150 µM โดยเตรียมแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 mL ปรับปริมาตรด้วย 50% Methanol โดยทำการดูดสารละลาย (pipette) standard แต่ละความเข้มข้น 1 mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วเติม salkovskii reagent 2 mL เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืดเช่นเดียวกับตัวอย่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm โดยใช้ spectrophotometer

2.1.6 *การประเมินประสิทธิภาพในการละลายฟอสฟอรัสของเชื้อแอคติโนมัยซีส*

2.1.6.1 ประเมินประสิทธิภาพในการละลายฟอสฟอรัสโดยใช้อาหาร Czapek's agar ที่มีส่วนผสมของ Aluminum phosphate (ภาคผนวก) โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อแต่ละ isolates ในอาหาร IMA จนโตเต็มที่ก่อนแล้วจึงใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร ตัดเชื้อบริสุทธิ์ Actinomycetes ของเชื้อแต่ละชนิดจากวุ้นอาหาร แล้วนำไปวางบนอาหาร

Czapek's agar (ภาคผนวก) ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เพื่อดูการสร้าง clear zone ของเชื้อ Actinomycetes ทำการหาค่า clear zone ratio โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ค่า clear zone ratio} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของ colony เชื้อ}}$$

2.1.7 การแยกและขยายเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากและดินบริเวณรากต้นชา

วิธีการคัดแยกสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

(1) ตรวจสอบลักษณะเชื้อราไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) ในธรรมชาติ

เก็บดินจากบริเวณรอบรากต้นชา (Rhizosphere) มาคัดแยกชนิดของสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular Mycorrhiza) โดยวิธี wet-sieving และ 50% sucrose gradient centrifugation จากนั้นคัดแยกชนิดของสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาออกตามลักษณะสัณฐานวิทยา โดยตรวจสอบจากลักษณะต่างๆ คือ รูปร่างสปอร์ สีและขนาดของสปอร์

วิธีการคัดแยกและการนับสปอร์ ทำโดยการนำดินประมาณ 100 กรัม แช่ในน้ำ 400 มล. ทิ้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นคนด้วยแท่งแก้ว 10 นาที ปล่อยไว้ให้ตกตะกอน 1 นาที แล้วเทผ่านตะแกรงขนาด 2.0 มิลลิเมตร (mm), 850, 500, 250, 125 และ 45 ไมโครเมตร (μm) ล้างดินส่วนที่ค้างในตะแกรงขนาด 45 และ 125 μm.ไปปั่นเหวี่ยงกับน้ำสะอาด ที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสและตะกอนที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้ง และเหลือตะกอนดินอยู่ก้นหลอด จากนั้นเติมสารละลาย 50% sucrose แล้วเขย่าเพื่อให้ตะกอนก้นหลอดกระจายตัวอยู่ในสารละลาย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที สปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะลอยอยู่ในสารละลาย sucrose จากนั้นเทสารละลาย sucrose ลงในภาชนะรองที่มีขนาด 20 μm. แล้วล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นล้างสปอร์ที่ติดบนตะแกรงลงบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 ทำการเก็บสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope ที่กำลังขยาย 40 เท่า หรือเก็บสปอร์ไว้ใน Ringer solution ซึ่งเป็นสารละลายที่ช่วยรักษาการรอดชีวิตของสปอร์ จากนั้นนำสปอร์ใส่ใน Ringer solution โดยวัดปริมาตร 25 mL คนให้สปอร์กระจายตัวในสารละลาย แล้วใช้กระบอกตวงมา 1 mL ใส่ในกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 ทำการนับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ

stereo ที่กำลังขยาย 4 เท่า โดยทำการนับ 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย นำมาเปรียบเทียบกับปริมาตร 25 มล. นำมาคำนวณเป็นจำนวนสปอร์/มิลลิลิตร

