บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องแก้วพื้นฐาน (Beaker, Erlenmeyer flask, Cylinder, Volumetric pipette และ Test tube เป็นต้น)
2. โกร่งบด
3. Micropipette ขนาด 1000-5000, 100-1000, 20-200 และ10-100 ไมโครลิตร
4. cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร
5. หลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร
6. กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร
7. จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
8. กระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์, สำลี, ผ้าก๊อซ, พาราฟิล์ม
9. เครื่อง pH meter รุ่น MP 220 ผลิตโดยบริษัท K.S.P Interchem
10. เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Lambda 25 ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer instruments
11. เครื่อง Water Bath ผลิตโดยบริษัท Technical Science & service
12. เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง รุ่น TR-403 ผลิตโดยบริษัท Denver Instrument Company
13. เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง รุ่น TR-403 ผลิตโดยบริษัท Denver Instrument Company
14. เครื่องเซนติฟิวจ์ รุ่น J2-21 ผลิตโดยบริษัท Beckman
15. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น 013422 ผลิตโดยบริษัท Paton Scientific
16. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) ผลิตโดยบริษัท HIRAYAMA
17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น NUOVA 11 ผลิตโดยบริษัท Thermolyne
18. เครื่องปั่น ผลิตโดยบริษัท Blender

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2.1 สารที่ใช้ในการเตรียมไคตินและไคโตซาน

1. Chitin (Fluka, Netherland)
2. Chitin (Sigma, Netherland)
3. Chitosan 7460 kDa, 83-85% deacetylation (Sigma,USA.)
4. Glacial acetic acid (Ajax Finechem, Australia)

3.1.2.2 สารที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA) (Hispan lab, Thailand)
2. Potato Dextrose Broth (PDB) (Himedia, India)

3.1.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารคัดแยก chitinolytic bacteria

1. Peptone (Hispan lab, Thailand)
2. Ammonium sulfate (Ajax Finechem, Australia)
3. Iron gluconate (Ajax Finechem, Australia)
4. Yeast extract (Hispan lab, Thailand)
5. Agar

3.1.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารคัดแยก *Phytophthora parasitica*

1. Corn meal agar (Ajax Finechem, Australia)
2. Pimaricin (Fluka, Netherland)
3. Ampicilin (Fluka, Netherland)
4. 3-hydroxy-5-methylsoxazole (Sigma, China)

3.1.2.5 สารที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนส

1. Chitin (Fluka, Netherland)
2. 3,5-dinitrosalicylic acid (Fluka, Netherland)
3. Sodium hydroxide
4. Sodium potassium tartrate (Ajax Finechem, Australia)
5. *N*-acetylglucosamine (Fluka, Netherland)

3.1.2.6 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

1. Sodium potassium tartrate (Ajax Finechem, Australia)
2. Sodium carbonate (Ajax Finechem, Australia)
3. Sodium sulfate (Ajax Finechem, Australia)
4. Copper sulfate (Ajax Finechem, Australia)
5. 98% (w/v) Sulfuric acid (Sigma, China)

6. Ammonium molybdate (Fluka, Netherland)

7. Sodium arcenate (Ajax Finechem, Australia)

8. Laminarin (Sigma, China)

9. Glucose (Fluka, Netherland)

10. Ammonium sulfate (Fluka, Netherland)

3.2 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Phyyophthora parasitica* สายพันธุ์ 572 ที่แยกได้จากต้นส้มโชกุนที่เป็นโรค (ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา ลีละศุภกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา) เก็บรักษาในหลอดอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาผลของไคตินและไคโตซานต่อเชื้อรา *P. parasitica* มีการศึกษาใน 2 ระดับ คือ การศึกษาในห้องปฏิบัติการและในต้นส้มที่มีอายุ 45 วัน มีรายละเอียดดังนี้

3.3.1 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

3.3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. parasitica*

เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยเขี่ยเชื้อราที่เจริญในหลอดอาหารแข็ง PDA มาเลี้ยงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 cm เจาะก้อนเชื้อราวางบนอาหารที่ต้องการทำการทดสอบ

