

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อรา
 - 1.1 ตัวอย่างดินจากบริเวณที่มีเห็ดเจริญบนดอยสุเทพ
 - 1.2 ตัวอย่างดินจากใต้ต้นไม้ยม หน้าโรงเพาะชำ ตึกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - 1.3 ดินจากดินชายทะเล จังหวัดระยอง
 - 1.4 ไม้ที่ขึ้นรา
 - 1.5 เห็ดขึ้นรา
 - 1.6 ดินบริเวณที่เอาเปลือกกุ้ง ไปฝังไว้เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์
 - 1.7 เชื้อที่ปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 1.8 แหนมเห็ด
 - 1.9 ดินโป่งจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน
 - 1.10 กะปิ
 - 1.11 เชื้อบริสุทธิ์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (Microbiology Section, Chiang Mai University, MSCMU) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - 1.12 เชื้อบริสุทธิ์จากคุณนพกานต์ รัตนกิจ คุณนิคม พุทธิมา และ คุณอภิรักษ์ สมฤทธิ์
2. อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)
 - 2.1 Chitin agar
 - 2.2 Chitin overlay plate (COP)
 - 2.3 Czapek's agar
 - 2.4 Enrichment medium
 - 2.5 Enzyme production medium (EPM)
 - 2.6 Malt extract Yeast extract Glucose agar (MYG)
 - 2.7 Potato dextrose agar (PDA)

3. สารเคมี

3.1 สับสเตรท

3.1.1 Ball milled chitin จากเปลือกปูที่บดละเอียด (Sigma)

3.1.2 Colloidal chitin (ภาคผนวก ข)

3.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก จ)

3.2.1 Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4)

3.2.2 Disodium hydrogephosphate (Na_2HPO_4)

3.3 สารเคมีที่ใช้การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Miller (1959) (ภาคผนวก จ)

3.3.1 Sodium hydroxide (NaOH)

3.3.2 3,5 dinitrosalicylic acid

3.3.3 Sodium sulphite (Na_2SO_3)

3.3.4 Phenol

3.3.5 Sodium potassium tartrate ($\text{COOK}(\text{CHOH})_2 \text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

3.3.6 N-acetyl-D-glucosamine ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$)

3.4 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก จ)

3.4.1 Sodium bicarbonate (NaHCO_3)

3.4.2 Sodium hydroxide (NaOH)

3.4.3 Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

3.4.4 Trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.4.5 Folin-Ciocalteu's phenol reagent

3.4.6 Bovine serum albumin (BSA)

3.5 สารเคมีอื่นๆ

3.5.1 Hydrochloric acid (HCl)

3.5.2 Lactophenol และ Lactophenol cotton blue

3.6 อุปกรณ์และเครื่องมืออื่นๆ

3.6.1 Stainless steel cylinder cup ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 7 มม. สูง 10 มม.

3.6.2 งานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

3.6.3 ขวด Duran

3.6.4 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

- 3.6.5 ปิเปต ขนาด 1.0 และ 10.0 มิลลิลิตร
- 3.6.6 Micropipette ปรับปริมาณได้ขนาด 200-1,000 ไมโครลิตร และ 1,000-5,000 ไมโครลิตร
- 3.6.7 เครื่องกรองแบบที่เรีย (Micro syringe filter holder)
- 3.6.8 กระดาษกรอง cellulose acetate membrane ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรูกระดาษ 0.22 ไมโครเมตร
- 3.6.9 กระบอกนํ้า ขนาด 10 มิลลิลิตร
- 3.6.10 เครื่องชั่งสารอย่างละเอียด Sartorius model LC620S
- 3.6.11 เครื่องวัด pH (pH meter) Horiba รุ่น F21
- 3.6.12 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
Shimadzu รุ่น UV 2100
- 3.6.13 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 3.6.14 อ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker water bath) Memmert
- 3.6.15 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- 3.6.16 ตู้อบอุณหภูมิสูง (Hot air oven) Heraeus
- 3.6.17 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope) Olympus
- 3.6.18 หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) Tomy model SS-305
- 3.6.19 เตาแม่เหล็กไฟฟ้าสำหรับคนสาร (Hot plate-magnetic stirrer) model PC-35
- 3.6.20 ตู้ดูดควัน (Hood) Astec รุ่น BFC 10-010LC
- 3.6.21 เครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) Hettich รุ่น EBA 12R
- 3.6.22 ปากคีบ (Forceps)
- 3.6.23 เข็มเข็มฉีดยา (Needle)
- 3.6.24 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
- 3.6.25 ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer)

