บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Pseudomonas* ร่วมกับน้ำหมักชีวภาพจากผักกาดขาวในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) ในสภาพเรือนทดลอง

3.1.1 การเตรียมกล้ามะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดา (บริษัท เจียไต๋ จำกัด) มาเพาะในถาดหลุมที่มีดินสำหรับปลูก (ดินปลูกประกอบด้วยดินร่วน และวัสดุอื่นๆเช่น ขุยมะพร้าว แกลบดำ ปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 3 : 1) ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (°ซ) นาน 1 ชั่วโมง รดน้ำทุกเช้า เมื่อกล้ามะเขือเทศอายุประมาณ 7-10 วัน ถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น จนกระทั่งกล้ามะเขือเทศมีอายุ 25 วัน จึงนำมาใช้ในการทดลอง

3.1.2 การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* spp.

นำเชื้อ *Pseudomonas* จำนวน 4 ไอโซเลต คือ SE-1, SE-2, PT2-1และ PNN1-5 ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Fol ในระดับห้องปฏิบัติการ (วรรณดีและคณะ, 2550) และเรือนทดลอง (วรรณดีและคณะ, 2551) มาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบ / นาที นาน 3 วัน นำมานับจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU / ml โดยวิธี plate count agar

3.1.3 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol)

เพาะเลี้ยงเชื้อรา Fol บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 7 วัน นำมาทำสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) นับจำนวนสปอร์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 สปอร์/ มิลลิลิตร ด้วยฮีมาไซโตมีเตอร์ (haemacytometer)

3.1.4 การเตรียมน้ำหมักชีวภาพจากผักกาดขาว

นำเศษผักกาดขาว 3 กิโลกรัมสับให้มีชิ้นขนาดเล็กผสมกับกากน้ำตาล 1 กิโลกรัม หมักในภาชนะที่มีฝาปิด คนทุกวันเป็นเวลา 15 วัน จนเกิดของเหลวสีน้ำตาลเข้ม แล้วกรองเอากากออกได้ส่วนที่เป็นน้ำหมักที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล (ภาคผนวก ง) ก่อนนำมาใช้ในการทดลองนำมาเจือจางโดยใช้อัตราส่วนของน้ำหมักชีวภาพต่อน้ำเท่ากับ 1:1000

3.1.5 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Pseudomonas* และน้ำหมักชีวภาพเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

3.1.5.1 ทดสอบกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (seed treatment)

นำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมาแช่ในสารแขวนลอยสปอร์ของ Fol, สารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* และ น้ำหมักชีวภาพตามกรรมวิธีต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 กรรมวิธีการแช่เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศก่อนปลูก เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* และน้ำหมักชีวภาพจากผักกาดขาวในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) ในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธีที่	วิธีการปฏิบัติ
1	แช่เมล็ดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
2	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์ Fol (เตรียมตามข้อ 3.1.3)
3	แช่เมล็ดในน้ำหมักชีวภาพ (เตรียมตามข้อ 3.1.4)
4	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์ Fol : น้ำหมักชีวภาพ: = 1:1 v/v
5	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-1 (เตรียมตามข้อ 3.1.2)
6	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์ Fol : สารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-1 = 1:1 v/v
7	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-1 : น้ำหมักชีวภาพ = 1:1 v/v
8	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์Fol : สารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-1: น้ำหมักชีวภาพ = 1:1:1 v/v/v
9	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 (เตรียมตามข้อ 3.1.2)
10	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์ Fol : สารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 = 1:1 v/v
11	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 :น้ำหมักชีวภาพ = 1:1 v/v
12	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์Fol : สารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 : น้ำหมักชีวภาพ = 1:1:1 v/v/v
13	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1 (เตรียมตามข้อ 3.1.2)
14	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์ Fol : สารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1 = 1:1 v/v
15	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1: น้ำหมักชีวภาพ = 1:1 v/v
16	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์Fol : สารแขวนลอยเชื้อ*Pseudomonas* PT2-1 : น้ำหมักชีวภาพ = 1:1:1 v/v/v
17	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PNN1- 5 (เตรียมตามข้อ 3.1.2)
18	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์Fol : สารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5 = 1:1 v/v
19	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5 : น้ำหมักชีวภาพ = 1:1 v/v
20	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยสปอร์Fol :สารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5 :น้ำหมักชีวภาพ = 1:1:1 v/v/v

นำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากทุกกรรมวิธี เพาะเป็นต้นกล้า (ตามข้อ 3.1.1) จากนั้นตัดปลายรากทิ้งประมาณ 2 เซนติเมตร (ซม.) ย้ายปลูกในดินปลูก (ดินร่วน : วัสดุอื่นๆเช่นขุยมะพร้าว แกลบดำ ปุ๋ยคอก = 3 : 1) ฆ่าเชื้อที่ 121°ซ 1 ชั่วโมงบรรจุในกระถางเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว รดน้ำทุกเช้า

3.1.5.2 ทดสอบกับต้นกล้ามะเขือเทศ (seedling treatment)

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุประมาณ 25 วัน (เตรียมตามข้อ 3.1.1) มาตัดปลายรากทิ้งประมาณ) 2 ซม. จากนั้นทำตามกรรมวิธีที่ 1 -16 (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 กรรมวิธีทดสอบกับต้นกล้าของมะเขือเทศเพื่อประเมินประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* และน้ำหมักชีวภาพจากผักกาดขาว ในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) ในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 (ควบคุม)	จุ่มรากในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำประปา
กรรมวิธีที่ 2 (ควบคุม)	จุ่มรากในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ
กรรมวิธีที่ 3 (ควบคุม)	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำประปา
กรรมวิธีที่ 4 (ควบคุม)	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ
กรรมวิธีที่ 5	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที จากนั้นจุ่มในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-1 อีก 15 นาที ปลูกในดินผสมกับเชื้อ *Pseudomonas* SE-1 หลังจาก 2 วัน รดดินด้วยน้ำหมักชีวภาพ
กรรมวิธีที่ 6	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที นำมาปลูกในดินผสมกับน้ำหมักชีวภาพ หลังจาก 2 วัน รดด้วยสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-1
กรรมวิธีที่ 7	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที นำมาปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ และสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-1
กรรมวิธีที่ 8	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที จากนั้นจุ่มในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 อีก 15 นาที ปลูกในดินผสมกับสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 หลังจาก 2 วัน รดดินด้วยน้ำหมักชีวภาพ
กรรมวิธีที่ 9	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที นำมาปลูกในดินผสมกับน้ำหมักชีวภาพ หลังจาก 2 วัน รดด้วยสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-2
กรรมวิธีที่ 10	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ และสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* SE-2
กรรมวิธีที่ 11	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที จากนั้นจุ่มในสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1 อีก 15 นาที ปลูกในดินผสมกับสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1 หลังจาก 2 วัน รดดินด้วยน้ำหมักชีวภาพ
กรรมวิธีที่ 12	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที นำมาปลูกในดินผสมกับน้ำหมักชีวภาพ หลังจาก 2 วัน รดด้วยสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1
กรรมวิธีที่ 13	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที นำมาปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ และสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1
กรรมวิธีที่ 14	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที จากนั้นนำมาจุ่มในสารแขวนลอย *Pseudomonas* PNN1-5 อีก 15 นาที ปลูกในดินผสมสารแขวนลอย *Pseudomonas* PNN1-5 หลังจาก 2 วัน รดดินด้วยน้ำหมักชีวภาพ
กรรมวิธีที่ 15	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที นำมาปลูกในดินผสมน้ำหมักชีวภาพ หลังจาก 2 วัน รดด้วยสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5
กรรมวิธีที่ 16	จุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์ Fol 15 นาที นำมาปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ และสารแขวนลอยเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5

ดินปลูก มีอัตราส่วนของดินร่วน : วัสดุอื่นๆ (ขุยมะพร้าว แกลบดำ ปุ๋ยคอก) = 3 : 1 ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วบรรจุในกระถางเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว กรรมวิธีที่รดดินด้วยน้ำหมักชีวภาพ และสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* จะใช้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร/กระถาง

ทุกกรรมวิธีในข้อ 3.1.5.1 และ 3.1.5.2 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ปลูก 4 ต้น/ กระถาง จำนวน 5 กระถาง/ไอโซเลตของแบคทีเรีย บันทึกระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ 20 วัน กำหนดระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ ดังนี้ 1 = มะเขือเทศต้นปกติ (ไม่แสดงอาการของโรค), 2 = ใบล่างเหี่ยว, 3 = ใบล่างเหี่ยวและใบบนเหลืองหรือต้นแคระแกร็น, 4 = ใบล่างตายและใบบนเหี่ยวหรือต้นแคระแกร็น และ 5 = มะเขือเทศตาย ถ้าระดับความรุนแรงของโรค > 2.5 และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค > 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า มะเขือเทศอ่อนแอต่อเชื้อรา Fol ดัดแปลงจาก (Marlette et al., 1996) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ M - STAT เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลตต่างๆ ร่วมกับการใช้น้ำหมักชีวภาพจากผักกาดขาวในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ

3.2.1 ทดสอบกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (seed treatment)

นำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมาแช่ตามกรรมวิธีต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 กรรมวิธีการแช่เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศก่อนการนำไปปลูก เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* ร่วมกับน้ำหมักชีวภาพจากผักกาดขาวในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธีที่ 1	แช่เมล็ดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 2	แช่เมล็ดในน้ำหมักชีวภาพ
กรรมวิธีที่ 3	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* SE-1
กรรมวิธีที่ 4	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยที่มีเชื้อ *Pseudomonas* SE-1 : น้ำหมักชีวภาพ = 1:1 v/v
กรรมวิธีที่ 5	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* SE-2
กรรมวิธีที่ 6	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยที่มีเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 : น้ำหมักชีวภาพ = 1:1 v/v
กรรมวิธีที่ 7	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1
กรรมวิธีที่ 8	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยที่มีเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1 :น้ำหมักชีวภาพ = 1:1 v/v
กรรมวิธีที่ 9	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5
กรรมวิธีที่ 10	แช่เมล็ดในสารแขวนลอยที่มีเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5 : น้ำหมักชีวภาพ = 1:1 v/v

เมล็ดพันธุ์จากทุกกรรมวิธี นำมาเพาะเป็นต้นกล้า (ตามข้อ 3.1.1) จากนั้นนำมาตัดปลายรากทิ้งประมาณ 2 ซม. ย้ายปลูกในดินปลูก (ดินร่วน :วัสดุอื่นๆเช่นขุยมะพร้าว แกลบดำ ปุ๋ยคอก = 3 : 1 ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 1 ชั่วโมง บรรจุในกระถางขนาด 6 นิ้ว) รดน้ำทุกเช้า

3.2.2 ทดสอบกับต้นกล้ามะเขือเทศ (seedling treatment)

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุประมาณ 25 วัน (เตรียมตามข้อ 3.1.1) มาตัดปลายรากทิ้งประมาณ 2 ซม. จากนั้นทำตามกรรมวิธีที่ 1-10 (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 กรรมวิธีทดสอบกับต้นกล้ามะเขือเทศเพื่อประเมินประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* ร่วมกับน้ำหมักชีวภาพจากผักกาดขาว ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ

กรรมวิธีที่	วิธีการปฏิบัติ
1	จุ่มรากในน้ำหมักนาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำประปา
2	จุ่มรากในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ
3	จุ่มรากในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* SE-1 นาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำประปา
4	จุ่มรากในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* SE-1 นาน 15 นาที ปลูกใน ดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ
5	จุ่มรากในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 นาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำประปา
6	จุ่มรากในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* SE-2 นาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ
7	จุ่มรากในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1 นาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำประปา
8	จุ่มรากในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* PT2-1 นาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ
9	จุ่มรากในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5 นาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำประปา
10	จุ่มรากในสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* PNN1-5 นาน 15 นาที ปลูกในดิน รดด้วยน้ำหมักชีวภาพ

ดินปลูกคือดินร่วน : วัสดุอื่นๆ เช่นขุยมะพร้าว แกลบดำ ปุ๋ยคอก = 3 : 1 ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วบรรจุในกระถางเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว กรรมวิธีที่รดดินด้วยน้ำหมักชีวภาพ และสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* จะใช้ปริมาตรอย่างละ 100 มิลลิลิตร/กระถาง

ทุกกรรมวิธีในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ปลูก 4 ต้น/กระถาง และปลูก 5 กระถาง/ไอโซเลตของแบคทีเรีย หลังจาก 20 วัน นำมะเขือเทศทั้งต้นจากทุกกระถางล้างดินออกจากราก ซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนักสด (กรัม) จากนั้นอบแห้งที่ 80 °ซ นาน 3 วัน ชั่งน้ำหนักแห้ง (กรัม) บันทึกค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด และ น้ำหนักแห้ง และคำนวณน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม M - STAT เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกรรมวิธี โดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.3 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas* spp.

3.3.1 สารไซเดอร์โรฟอร์ (siderophore)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลต SE-1, SE-2, PT2-1 และ PNN1-5 บนอาหาร nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร NB นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 °ซ ปรับให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1 x 10^8 CFU/ml ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะอาหารวุ้น chrome azurol S (CAS) agar (ภาคผนวก ก) ให้เป็นหลุม จากนั้นนำสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 100 ไมโครลิตรหยอดลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์จากการเกิดวงสีส้มรอบๆโคโลนี (ดัดแปลงจากวิธีของ Schwyn and Neilands, 1997)

3.3.2 อินโดล-3-อะซิติก แอสิด (indole-3 -acetic acid, IAA)