3.3.1.2 การเตรียมไคโตซานและไคติน

ดัดแปลงตามวิธีของ Falcon *et al.* (2007) รายละเอียดมีดังนี้

เตรียมไคโตซานความเข้มข้น 20 g/L (stock chitosan) (บริษัท Sigma-Aldrich Chemical; 83-85% deacetylated และ Mw 7460 kDa) โดยชั่งไคโตซาน 20 g ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผสม 1% (v/v) glacial acetic acid กวนสารละลายด้วยเครื่องผสมทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1 คืน แล้วนำสารละลายปรับ pH 5.0 ด้วย 0.1 N NaOH หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 mL หลังจากนั้นเตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ14 g/L จากสารละลายไคโตซานเข้มข้น 20 g/L และเตรียมสารละลายไคโตซานสำเร็จรูปทางการค้า (วางจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป) ผสมกับอาหาร PDA ให้มีความเข้มข้น 0.1, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 และ14.0% (v/v) และมี 1% (v/v) glacial acetic acid

ส่วนไคติน (บริษัท Fluka) เตรียมได้โดยการบดไคตินให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น Blender แล้วนำไปผสมกับอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ให้มีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ14 g/L

3.3.1.3 ศึกษาผลของไคตินและไคโตซานต่อการเจริญของเชื้อรา *P. parasitica* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีความเข้มข้นของไคโตซานและไคตินที่เตรียมได้ตามข้อ 3.3.1.2 อย่างละ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ14 g/L อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคโตซานทางการค้าความเข้มข้น 0.1, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 และ14.0% (v/v) โดยปริมาตร PDA ที่เติม 1% (v/v) glacial acetic acid และ PDA โดยปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเป็น 5.6 ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PDA ที่เติม glacial acetic acid เป็นชุดควบคุม)

2) การทดสอบผลของไคตินและไคโตซานต่อการเจริญของเชื้อรา

เจาะเชื้อราที่มีอายุ 7 วัน จากจานอาหาร PDA โดยใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 mm แล้ววางก้อนเชื้อราดังกล่าวบนอาหารที่เตรียมได้ ตามข้อ 3.3.1.1 นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 25±1 °C เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อรา จากนั้นคำนวณการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (\%)} = \frac{\text{ชุดควบคุม - ชุดทดสอบ}}{\text{ชุดควบคุม}} \times 100$$

ชุดควบคุม = เส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ชุดทดสอบ = เส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารชุดทดสอบ

หมายเหตุ : ทำการทดสอบโดยใช้จำนวน 4 ซ้ำต่อชุดการทดสอบ

3.3.2 การศึกษาในต้นส้ม (อายุ 45 วัน)

3.3.2.1 การเตรียมต้นส้ม

นำเมล็ดส้มโชกุน (จากผลส้มโชกุนที่ปลูกในจังหวัดยะลา) มาทำการแกะเปลือกด้านนอกออกแล้ว แช่ในสารละลาย 0.1% (v/v) sodium hypochlorite นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำไปเพาะในกระบะทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 180 °C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อต้นส้มอายุ 45 วัน นำไปปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 cm ออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design (CRD)โดยมีชุดทดสอบ 5 ชุด จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 5 ต้น ต่อการเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง รายละเอียดแต่ละชุดทดสอบมีดังนี้

ชุดทดสอบที่ 1 ดิน

ชุดทดสอบที่ 2 ดิน + เชื้อรา *P. parasitica*

ชุดทดสอบที่ 3 ดิน + เชื้อรา *P. parasitica* + ไคติน 12 g ต่อดิน 10 kg

ชุดทดสอบที่ 4 ดิน + เชื้อรา *P. parasitica* + ไคโตซาน 12 g ต่อดิน 10 kg

ชุดทดสอบที่ 5 ดิน + เชื้อรา *P. parasitica* + ไคตินและไคโตซานอย่างละ 12 g ต่อดิน 10 kg

วิเคราะห์ผลการศึกษาทั้งในส่วนของดินที่ปลูกต้นส้มและต้นส้มที่ศึกษาทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.3.2.2 การปลูกเชื้อ *P. parasitica*

การปลูกเชื้อรา *P. parasitica* จะปลูกเชื้อราในรูปของกลุ่มเส้นใย (mycelia biomass) ของเชื้อที่เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะเชื้อราย้ายลงไปเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) เป็นเวลา 10 วัน จึงกรองผ่านผ้าขาวบางและล้างกลุ่มเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* ด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปปลูกเชื้อบริเวณรอบๆ โคนต้นส้มด้วยปริมาณกลุ่มเส้นใย 7.33×10^2 CFU ต่อดิน 1 g และเก็บตัวอย่างดินปลูกต้นส้มและต้นส้มในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 มาวิเคราะห์ผลการศึกษาต่อไป