วิธีวิจัย

1. การแยกเชื้อราที่ผลิตไคตินเนส

- 1.1 นำตัวอย่างดิน ตัวอย่างละ 10 กรัม เติดขึ้นรา แผลงขึ้นรา และเปลือกกุ้งบดละเอียดที่ห่อผ้าขาวบาง แล้วนำไปฝังดิน เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ใส่ลงไปในอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณ (enrichment medium) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($20-35 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ทำ serial ten-fold dilution แล้วนำมา spread plate บนอาหาร overlay chitin agar (ภาคผนวก ก) หากสามารถมองเห็นการเจริญของเชื้อราได้ด้วยตาเปล่า จะแยกโดยนำเชือรานั้นมา streak บนอาหาร overlay chitin agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ($20-35 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 5-7 วัน
- 1.2 นำเชื้อราที่เจริญบนอาหาร overlay chitin agar มาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) เก็บ stock culture ไว้ในหลอดอาหารแข็ง PDA

2. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตไคตินเนสในอาหารเหลว colloidal chitin

- 2.1 ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารแข็ง PDA ลงในอาหารแข็ง chitin agar (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน
- 2.2 ใช้ที่เจาะลูกศรึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะเส้นใยบริเวณปลายสุด จำนวน 5 ชิ้น ใส่ใน EPM (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ($20-35 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 7 วัน
- 2.3 นำ EPM ที่เลี้ยงเชื้อไว้ เป็นเวลา 7 วัน บ่มเพื่อแยกเอาเส้นใยออก ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้กรองด้วยกระดาษ Whatman No.1 แล้วจึงกรองซ้ำด้วยเครื่องกรองแบบที่เรีย (micro syring filter holder) โดยใช้กระดาษกรอง cellulose acetate ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรูกระดาษ 0.22 ไมโครเมตร เก็บน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมเชื้อทดสอบ

3.1 *Cladosporium* sp.

เตรียมเชื้อในรูป spore suspension โดยเติม Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยง PDA ที่มีเชื้อ *Cladosporium* sp. ที่เพาะไว้เป็นเวลา 5 วัน ใช้หัวถ่ายเชื้อชุดสปอร์ของเชื้อ และใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer) นับจำนวนสปอร์และปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.2 *Fusarium* sp.

เตรียมเชื้อในรูป spore suspension เช่นเดียวกับ *Cladosporium* sp.

3.3 *Lasiodiplodia* sp.

เพาะเชื้อโดยวิธี point inoculation บนอาหาร PDA โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. เจาะเส้นใยบริเวณปลายสุดของเชื้อที่มีอายุ 5 วันมาวางบนอาหาร PDA

4. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อรา โดย cylinder plate method

นำเชื้อราที่แยกได้จำนวน 82 ไอโซเลท เชื้อราบริสุทธิ์จาก คุณนพกานต์ รัตนกิจ และ คุณอภิรัชต์ สมดี รวมทั้งเชื้อราจาก stock culture ของสาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (MSCMU) ทั้งหมด 165 ไอโซเลทมาทดสอบการยับยั้งการเจริญ *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดย cylinder plate method

4.1 เพาะเชื้อทดสอบ *Cladosporium* sp. และ *Fusarium* sp. โดยวิธี pour plate ใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension 1.5 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 จาน เท PDA ที่หลอมเหลวลงในจานอาหาร ผสมให้เชื้อกระจายทั่วทั้งจาน ส่วน *Lasiodiplodia* sp. จะเพาะโดยเจาะเส้นใยของเชื้อ ที่เลี้ยงไว้ 5 วัน มาวางตรงกลางจานอาหาร PDA บ่มเชื้อทดสอบทั้ง 3 เชื้อไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง ($20-35 \pm 2^\circ \text{C}$)

4.2 วาง cylinder cup ซึ่งอบฆ่าเชื้อโดยใช้ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวาง 4 วง ต่อ 1 จาน

4.3 ใช้ micropipette คำนวณน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราปริมาตร 250 ไมโครลิตร หยดลงใน cylinder cup 3 วง ต่อ 1 ไอโซเลท ต่อ 1 เชื้อทดสอบ cylinder cup อันที่ 4 จะเป็นชุดควบคุม โดยใส่อาหารเหลว colloidal chitin ลงไป ทำการทดสอบเช่นนี้ ทั้ง 165 ไอโซเลท ไอโซเลทละ 2 ซ้ำ

4.4 บ่มไว้ 3-5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดขนาดของวงใส

5. การทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อราที่ผลิตโคตินีสกับเชื้อทดสอบ

5.1 เตรียมเชื้อราทดสอบ ได้แก่ *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. เช่นเดียวกับข้อ 3.1, 3.2 และ 3.3

5.2 ใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. เจาะเส้นใยของเชื้อราอายุ 5 วัน ที่เพาะบน PDA โดยวิธี point inoculation มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเชื้อทดสอบตามข้อ