(2) การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการทดลอง

เนื่องจากสปอร์ที่เก็บในแปลงซามีปริมาณน้อยมาก จึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณสปอร์ โดยการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับข้าวโพด โดยปลูกข้าวโพดในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการคัดแยกสปอร์ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น การเพาะกล้าข้าวโพดและการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีวิธีการดังนี้

ก่อนทำการเพาะเมล็ดข้าวโพด ได้ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดก่อน โดยเทเมล็ดที่จะเพาะทั้งหมดใส่ใน สารละลาย 95% ethanol ทำการเขย่า 3 นาที แล้วจึงเทสารละลายออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เทเมล็ดลงในสารละลาย 3% H_2O_2 เขย่าอีก 1 นาที แล้วเทสารละลายออก หลังจากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 4-5 ครั้ง จนแน่ใจว่าไม่มีสารละลาย 3% H_2O_2 ตกค้างที่ผิวเมล็ด เพราะถ้ามีตกค้างอาจมีผลเสียต่อความงอกของเมล็ดได้ เมื่อทำการฆ่าเชื้อผิวเมล็ดข้าวโพดแล้ว จึงทำการเพาะเมล็ดข้าวโพด ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษรองด้านในซึ่งได้นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน หลังจากเมล็ดงอกและได้ต้นกล้าที่มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร หลังจากนั้นจึงปลูกต้นกล้าลงในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้แล้วจำนวน 1 ต้นต่อหลุม ในระหว่างการปลูกทำการปลูกเชื้อ (inoculate) สปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาลงไปบริเวณรากโดยให้สปอร์สัมผัสรากข้าวโพดด้วย หลังจากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้แสงที่มีความเข้ม 75,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชม./วัน รดด้วยสารละลาย ¼ Hoagland (ภาคผนวก) จนครบ 1 เดือน หลังจากนั้น ทำการเก็บจำนวนสปอร์ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

2.1.8 การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในการย่อยสลายใบชาในเรือนทดลอง

วิธีการทดสอบการย่อยสลายของใบชา

ทำการทดลองหมักใบชาที่ได้จากการตัดแต่งกิ่งใบชาจากสวนของบริษัทชาระมิงค์ จำกัด นำมาหมักกับมูลวัว โดยใช้สัดส่วนของใบชาต่อมูลวัวโดยปริมาตร 10 ส่วนต่อ มูลวัว 4 ส่วน และเพิ่มเติมเชื้อจุลินทรีย์ Actinomycetes ที่คัดกรองจากข้อ 3.1.4 แล้วว่ามีศักยภาพสูงในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส มา 3 isolates (LGLA 02-021, LGLA 01-015, LGLA 03-026) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยใบชาของแต่ละเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมโดยมีตำรับที่ ไม่ใส่เชื้อ และ ใส่หัวเชื้อปุ๋ยหมักซุปเปอร์พด. 1 เปรียบเทียบด้วย โดยมีกรรมวิธีการทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 (Tr. 1) ไม่ใส่เชื้อ
กรรมวิธีที่ 2 (Tr. 2) ใส่เชื้อ LGLA 02-021
กรรมวิธีที่ 3 (Tr. 3) ใส่เชื้อ LGLA 01-015
กรรมวิธีที่ 4 (Tr. 4) ใส่เชื้อ LGLA 03-026
กรรมวิธีที่ 5 (Tr. 5) ใส่เชื้อผสม LGLA 02-021 +LGLA 01-015+ LGLA 03-026
กรรมวิธีที่ 6 (Tr. 6) ใส่ซุปเปอร์พด. 1

ทำการหมักส่วนผสมตามกรรมวิธีต่างๆในตะกร้าขนาด 35 * 45 เซนติเมตร ในเรือนทดลอง ให้แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ตามผังการทดลองข้างล่าง ทำการรดน้ำให้มีความชื้นพอเหมาะและทำการกลับส่วนผสมตามระยะเวลา เช่นเดียวกับการผลิตปุ๋ยหมักกองใหญ่ โดยใช้ระยะเวลาหมักประมาณ 3 เดือน ในระหว่างการหมักทำการตรวจสอบลักษณะการย่อยสลายของใบชา ที่ระยะเวลา 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน

ผังการทดลอง

Block 1	Tr.1	Tr.5	Tr.6	Tr.2	Tr.3	Tr.4
Block 2	Tr.2	Tr.6	Tr.4	Tr.5	Tr.1	Tr.3
Block 3	Tr.6	Tr.2	Tr.1	Tr.4	Tr.3	Tr.5

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 28 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน 246383
เลขเรียกหนังสือ

2.2 การทดสอบผลของปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพและปุ๋ยชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของดิน ผลผลิต และคุณภาพผลผลิตของชา ในภาคสนาม

2.2.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปใช้ในการทดลองภาคสนาม

ได้ทำการคัดเลือกเชื้อที่แยกได้และได้ประเมินศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้คัดเลือกเชื้อ LGLA03-021 ซึ่งมี clear zone ratio สูงสุดคือ 7.65 แต่การขยายเชื้อให้มีปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ในภาคสนามมีปัญหาเนื่องจากเชื้อมีการเพิ่มปริมาณเชื้อช้ามาก จึงต้องเลือกเชื้อที่มี clear zone ratio สูงรองลงมา (6.25) คือเชื้อ LGLA02-021 ซึ่งเมื่อทำการขยายเชื้อแล้วจึงนำไปผสมกับปุ๋ยหมักเพื่อใช้ทดสอบในแปลงทดลอง โดยเมื่อเชื้อนี้เมื่อมีการขยายตัวในแปลงทดลอง ในระยะสั้นและระยะยาวสามารถมีบทบาทในการย่อยสลายใบชาที่ร่วงหล่นและที่ได้จากการตัดแต่งกิ่ง

นอกจากเชื้อในกลุ่มที่ได้คัดกรองจากโครงการก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยแล้วคือ จุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจนได้แก่ *Azospirillum*, *Azotobacter* และ *Beijerinckia* จุลินทรีย์กลุ่มละลายฟอสฟอรัสคือ *Penicillium* และ จุลินทรีย์กลุ่มละลายโพแทสเซียมคือ *Bacillus*

กรรมวิธีที่ได้กำหนดไว้ก่อนการทดลอง มี 3 กรรมวิธี (Treatment) คือ

1) การจัดการแบบที่เกษตรกรนิยมปฏิบัติในบริเวณพื้นที่ส่งเสริมของไร่ชารมิงค์ เป็นแปลงควบคุม

2) ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ผสมร่วมกับ จุลินทรีย์แอคติโนมัยซีส (actinomycetes), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* และ *Penicillium*

3) *ใช้จุลินทรีย์ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) ร่วมกับ อโซสไปริลลัม (*Azospirillum*)

รวมหน่วยการทดลองเท่ากับ 3 X 3 = 9 หน่วยการทดลอง แต่ละหน่วยพื้นที่ประมาณ 1 งาน แผนผังการทดลองดังแสดงในแผนภาพ หน้า 17

*สำหรับ**กรรมวิธีที่** 3 นั้น **ไม่มีการใส่จุลินทรีย์ไมคอร์ไรซา** เนื่องจากปริมาณไมคอร์ไรซาที่แยกได้ครั้งแรกมีน้อยมาก และหลังจากทำการขยายปริมาณสปอร์โดยใช้ข้าวโพดแล้วก็ยังมีปริมาณไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงได้ปรับกรรมวิธีที่ 3 โดยไม่มีการใช้ไมคอร์ไรซา

2.2.2 แผนการทดลองการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในแปลงปลูกชา

การแก้ไขปัญหาความอุดมสมบูรณ์ดินในพื้นที่ปลูกชาที่ปรับเปลี่ยนมาสู่การผลิตในระบบอินทรีย์นั้น การใช้ปุ๋ยอินทรีย์และการใช้ปุ๋ยชีวภาพก็เป็นอีกแนวทางหนึ่ง ที่จะช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ดิน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ และปุ๋ยชีวภาพ ในการเพิ่ม

