

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. การรวบรวมจุลินทรีย์ที่ผลิตโคตินเนสและทนอุณหภูมิสูง

ก. การรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้บนอาหารโคติน

1.1 การแยกโดยตรง (Direct isolation) จากตัวอย่างดิน เช่น ดินจากชายทะเล ดินใต้ต้นไม้ ดินจากทุ่งเพาะเห็ด หรือจากบริเวณที่มีเห็ดเจริญ ดินจากน้ำพุร้อน และแยกจากอาหาร เช่น กะปิ ปลาร้า เป็นต้น

1.2 การแยกโดยใช้เหยื่อล่อ (baiting method) โดยใช้เปลือกกุ้ง กระดองปู นำไปฝังดิน ประมาณ 2 เดือน

นำดินและตัวอย่างอาหารตัวอย่างละ 10 g ใส่ลงในอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ (enrichment medium) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ทำ serial ten-fold dilution จากนั้นนำมาแยกเชื้อบนอาหาร chitin agar (ภาคผนวก ก) โดยวิธี spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

1.3 ใช้เชื้อบริสุทธิ์จากหน่วยเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ Microbiology Section, Chiang Mai University (MSCMU) จากหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 280 ตัวอย่าง นำมาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหาร chitin agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

ข. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิสูง

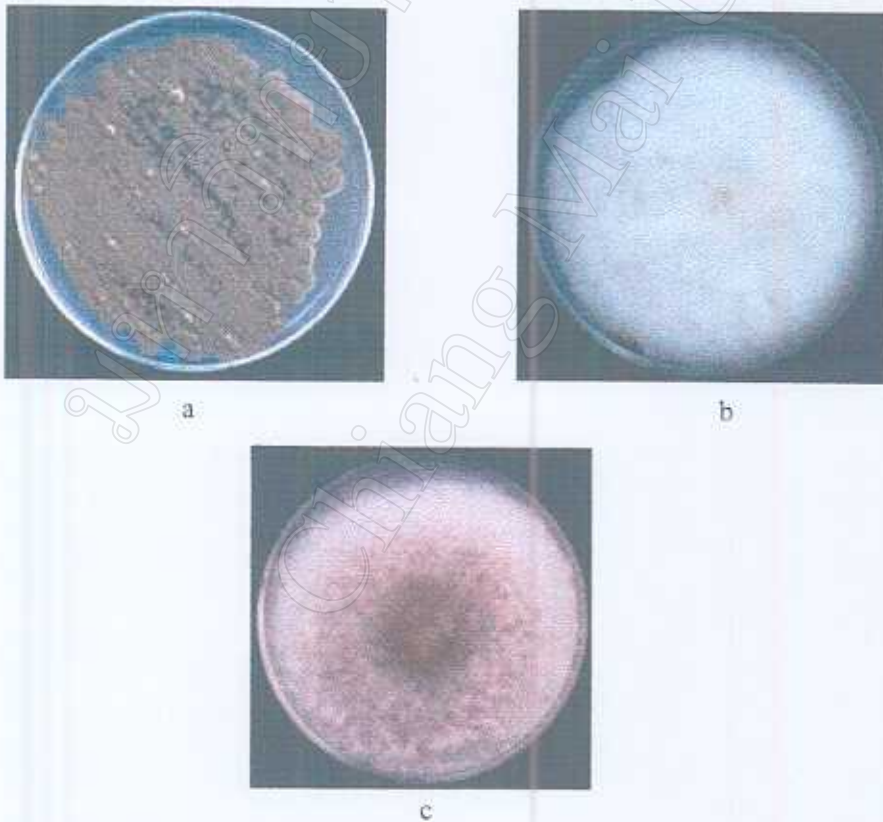
นำจุลินทรีย์ที่แยกได้ทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 20°C , 30°C , 37°C , 45°C และ 55°C ซึ่งแบคทีเรียจะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) โดยวิธี streak plate ส่วนเชื้อราเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 20°C , 30°C , 37°C , 45°C และ 55°C เป็นเวลา 7 วัน เลือกและแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 20°C และ 55°C แล้วจึงแยกเก็บแบคทีเรียไว้ในอาหารวุ้นเยือก NA เชื้อราเก็บไว้ในอาหารวุ้นเยือก PDA)

2. การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์บางชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในลำไย

2.1 การทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (Antagonism) โดย dual culture method (Krishnamurthy *et al.*, 1999)