5.1 โดยวาง 3 จาน/จาน บ่มที่อุณหภูมิ $(20-35 \pm 2^{\circ}\text{C})$ เป็นเวลา 3-5 วัน ดูผลโดยวัดขนาดบริเวณที่เชื้อราทดสอบไม่สามารถเจริญได้

6. บ่งบอกชนิดของเชื้อราที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ

นำเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท มาทำ slide culture (ภาคผนวก ข) บ่มไว้ 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง $(20-35 \pm 2^{\circ}\text{C})$ นำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ บันทึกลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะของเส้นใย โคนิเดีย โคนิดิโอฟอร์ พร้อมทั้งวัดขนาด

7. การวัดการทำงานของเอนไซม์

วัดการทำงานของเอนไซม์โคตินีสของไอโซเลทที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบโดย cylinder plate method ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท *Alternaria* sp. P₂₁, *Basipetospora* sp. CK₃₀, *Fusarium* sp. D₄, *Fusarium* sp. CH₁₂, *Aspergillus* sp. BB₄, *Trichoderma* sp. SC-21, *Trichoderma* sp. CT₂₆, *Trichoderma* sp. SC-23, *Paecilomyces* sp. S1-11 และ *Trichoderma* sp. CK₂₀

7.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959)

7.1.1 นำส่วนใสของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อรามาเตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย enzyme control (EC) : น้ำกรองเลี้ยงเชื้อรา 300 ไมโครลิตร + phosphate buffer pH 7.5 0.2 M (ภาคผนวก ฉ) 1,200 ไมโครลิตร

substrate control (SC) : substrate buffer 1,200 ไมโครลิตร (Colloidal chitin 25% ใน phosphate buffer pH 7.5 0.2 M) (ภาคผนวก ฉ)

+ phosphate buffer pH 7.5 0.2 M 300 ไมโครลิตร

enzyme substrate (ES) : น้ำกรองเลี้ยงเชื้อรา 300 ไมโครลิตร + substrate buffer 1,200 ไมโครลิตร

บ่ม reaction mixture ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

7.1.2 เติม 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด ปิดหลอดด้วยกระดาษอลูมิเนียม ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว เติมสารละลาย sodium-potassium tartrate ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ด้วย UV Spectrophotometer Shimadzu model 21 นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก จ) แล้วนำไปคำนวณค่า enzyme activity (ภาคผนวก ง)

7.2 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951)

7.2.1 นำน้ำเลี้ยงปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติม reagent C (ภาคผนวก ฉ) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

7.2.2 เติมสารละลาย 1 N Folin reagent (ภาคผนวก ฉ) หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

7.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ด้วย UV Spectrophotometer Shimadzu model 21

7.2.4 เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก จ) แล้วนำไปคำนวณค่า specific activity (ภาคผนวก ง)

8. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราโดยวิธี Poisonous food technique (Wannissorn

et al., 1996)

นำน้ำกรองเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ PDA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยวิธี pour plate ทิ้งไว้จนอาหารเย็น แล้วจึงวาง block ของเชื้อราทดสอบลงไป บ่มไว้ 3 วันที่อุณหภูมิห้อง ($20-35 \pm 2^{\circ}\text{C}$) วัดโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ครั้งในแนวตั้งฉากกัน แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย ส่วนการทดลองชุดควบคุมจะใช้อาหารที่ไม่เติมน้ำกรองเลี้ยงเชื้อรา แล้ววาง block ของเชื้อราทดสอบลงไป บ่มไว้ 3 วันที่อุณหภูมิห้อง ($20-35 \pm 2^{\circ}\text{C}$) วัดโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ครั้งในแนวตั้งฉากกัน นำค่าเฉลี่ยมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยใช้สูตร

$$I = \frac{(C-T) \times 100}{T}$$

โดย I = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

C = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

T = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

9. ศึกษาการเจริญบนอาหารบางชนิดและผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Trichoderma* sp.

CK₂₀

เลือกศึกษา *Trichoderma* sp. CK₂₀ จากเชื้อราทั้งหมด 10 ไอโซเลท ซึ่งน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราสามารถยับยั้งการเจริญของ *Cladosporium* sp. ได้ดีที่สุด และยังยับยั้งการเจริญของ *Lasiodiplodia* sp. ได้อีกด้วย โดยเพาะ *Trichoderma* sp. CK₂₀ ลงบนอาหาร PDA โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. เจาะบริเวณปลายเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน นำมาวางตรงกลางจานอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 37 และ 45 °C ตามลำดับ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา เพื่อนำมาเปรียบเทียบการเจริญ ส่วนการเจริญบนอาหารบางชนิด ได้แก่ chitin agar, chitin overlay plate PDA และ Czapek's agar จะใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. เจาะบริเวณปลายเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน นำมาวางตรงกลางจานอาหารแต่ละชนิดนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-35±2 °C) เป็นเวลา 5 วัน