ความอุดมสมบูรณ์ดินในการผลิตชาอินทรีย์บนพื้นที่สูง ในแปลงชาพันธุ์อัสสัม ของไร่ชาระมิงค์ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design : RCBD ใน 2 พื้นที่ที่มีลักษณะการได้รับแสงแดดที่แตกต่างกัน คือ 1. พื้นที่ที่ต้นชาอยู่ภายใต้ร่มเงา และ 2. พื้นที่ที่ต้นชาอยู่กลางแจ้ง พื้นที่ละจำนวน 3 Blocks และ 3 กรรมวิธี (Treatment) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. (Tr.1) เป็นกรรมวิธีควบคุม (Control) ไม่มีการใช้ปุ๋ย สำหรับการจัดการแปลงปลูกจะเป็นแบบที่เกษตรกรนิยมปฏิบัติในบริเวณพื้นที่ส่งเสริมของไร่ชาระมิงค์

กรรมวิธีที่ 2. (Tr.2) เป็นกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) ร่วมกับปุ๋ยหมัก เรียกว่า ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ ซึ่งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพใส่ในรอบการเก็บผลผลิตช่วงที่สอง ซึ่งได้เพิ่มเติมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ผสมในปุ๋ยอินทรีย์ด้วย (ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.1) (<u>จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์</u>: การใส่ปุ๋ยรอบการเก็บผลผลิตครั้งที่ 1 ผสม Actinomycetes, *ช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุ* เนื่องจากมีใบชาที่ร่วงหล่นและจากการตัดแต่งกิ่งบางส่วนที่อยู่บริเวณใต้ต้นชาจึงคาดว่าการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในดินจะได้ผลดีในแง่การเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ช่วยย่อยสลายในดินระดับหนึ่ง; การใส่ปุ๋ยอินทรีย์รอบการเก็บผลผลิตครั้ง 2 ได้มีการเพิ่มเติมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์โดยผสมในปุ๋ยอินทรีย์และทำการหมักต่ออีกประมาณ 1 เดือน จึงนำไปใส่ในแปลงทดลองคือ *จุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจน Azospirillum, Azotobacter และ Beijerinckiaจุลินทรีย์กลุ่มละลายฟอสฟอรัส Penicillium จุลินทรีย์กลุ่มละลายโพแทสเซียม Bacillus*

กรรมวิธีที่ 3. (Tr.3) ปุ๋ยชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์ อโซสไปริลลัม (*Azospirillum*) ในช่วงแรก และเพิ่มเติมปุ๋ยชีวภาพคือ จุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Azotobacter และ Beijerinckia* จุลินทรีย์กลุ่มละลายฟอสฟอรัสคือ *Penicillium* และจุลินทรีย์กลุ่มละลายโพแทสเซียม *Bacillus* (ตารางที่ 2.1)

รวมหน่วยการทดลองเท่ากับ 3 X 3 = 9 หน่วยการทดลอง แต่ละหน่วยพื้นที่ประมาณ 1 งาน แผนผังการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แผนการใส่ปุ๋ยในแปลงทดลอง