3.3.2.1 Qualitative method: เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลต SE-1, SE-2, PT2-1 และ PNN1-5 ในอาหาร Luria- Bertani (LB) ที่เติม 5 mM L-tryptophan, 0.06% sodium dodecyl sulphate และ 1% glycerol นำกระดาษกรอง (Whatman no.1) เส้นผ่าศูนย์กลาง 82 มิลลิเมตร วางทับบนจานอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* ไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำกระดาษกรองมาวางในจานอาหารเปล่า เติม Salkowski's reagent ลงบนกระดาษกรอง ถ้าพบลักษณะวงสีแดงเกิดขึ้นทันทีรอบโคโลนีของแบคทีเรีย แสดงเป็นผลบวก

3.3.2.1 Quantitative method: เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลต SE-1, SE-2, PT2-1 และ PNN1-5 ในอาหาร Luria- Bertani (LB) ที่มี L-tryptophan 500 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 2 มล. เติมด้วย 100 ไมโครลิตรของ 10 mM orthophosphoric acid และ 4 มล. ของ Salkowski's reagent บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 นาที เกิดสีชมพู นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 530 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA

3.3.3 สาร volatile compounds

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลต SE-1, SE-2, PT2-1 และ PNN1-5 ในอาหาร NB บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 18-24 ชั่วโมง ปรับปริมาณเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1x10^9 cfu/ml นำสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 100 ไมโครลิตร spread ลงบนอาหาร Pseudomonas agar base บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 24 ชั่วโมง

นำเชื้อรา Fol ที่เจริญบน agar disc ขนาด 6 มิลลิเมตร วางลงตรงกลางจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 2 วัน จากนั้นนำไปประกบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย แล้วซีลด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 5 วัน วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อรา Fol เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ไม่มีเชื้อ *Pseudomonas* คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.3.4 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายในเชิงปริมาณ (Quantitative enzyme assays)

3.3.4.1. เอนไซม์โปรตีเอส (protease)

การเตรียมส่วนสกัดหยาบ (crude enzyme): เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* SE-1, SE-2, PT2-1 และ PNN1-5 ในอาหาร protease production medium และ protease production medium ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ (%) เส้นใยอบแห้งของเชื้อรา Fol (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 96 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใส (ส่วนสกัดหยาบ) เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

ปิเปต 0.1 มล.ของส่วนสกัดหยาบลงใน1.0 มล. ของ 1.5 % casein ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 มล. ของ 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) (ภาคผนวก ข) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน (tyrosine) ที่ถูกย่อยออกจากเคซีน (ดัดแปลงจาก Yang and Wang, 1999) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส (protease activity) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้ได้ผลผลิต (tyrosine) 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ตามสภาวะที่ทำการทดลอง

3.3.4.2 เอนไซม์ เบตา-1,3- กลูคาเนส (beta - 1, 3 – glucanase)

การเตรียมส่วนสกัดหยาบ (crude enzyme): เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* SE-1, SE-2, PT2-1 และ PNN1-5 ในอาหาร peptone medium ที่เติม 0.2% laminarin และ peptone medium ที่เติม 0.5 % เส้นใยอบแห้งของเชื้อรา Fol (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 96 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใส เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

ปิเปต 0.1 มล.ของส่วนสกัดหยาบลงใน 0.25% laminarin (w/v) ใน 0.1M sodium acetate buffer (ภาคผนวก ข), pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มให้เดือดนาน 5 นาที ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) ที่ถูกย่อยจากลามินาริน ตามวิธีของ Somogyi (1952) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์เบตา-1,3- กลูคาเนส คือ ปริมาณที่เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรท (laminarin) ให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ตามสภาวะที่ทำการทดลอง

3.3.4.3 เอนไซม์ไคติเนส (chitinase)

การเตรียมส่วนสกัดหยาบ (crude enzyme): เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* SE-1, SE-2, PT2-1 และ PNN1-5 ในอาหาร อาหาร chitin-peptone medium และ chitin-peptone medium ที่เติม 0.5 % เส้นใยแห้งอบของเชื้อรา Fol (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 96 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

ปิเปต 100 ไมโครลิตร ของส่วนสกัดหยาบและ 900 ไมโครลิตรของ 1% colloidal chitin ใน 0.1 M sodium acetate buffer (ภาคผนวก ข), pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปต้มในน้ำเดือด 100 °ซ นาน 20 นาที ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิเคราะห์ปริมาณเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน (*N*-acetylglucosamine : NAG) (Ressing et al., 1955) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit) ของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส (chitinase activity) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้ได้ผลผลิต คือ เอ็น- อะซิทิลกลูโคซามีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ตามสภาวะที่ทำการทดลอง