ก. การเตรียมเชื้อราทดสอบ

เตรียมเชื้อทดสอบของ *Cladosporium* sp. (รูป 2 a), *Lasiodiplodia* sp. (รูป 2 b) และ *Fusarium* sp. (รูป 2 c) ในรูปสปอร์ผสมน้ำ (spore suspension) โดยใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อเทใส่ลงในหลอดอาหารวุ้นแข็ง PDA ที่มีเชื้อทดสอบอายุ 5 วัน ซึ่งลงเชื้อโดยวิธี streak plate ใช้หวัด้ายเชื้อลงไฟจนร้อนแดง รอให้เย็นแล้วจึงเขี่ยเบา ๆ บริเวณเส้นใยจนสปอร์หลุด แล้วกรองเส้นใยและสปอร์ผสมนี้ด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อเพื่อกรองเศษวุ้นและเส้นใยเชื้อราออก นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer แล้วปรับความเข้มข้นจนได้ความเข้มข้น 2×10^5 spore/ml เติมน้ำตาลละลาย Tween 20 อัตราส่วน 100 : 0.04 v/v เพื่อให้สปอร์กระจายตัวได้ดีขึ้น นับความเข้มข้นของสปอร์อีกครั้งหนึ่ง ใช้ไม้พันสำลี (swab) ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์ เกลี่ยบนจานอาหาร PDA ให้ทั่วผิวหน้า



รูป 2 ลักษณะของเชื้อราทดสอบที่เจริญได้บนอาหาร Potato dextrose agar; a *Cladosporium* sp.

b *Fusarium* sp. และ c *Lasiodiplodia* sp.

ข. การทดสอบ

แบคทีเรีย: streak แบคทีเรียที่แยกได้บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน สะกิดโคโลนีขึ้นมาโดยใช้ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที และลงบนจานอาหาร PDA ที่ได้ swab เชื้อทดสอบไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

เชื้อรา: เชื้อราจะใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm เจาะบริเวณปลายสุดของเส้นใยของเชื้อราที่มีอายุ 5 วัน มาวางบนอาหาร PDA ที่ swab เชื้อทดสอบไว้แล้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ดูผลโดยวัดขนาดบริเวณที่เชื้อราตัวอย่างสามารถเจริญได้

การเตรียมน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ (crude enzyme) สำหรับทดสอบต่อไปในข้อ 2.2 และ 2.3

แบคทีเรีย : เตรียมเชื้อจากหลอดอาหารวันเอียง NA โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml โดยเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อใส่ลงในหลอดอาหารวันเอียง NA แล้วใช้หัวถ่ายเชื้อชุดให้แบคทีเรียหลุดกระจายออกมา ปรับความเข้มข้นเทียบกับ McFarland No. 0.5 (ภาคผนวก ค) ปิเปต cell suspension ปริมาตร 0.5 ml (1% v/v) ใส่ลงใน EPM นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

เชื้อรา : เลี้ยงเชื้อราบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 cm เจาะเส้นใยบริเวณปลายสุดจำนวน 5 ชิ้น ใส่ในอาหาร EPM ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

เก็บน้ำกรองเลี้ยงเชื้อจากอาหาร EPM โดยใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 6,000 รอบต่อนาที 4°C 20 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วกรองซ้ำด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย (micro syring filter holder) โดยใช้กระดาษกรอง cellulose acetate ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรูกระดาษ 0.22 µm เก็บน้ำกรองเลี้ยงเชื้อไว้ที่ 4°C

2.2 การทดสอบความสามารถของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในลำไยโดยวิธี cylinder plate method (ศิริลักษณ์, 2542)

เตรียม spore suspension จากข้อ 2.1 (ก) นำมาเกลี่ยลงบนจานอาหาร PDA จากนั้นจึงวางด้วยสแตนเลส สตีล ทรงกระบอก (stainless steel) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 mm สูง 10 mm ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วย hot air oven ยี่ห้อ TERMAKS Model TS ที่อุณหภูมิ 150°C 180 นาที ลงไปในจาน โดยก่อนวางให้ถนด้วยด้วยเปลวไฟเล็กน้อยเพื่อให้ด้วยยึดติดกับอาหารวันได้ดียิ่งขึ้น

วางถ้วย 4 วงต่อหนึ่งจานอาหาร 3 วงแรกเป็นน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ ใช้ micropipette ปริมาตร 250 μ l หยดลงไป ส่วนอันที่ 4 ซึ่งเป็นชุดควบคุมจะใส่น้ำกรองอาหารเหลว EPM ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน แล้ววัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น เลือกไอโซเลทที่ให้ผลการเกิด clear zone ต่อเชื้อทดสอบทั้งสามชนิด หรือเกิด 2 ใน 3 มาทดสอบในขั้นต่อไป

2.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชบนผลลำไย (ปริญา, 2538)

ใช้ลำไยพันธุ์เขียวเขียวที่เก็บจากสวนมาใหม่ๆ ของนางฟองคำ ทาหะพรหม ตำบลน้ำดิบ อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน นำมาคัดผลให้มีขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีบาดแผลหรือรอยทำลายใดๆ บนผล จากนั้นนำมาตัดขั้วผล เช็ดผลและขั้วผลด้วยแอลกอฮอล์ 70% วางผลในถาดโฟมที่สะอาด ขนาด 5x8 inch ถาดละ 30 ผล โดย 1 ถาดเท่ากับ 1 ซ้ำ แต่ละวิธีการทดลองจะทำซ้ำ 3 ซ้ำ จุ่มผลลำไยในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 10 นาที นำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น

2.4 การศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือนบริเวณเปลือกนอกผลลำไย

สุ่มผลลำไยจากข้อ 2.3 วิธีการละ 5 ผล ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 ml ซึ่งมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 50 ml และ Tween 20 อัตราส่วน 100:0.04 v/v ปิดปากขวดแก้วด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Thermolyne รุ่น ROSI 1000™) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยที่ได้มาเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อจากนั้นนำสารแขวนลอยปริมาตร 0.1 ml มาทำ spread plate บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร PDA

3. ศึกษาสมบัติบางประการของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้งราก่อโรค

3.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสโดยการหาค่า chitinase activity และ specific activity

วัดการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสของไอโซเลทที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบโดย cylinder plate method ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท H11 และเชื้อราไอโซเลท CT12

การหาค่า chitinase activity วัดได้จาก N-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทโดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) และใช้ N-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก จ) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย
 - enzyme control : น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 300 μ l ผสมกับ 0.2 M phosphate buffer pH 7.5 (ภาคผนวก ง) 1,200 μ l
 - substrate control : substrate buffer 1,200 μ l (collodial chitin 25% ใน 0.2 M phosphate buffer pH 7.5) ผสมกับ 0.2M phosphate buffer pH 7.5 300 μ l
 - enzyme substrate : น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 300 μ l ผสมกับ substrate buffer 1,200 μ l
 บ่ม reaction mixture ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
2. เติม 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 2 ml ลงในแต่ละหลอด ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว
3. เติมสารละลาย sodium-potassium tartrate (Fisher chemical) ความเข้มข้น 40% ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer (Heidolph)
4. นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 6,000 รอบต่อนาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm (Shimazu UV 2000 Japan) โดยใช้ 0.2 M phosphate buffer pH 7.5 เป็น blank นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน N-acetylglucosamine (ภาคผนวก ง) แล้วนำไปคำนวณค่า chitinase activity (ภาคผนวก จ)

หน่วยการทำงานของเอนไซม์ (unit of enzyme)

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย N-acetylglucosamine 1 μ mol ในเวลา 1 นาที

การหาค่า specific activity หาได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

1. นำน้ำเลี้ยงปริมาตร 300 μ l เติม reagent C (ภาคผนวก ง) 3 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
2. เติมสารละลาย 1 N Folin reagent (ภาคผนวก ง) หลอดละ 0.3 ml เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm เทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (ภาคผนวก จ) เพื่อนำไปคำนวณค่า specific activity (ภาคผนวก จ)

3.2 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

3.2.1. บดแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MERCK) ให้เป็นผงละเอียด ซึ่งผงแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้น้ำหนักตามเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวที่ต้องการทดสอบ (ภาคผนวก ข) ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80% ตามลำดับ เพื่อทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีน

3.2.2. เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปช้า ๆ ใน supernatant ที่เตรียมในข้อ 3.2.1 ปริมาตร 20 ml ในหลอดเซนตริฟิวส์ (centrifuge tube) ขนาด 50 ml ในแต่ละเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตพร้อมกับเขย่าโดยใช้ vortex mixer จนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ข้ามคืนหรือประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนได้สมบูรณ์

3.2.3. ทำการเก็บตะกอนโดยนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที 4°C 15 นาที

3.3 ศึกษาคุณสมบัติในการทนความร้อน

นำส่วนของ supernatant และละลายตะกอนด้วย phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 1 ml ไปทดสอบผลการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี cylinder cup method โดยนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 0, 3, 5, 10 และ 15 นาที ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น

3.4 บ่งบอกชนิดของเชื้อราไอโซเลท CT12 และแบคทีเรียไอโซเลท H11

โดยเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราในหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 1987) และสำหรับแบคทีเรียเทียบกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994)