กรรมวิธีการทดลอง	รอบการเก็บผลผลิตครั้งที่ 1[1] ปี พ.ศ. 2551		ช่วงที่ชาไม่ให้ผลผลิตและช่วงตัดแต่งกิ่งชา[2]	รอบการเก็บผลผลิตครั้งที่ 2[3] ปี พ.ศ. 2552	
	ครั้งที่ 1 กลางเดือนสิงหาคม 2551	ครั้งที่ 2 กลางเดือนกันยายน 2551	*เดือนธันวาคม ถึง มีนาคม*	ครั้งที่ 1 11 กุมภาพันธ์ 2552	ครั้งที่ 2 24 มิถุนายน 2552
กรรมวิธีที่ 1 (Tr. 1)	-	-	ชามีการแตกยอดน้อยหรือไม่มีเลยเพราะเป็นช่วงฤดูหนาว และเป็นช่วงหน้าแล้งไม่มีน้ำฝน	-	-
กรรมวิธีที่ 2 (Tr. 2)	ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับจุลินทรีย์ Actinomycetes ในอัตรา 1.9 กิโลกรัม/ต้น	ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับจุลินทรีย์ Actinomycetes ในอัตรา 1.9 กิโลกรัม/ต้น		ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับจุลินทรีย์ Actinomycetes ในอัตรา 1.9 กิโลกรัม/ต้น	ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับจุลินทรีย์ Actinomycetes *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Penicillium* และ *Bacillus* ในอัตรา 1.9 กิโลกรัม/ต้น
กรรมวิธีที่ 3 (Tr. 3)	ใช้จุลินทรีย์ *Azospirillum* (100 กรัม/ต้น)	-		ใช้จุลินทรีย์ *Azospirillum* (100 กรัม/ต้น)	ใช้จุลินทรีย์ *Azospirillum* เพิ่มเติมจุลินทรีย์ *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Penicillium* และ *Bacillus* (100 กรัม/ต้น)

[1] *เริ่มการทดลองในแปลงครั้งแรกโดยใช้จุลินทรีย์ที่ได้คัดกรองจากผลการวิจัยก่อนหน้าและในครั้งนี้ของคณะผู้วิจัย;*

[2] *ช่วงเข้าสู่ฤดูหนาวซึ่งชาให้ผลผลิตน้อย และมีการตัดแต่งกิ่งชา และไม่มีน้ำเนื่องจากไร่ชาระมิงค์อาศัยเฉพาะน้ำฝนในการผลิตชา จึงไม่มีกิจกรรมการวิจัยในแปลงทดลอง มีเฉพาะในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองเท่านั้น*

[3] *เป็นช่วงที่ชาเริ่มแตกใบใหม่เนื่องจากเริ่มมีฝนตกบ้างประมาณต้นเมษายน และสามารถดำเนินงานในแปลงทดลองต่อได้*

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

แปลงในร่มเงา

Block 1		
1 Tr2	2 Tr3	3 Tr1

Block 2		
4 Tr3	5 Tr2	6 Tr1

Block 3		
7 Tr2	8 Tr1	9 Tr3

แปลงกลางแจ้ง

Block 1		
10 Tr3	11 Tr2	12 Tr1

Block 2		
13 Tr3	14 Tr1	15 Tr2

Block 3		
16 Tr3	17 Tr2	18 Tr1

ภาพที่ 2.1 ผังแปลงทดลอง ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีการทดลองประกอบไปด้วยต้นชาประมาณ 70-80 ต้น (รายละเอียดของ Treatment 1, 2 และ 3 ดังแสดงในตารางที่ 2.1)

ปุ๋ยหมักที่ใช้ในกรรมวิธีที่ 2 เป็นปุ๋ยหมักจากฟางข้าว และ ปุ๋ยหมักจากเปลือกกาแฟที่ย่อยสลายสมบูรณ์แล้ว ซึ่งได้นำมาผสมกันในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร และนำ**ปุ๋ยหมักผสม**มาใช้เป็นปัจจัยการผลิตในไร่ชาระมิงค์ หลังจากทำการผสมแล้ว นำเชื้อจุลินทรีย์แอคติโนมัยซีสตัวที่ได้คัดเลือกคือ LGLA02-021 **มาผสมกับปุ๋ยหมักผสม** ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 เซลล์/ กรัม ปุ๋ยหมัก

อัตราการใส่ปุ๋ยหมักผสมใส่ในอัตรา 3 ตันต่อไร่ โดยคิดเฉลี่ยว่ามีต้นชาประมาณ 800 ต้นต่อไร่ ดังนั้นปุ๋ยหมักผสมที่ใส่ต่อต้นเป็น ประมาณ 3.75 กิโลกรัม/ต้น โดยที่จะแบ่งใส่เป็น 2 ครั้งคือ

