

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria)

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิและได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการที่บ่งบอกลักษณะใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* (วรรณดีและคณะ, 2551) จำนวน 78 ไอโซเลต (ตารางที่ 3.1)

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยวิธี Dual culture technique

3.2.1 นำเชื้อ *Pseudomonas* แต่ละไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร King B medium (ภาคผนวก ก) เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง มา streak ลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) โดยลากเป็นเส้นตรง 2 เส้นแต่ละเส้นห่างจากขอบจานแต่ละด้านประมาณ 2 เซนติเมตร

3.2.2 เพาะเลี้ยง *S. rolfsii* บนอาหาร PDA เป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน เจาะชิ้นวุ้นจากจานอาหารบริเวณปลายเส้นใยโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราวางตรงกลางระหว่างรอยขีดเส้นตรง 2 เส้นของเชื้อแบคทีเรียในข้อ 3.2.1 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3.2.3 ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราเปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรिकำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร

$$\% \text{ ยับยั้ง} = \frac{(\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของราจากจานควบคุม} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางของราจากจานทดสอบ})}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของราจากจานควบคุม}} \times 100$$

3.3 ศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อ *Pseudomonas* ที่แยกได้ และวิเคราะห์กลุ่ม

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* มาศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลโดยวิธีการ PCR amplification ของ 16SrDNA ทำลำดับนิวคลีโอไทด์ (direct sequencing of 16SrDNA) และ sequencing analysis โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) (ภาคผนวก ข) ผลที่ได้มาวิเคราะห์กลุ่ม (Phylogenetic tree) โดยวิธี Neighbor-joining (majority rule)

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียที่นำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิกิริยา และลักษณะทางชีวเคมี

กลุ่มที่	ไอโซเลตของแบคทีเรีย	ลักษณะทางชีวเคมี
1	Z1C-8	Gram negative, Oxidase (-), catalase (-) Indole (-), O-F glucose (non) MacConkey (+), Motility +
2	Z1A-8, Z2A-1, 2Z1C-4	Gram negative, Oxidase (-), catalase (-) Indole (-), O-F glucose (O) MacConkey (+), Motility +
3	Z1A-9, 4Z2A-5, 4Z3D-2, 4Z2C-2, 4Z1E-1, 4Z3D-5, 4Z4A-2, 4Z4E-2, Z2A-7, 4Z3D-1, 4Z4D-3, 4Z2A-1, 4Z2B-4, 4Z3E-1, 4Z3B-5, 4Z2E-5, 4Z2B-3, 4Z4B-3, 2Z4C-2, 2Z2A-2, 4Z3C-3, 4Z2B-1, 4Z3D-3, 4Z4E-1	Gram negative, Oxidase (+), catalase (+) Indole (-), O-F glucose (O) MacConkey (+), Motility (+)
4	Z1A-12, 4Z1B-2, 4Z4B-5, 2Z2C-3, 2Z2D-3, 2Z2D-5, 2Z1A-2, 2Z1C-5, 2Z2D-2, 2Z3B-3, 4Z1A-3, 4Z1A-5, 4Z1C-1, 4Z1C-4, 4Z1D-2, 4Z2B-2, 4Z2D-1, 4Z2E-1, 4Z2E-3, 4Z3A-1, 4Z4C-2	Gram negative, Oxidase (+), catalase (+) Indole (-), O-F glucose (non) MacConkey (+), Motility (-)
5	Z1A-14, 2Z1C-3, 2Z1E-1, 2Z4A-5, 4Z1A-1, 4Z3E-2, 4Z4A-1	Gram negative, Oxidase (-), catalase (+) Indole (-), O-F glucose (non) MacConkey (+), Motility (-)
6	Z1B-1, Z3B-2, Z4G-1, 2Z1A-5, 2Z2E-7, 2Z4E-2, 4Z2A-4	Gram negative, Oxidase (-), catalase (+) Indole (-), O-F glucose (F) MacConkey (+), Motility (+)
9	2Z3C-5, 4Z4D-4, 4Z4D-5, 2Z4A-3, 4Z1B-5, 2Z3D-4	Gram negative, Oxidase (+), catalase (+) Indole (-), O-F glucose (F) MacConkey (+), Motility (+)
11	4Z3E-5	Gram negative, Oxidase (+), catalase (-) Indole (-), O-F glucose (O) MacConkey (+), Motility (+)
12	4Z4B-2, Z3C-2, Z3B-6	Gram negative, Oxidase (-), catalase (+) Indole (-), O-F glucose (O) MacConkey (+), Motility (+)
13	Z3F-2	Gram negative, Oxidase (+), catalase (+) Indole (-), O-F glucose (O) MacConkey (-), Motility (+)
17	2Z3D-5, 2Z1D-6, 4Z2C-3, 4Z4B-4	Gram negative, Oxidase (+), catalase (-) Indole (-), O-F glucose (non) MacConkey (-), Motility (-)

O : Oxidative, F : Fermentative, Non : Nonsaccharolytic bacteria

+ หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (positive)

- หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (negative)