3.3.2.3 การวิเคราะห์ดินปลูกต้นส้ม

1) การเก็บตัวอย่างดิน

การแยกเชื้อจากดินบริเวณรากส้ม (rhizosphere) โดยถอนต้นส้มแล้วนำไปเขย่าเบาๆ เพื่อกำจัดดินที่ติดบริเวณรากส้ม หลังจากนั้นตักดินบริเวณรากส้มให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm เพื่อนำไปแยกเชื้อโดยวิธี soil dilution plating โดยการนำดิน 1 g ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวที่บรรจุ 2% (w/v) NaCl ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำสารละลายดินที่ได้มาตรวจหาจำนวน chitinolytic bacteria และ *P. parasitica* ต่อไป

2) การวิเคราะห์จำนวน Chitinolytic bacteria (ตามวิธีของ Donderski and Brzezinska, 2003)

โดยนำสารละลายดิน 1 mL มาแยกเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยก Chitinolytic bacteria โดยมีส่วนผสมของ peptone 1.0 g, ammonium sulfate 0.1 g, iron gluconate 0.1 g, yeast extract 0.1 g, colloidal chitin 7.0 g (วิธีเตรียมดังภาคผนวก 1.1), agar 15.0 g, tap water 1.0 L ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2-7.4 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 2 วัน แล้วตรวจสอบผล

3) การวิเคราะห์จำนวน *P. parasitica* (ดัดแปลงตามวิธีของ Solel and Pinkas, 1984)

โดยนำสารละลายดิน 1 mL มาแยกเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหารสำหรับคัดแยกเชื้อ *P. parasitica* ซึ่งประกอบด้วย corn meal agar 17.0 g, pimaricin 10 ppm, ampicilin 100 ppm, hymexazol 50 ppm และ tap water 1.0 L และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว บ่มที่อุณหภูมิ 25±1 °C 10 วัน แล้วตรวจสอบผล

4) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและเบต้า 1, 3-กลูคาเนส

4.1) การเตรียมสารสกัดเอนไซม์ (ดัดแปลงตามวิธีของ Tsujibo และคณะ, 1991)

นำต้นส้มมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M acetate pH 6.0 ในอัตราส่วน 1.0 g ต่อบัฟเฟอร์ 2.0 mL หลังจากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000×g ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์นาน 15 นาที นำสารสกัดส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

4.2) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ดัดแปลงตามวิธีของ Tsujibo และคณะ 1991)

4.2.1) สับสเตรท (substrate) คือ colloidal chitin ความเข้มข้น 10 % (w/v) ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7 (ภาคผนวก ก ข้อ 1.1)

4.2.2) การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ก ข้อ 1.2)

4.2.3) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน *N*-acetylglucosamine (ภาคผนวก ก ข้อ 1.3)

4.2.4) วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส

นำสารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 0.5 mL เติมสารละลาย colloidal chitin 1.0 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที แล้วเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 2.0 mL ต้มในน้ำเดือด 5 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน *N*-acetylglucosamine แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยยูนิต

หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ไคติเนส หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาล *N*-acetylglucosamine 1 μmole ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C

4.3) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (ดัดแปลงตามวิธีของ Matthieu และคณะ, 1989)

4.3.1 การเตรียมสารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent) อัตราส่วนสาร Copper reagent A 20 mL ต่อสาร Copper reagent B 0.8 mL (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1.1 และ 2.1.2)

4.3.2 การเตรียมสารละลายเนลสัน (Nelson's reagent) (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1.3)

4.3.3 สารละลาย Laminarin (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1.4)

4.3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Glucose (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1.5)

4.3.5 วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

นำสารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 0.3 mL ใส่ในหลอดแก้ว เติมสารละลาย Laminarin 1.2 mL นำหลอดแก้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5

นาที เติมสารละลายคอปเปอร์ 1 mL นำหลอดแก้วไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที แล้วเติมสารละลายเนลสัน 1 mL ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เติมน้ำกลั่น 2 mL ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส ในหน่วยยูนิต

หนึ่งหน่วยยูนิตของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคส 1 μg ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C

4.4) การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS