บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดแยกไรโซแบคทีเรีย

คัดแยกไรโซแบคทีเรียโดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการโดยเก็บจากพื้นที่ปลูกมันฝรั่งที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตพื้นที่ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ขนาดพื้นที่ 400 เมตร x 400 เมตร การสุ่มตัวอย่างดินแบบเจาะจง โดยการเก็บตัวอย่างดินแบบผสม (composite sampling)

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Activities) ของแบคทีเรียรอบรากพืช

นำรากพืชมาล้างด้วย 0.1 mol l^{-1} phosphate buffer ทำการเจือจางแล้วนำมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช

3.2.1 Phosphate solubilization assay

นำตัวอย่างดินใน Normal saline มา 0.1 ml มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติ phosphate solubilizer ซึ่งจะให้โคโลนีที่มี halo zone รอบโคโลนี ตามวิธีของ Nautiyal (1999)

3.2.2 Siderophore production

นำโคโลนีที่แยกได้จากข้อ 3.1 มาทดสอบคุณสมบัติในการสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ chrome azurole S agar (CAS) ตามวิธีของ Clark & Bavoil (1994) โดย spot เชื้อลงบน CAS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้สีเหลือง-ส้ม (yellow-orange halo) รอบๆ โคโลนี

3.2.3 Protease activity

นำโคโลนีที่แยกได้จากข้อ 13.2.2 มาทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดย spot เชื้อลงบน skimmed milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้โซนใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอส (protease) จากไรโซแบคทีเรียในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปม

นำไรโซแบคทีเรีย มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (yeast, peptone, glucose) บ่ม โดยใช้เครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 220 RPM ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 3 วัน (Dillon และคณะ 1985) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8500 x g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่มีextracellular enzyme มาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* (bioassay) โดยนำส่วนใส 300 µl ผสมกับตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของ *M. incognita* 200 ตัว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำ) และชุดควบคุม (control) ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD เปล่า น้ำกลั่น และ supernatant ที่ผ่านการต้ม 15 นาที ตรวจนับจำนวนตัวอ่อนที่ตาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายตัวอ่อน *M. incognita* ระยะ J2

3.4 การจำแนกชนิดของไรโซแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ J2 ของ *M. incognita*

จำแนกชนิดของไรโซแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปฏิกิริยาชีวเคมี และลำดับเบสของ 16S rRNA ซึ่งการหาลำดับเบสของ 16s rRNA ยีน ทำได้โดยสกัด Genomic DNA ของแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณ (amplify) DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ forward (5′-AGAGGTTACCTTGTTACGACTT-3′) และ reverse (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) (Lane, 1991) วิเคราะห์ลำดับเบสโดยการทำ DNA sequencing และนำลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X และ Mega (Thompson และคณะ, 1997; Kumar และคณะ, 2001)

3.5 การนำเอนไซม์โปรตีเอสมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในรูปแบบน้ำ มาทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลองของเกษตรกรอาสาสมัคร

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ในแปลงทดลอง ขนาด 1x2 เมตร โดยปลูกมันฝรั่ง 2 แถวต่อแปลง มีระยะห่างระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างต้น 25 เซนติเมตร กรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่จุ่มหัวพันธุ์

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มหัวพันธุ์ก่อนปลูกในชีวภัณฑ์เอนไซม์โปรตีเอส ความเข้มข้น 1 mg/l

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มหัวพันธุ์ก่อนปลูกในชีวภัณฑ์เอนไซม์โปรตีเอส ความเข้มข้น 5 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มหัวพันธุ์ก่อนปลูกในชีวภัณฑ์เอนไซม์โปรตีเอส ความเข้มข้น 10 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 โรยร่องปลูกด้วยสาร carbofuran 3G อัตรา 10 g/แปลง

เก็บตัวอย่างดินก่อนปลูกและหลังปลูกเพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนไส้เดือนฝอยในดิน จำนวน 5 จุดต่อแปลงย่อย เก็บหัวมันฝรั่งทั้งหมดจากต้นมันฝรั่งจำนวน 5 ต้นที่สุ่มได้จากแต่ละแปลงย่อย บันทึกน้ำหนักรวมของหัวมันฝรั่ง และสุ่มตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1½ นิ้ว จำนวน 10 หัว เพื่อวัดระดับการเกิดหูดของหัวมันฝรั่ง