ครั้งที่ 1 ประมาณกลาง สิงหาคม 2551

ครั้งที่ 2 ประมาณกลางเดือน กันยายน 2551

ปุ๋ยชีวภาพที่ใช้ในกรรมวิธีที่ 3 เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ปุ๋ยหมักร่อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุรองรับ มีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นประมาณ 10^9 เซลล์/ กรัม โดยอัตราที่ใช้คือ 100 กรัม/ต้น

ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างพื้นที่แปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ; พื้นที่ที่ต้นชาอยู่ภายใต้ร่มเงา (บน) และ พื้นที่ที่ต้นชาอยู่กลางแจ้ง (ล่าง)

2.2.3 การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล

(1) เก็บตัวอย่างดิน : เก็บตัวอย่างดินแบบ composite sampling ของดินที่ปลูกชาในแต่ละกรรมวิธี นำไปผึ่งให้แห้งในร่ม ก่อนนำไปบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มม. แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาสมบัติต่างๆของดิน ได้แก่ค่า ความเป็นกรดด่างของดิน (pH), ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity-EC), อินทรียวัตถุ (Organic Matter-OM), ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P), โพแทสเซียม แคลเซียม และ แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable K, Ca, Mg), ซัลเฟอร์ และ โบรอน ที่สกัดได้ (Extractable S, B) และ เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และ สังกะสี ที่สกัดโดย DTPA (DTPA-Fe, DTPA-Mn DTPA-Cu และ DTPA-Zn)

(2) เก็บตัวอย่างใบชา: การเก็บตัวอย่างใบชา จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เก็บใบชาเพื่อนำมาหาความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบชา โดยเก็บใบชาตำแหน่งที่ 3 (young mature leaves) ของแต่ละกรรมวิธีการทดลอง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปบดให้ละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม. ก่อนนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบพืช ได้แก่ ไนโตรเจน (Nitrogen-**N**), ฟอสฟอรัส (Phosphorus-**P**), โพแทสเซียม (Potassium-**K**), แคลเซียม (Calcium-**Ca**), แมกนีเซียม (Magnesium-**Mg**), เหล็ก (Iron-**Fe**), แมงกานีส (Manganese-**Mn**), ทองแดง (Copper-**Cu**), สังกะสี (Zinc-**Zn**) และ โบรอน (Boron-**B**)

สำหรับส่วนที่ 2 เป็นการเก็บตัวอย่างยอดชาอ่อน (ในระยะที่นำไปผลิตชาเขียว) ของแต่ละกรรมวิธีการทดลอง แล้วนำไปหาสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในกลุ่มคาเทชิน (Catechin) ซึ่งได้แก่ Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatichin 3-gallate (EGCG) Epicatechin gallate ECG และ คาเฟอีน (Caffeien) ตามกรรมวิธีของ Saito *et. al.*, (2007)

(3) เก็บบันทึกข้อมูลผลผลิตยอดชาในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

2.3 การสำรวจโรคในแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ

นอกจากงานทดสอบปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในแปลงชาแล้ว ได้ทำการสำรวจและประเมินโรคที่เกิดกับต้นชาในแต่ละแปลงทดลอง โดยสุ่มต้นชามาทั้งหมดแปลงละ 8 ต้น นับจำนวนใบชาที่แสดงอาการของโรค และประเมินความรุนแรงของโรค โดยคิดเป็น เปอร์เซ็นต์พื้นใบที่ถูกทำลายต่อใบชาที่แสดงอาการของโรค พบว่า จากการสำรวจต้นชาทั้งหมด 144 ต้น ตามแผนภาพข้างล่าง

แปลงในร่มเงา				
Plot No.	Block I	Block II	Block III	จำนวนต้นชาที่สำรวจโรค
1	Tr. 2			8
2	Tr. 3			8
3	Tr. 1			8
4		Tr. 3		8
5		Tr. 2		8
6		Tr. 1		8
7			Tr. 2	8
8			Tr. 1	8
9			Tr. 3	8
แปลงกลางแจ้ง				
Plot No.	Block I	Block II	Block III	จำนวนต้นชาที่สำรวจโรค
10	Tr. 3			8
11	Tr. 2			8
12	Tr. 1			8
13		Tr. 3		8
14		Tr. 1		8
15		Tr. 2		8
16			Tr. 3	8
17			Tr. 2	8
18			Tr. 1	8

2.4 การแยกเชื้อและการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคชาในแปลง

นอกจากการสำรวจโรคในแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพแล้ว ทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการสำรวจและแยกเชื้อสาเหตุของโรคชา **ในอีกบริเวณหนึ่งซึ่งห่างจากพื้นที่ทดลองปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพประมาณ 3 กิโลเมตร แต่เป็นพื้นที่ในบริเวณของ บริษัทไร่ชาระมิงค์เช่นกัน** ซึ่งพื้นที่นี้เป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสูง และมีอัตราการตายของชาสูง (ภาพที่ 2.3) ทั้งนี้เพื่อเป็นการวินิจฉัยสาเหตุเบื้องต้น และหาแนวทางแก้ไขในเบื้องต้นให้ผู้ประกอบการและเกษตรกรที่ประสบปัญหาคล้ายกันดังกล่าว

2.4.1 การสำรวจและการแยกเชื้อสาเหตุโรค

แบ่งกลุ่มพื้นที่ในการสำรวจโรคของชาในแปลงปลูกของบริษัทชาระมิงค์ อ. แม่แตง จ . เชียงใหม่ โดยเน้นในพื้นที่ ที่มีปัญหาพืชยืนต้นตาย และมีลักษณะการลุกลามจากต้นที่แสดงอาการไปยังต้นปกติ เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค ทั้งในส่วนของ ใบอ่อน ใบแก่ กิ่งก้าน ลำต้น ราก รวมถึงดินบริเวณรากพืชที่แสดงอาการ นำมาศึกษา แยกเชื้อสาเหตุ และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค จากนั้นนำตัวอย่างที่ต้องมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการตามวิธีที่เหมาะสมตามชนิดของเชื้อ เช่น ดังนี้

2.4.2 กลุ่มเชื้อรา

นำชิ้นส่วนของพืชที่แสดงอาการ มาฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อเชื้อเจริญ แยกเชื้อจากชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงบนอาหาร PDA และแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธี hyphal tip isolation โดยใช้ capillary ตัดปลายเส้นใยนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อบน PDA เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ส่วนการแยกเชื้อจากดินรอบ ๆ รากพืชที่แสดงอาการของโรคนำมาแยกเชื้อโดยใช้วิธี soil dilution และเลี้ยงเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหาร PDA เมื่อตรวจพบการเจริญของเชื้อ นำมาตรวจสอบและแยกเชื้อบริสุทธิ์

2.4.3 กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย

แยกเชื้อแบคทีเรียจากชิ้นส่วนของพืชที่แสดงอาการนำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหาร NA โดยการ streak plate เมื่อพบโคโลนีเดี่ยว เจริญบนผิวหน้าอาหาร ใช้ loop ย้ายโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารใหม่โดยการวิธี streak plate อีกครั้ง และเมื่อได้โคโลนีเดี่ยวเช่นเดียวกับครั้งแรก จึงนำเชื้อที่ได้ไปเก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในหลอดทดลอง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 2.3 ต้นชาที่แสดงอาการของโรคแห้งตายที่รุนแรง พื้นที่ที่ต้นชาบริเวณรอบยังดีอยู่ (บน) และ บริเวณที่ต้นชาโดยรอบเริ่มมีอาการโรคประปราย (ล่าง)

2.4.4 กลุ่มไส้เดือนฝอย

การแยกจากชิ้นพืช เก็บตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยโดยการนำชิ้นส่วนของพืช และดินบริเวณรากพืชที่แสดงอาการผิดปกติมาตรวจหาไส้เดือนฝอย โดยใช้ วิธีการพ่นหมอก (mist extraction) และวิธีใช้กรวยกรอง (bermann funnel) ตามลำดับ ทั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์ในการตรวจสอบโดย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.5 การแยกและการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส และเชื้อแอคติโนมัยซีส เอนโดไฟท์

แยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ จากใบและรากชา โดยการนำใบชาประมาณคู่ที่ 2-3 นับจากยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่มีโรค มาล้างน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที – 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผึ่งลมให้หมาด เลือกตัดแผ่นใบให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร โดยเลือกสุ่มตัดจากหลายบริเวณ นำชิ้นพืชที่เลือกได้ไปฆ่าเชื้อที่ผิวใบ โดยแช่ใน NaOCl 1% เป็นเวลา 2 นาที แช่ต่อใน EtOH 70% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแล้ว แช่ใน Heritage ต่ออีก 1 นาที ก่อนนำไปวางบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อ 24-48 ชั่วโมง เมื่อชิ้นพืชแห้ง จึงนำไปวางบนอาหารสูตร IMA2 ประมาณ 15 ชิ้น ต่อหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1-2 เดือน เมื่อพบการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส จึงทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเชื้อไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีส และแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ ที่ใช้ในการทดลองควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคชา แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

ก. เชื้อแอคติโนมัยซีส ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำมาเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร IMA2 จำนวน 16 ไอโซเลท (CSAL 01-016)

ข. เชื้อแอคติโนมัยซีสเอ็นโดไฟท์ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ปิยะธิดา, 2549) นำมาเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร IMA2 จำนวน 5ไอโซเลท (KAE1, KMI1, FIT1, GAR1 และ TIN1)

ค. เชื้อแอคติโนมัยซีสโดไฟท์ 36 ไอโซเลท ที่แยกจากลำต้นและใบของพืชสมุนไพร 6 ชนิด ใช้เฉพาะการทดสอบควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* sp.

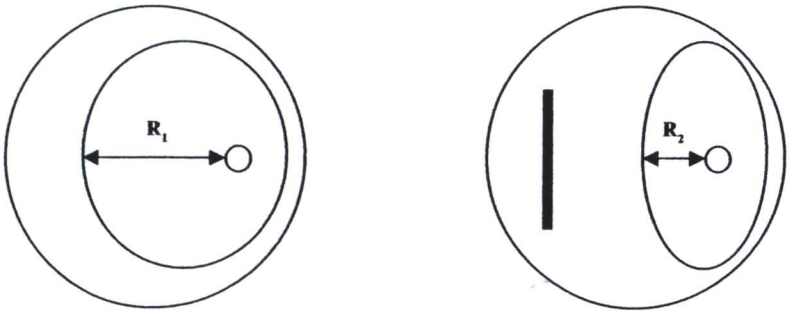
ง. เชื้อแอคติโนมัยซีสโดไฟท์ 35 ไอโซเลท ที่แยกจากลำต้นและใบของพืชสมุนไพร 12 ชนิด ใช้เฉพาะการทดสอบควบคุมเชื้อ *Phellinus noxius*

2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีส

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีส และแอคติดนมัยซีสเอนโดไฟท์ ในการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคชาที่สำคัญ ได้แก่ โรคใบจุดแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และโรคต้นโทรม หรือ โรครากเน่าโคนเน่าสีน้ำตาลของชา ที่เกิดจากเชื้อรา *P. noxius* ด้วยวิธี Dual culture โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสบนอาหาร IMA-2 บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำชิ้นเชื้อ (culture disc) ขนาด 0.5 เซนติเมตร ของเชื้อสาเหตุโรคแต่ละชนิดวางตรงข้ามห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีส 4 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.4)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 4 ซ้ำ ต่อเชื้อแอคติโนมัยซีสแต่ละไอโซเลท เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว เมื่อเชื้อสาเหตุเจริญเกือบเต็มจานอาหาร จึงวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ (ภาพที่ 2.4) แล้วนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth; %PIRG)

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



ภาพที่ 2.4 การวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม (R_1) และชุดทดสอบ (R_2) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