โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การตอบสนองทางเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช *Ralstonia solanacearum* ต่อสารที่ผลิตจากแบคทีเรียควบคุมโรคพืช *Bacillus spp*. BC5

Metabolic response of wilt-causing bacteria *Ralstonia solanacearum* to biocontrol agents from bacteria *Bacillus spp.* BC5

ชื่อนิสิต นายวิทยา โสมณวัตร เลขประจำตัว 6033090623

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตอบสนองทางเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช Ralstonia solanacearum ต่อสารที่ผลิตจากแบคทีเรียควบคุมโรคพืช Bacillus spp. BC5

Metabolic response of wilt-causing bacteria Ralstonia solanacearum to biocontrol agents from bacteria Bacillus spp. BC5

โดย

นายวิทยา โสมณวัตร์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ชื่อโครงการ การตอบสนองทางเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช *Ralstonia solanacearum* ต่อสารที่ผลิตจากแบคทีเรียควบคุมโรคพืช *Bacillus spp.* BC5

โดย นายวิทยา โสมณวัตร์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนวัช อาชวาคม ประธานกรรมการ
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจริญขวัญ ไกรยา กรรมการ
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวีร์ โฮเว่น)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2564

ชื่อโครงการ การตอบสนองทางเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช *Ralstonia solanacearum* ต่อสารที่ผลิตจากแบคทีเรียควบคุมโรคพืช *Bacillus spp.* BC5
ชื่อนิสิตในโครงการ นายวิทยา โสมณวัตร์ เลขประจำตัว 6033090623
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

Ralstonia solanacearum เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* และการเกิดโรคเหี่ยวในพืชได้ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โดยเริ่มต้นจากการหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง ซึ่งพบว่าเชื้อทั้งสองชนิด สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ casamino acid-peptone-glucose (CPG) จากนั้น เลี้ยง BC5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ มาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรอง หรือสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต แล้วนำมาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG ที่ใส่เชื้อ *R. solanacearum* ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบการเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 ปริมาตร 3.0, 3.5 และ 4.0 mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG 20 mL ทำให้การเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* ลดลงเหลือ 58, 50 และ 39 % ของการเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* เมื่อไม่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 ที่เวลา 9 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 ใน DMSO ปริมาตร 3.5, 4.0 และ 4.5 mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG 20 mL ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* ลดลงเหลือ 58, 50 และ 38 % ของการเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* เมื่อไม่ใส่สารสกัดที่เวลา 9 ชั่วโมง ตามลำดับ

คำสำคัญ: *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus spp.*

Project Title Metabolic response of wilt-causing bacteria *Ralstonia solanacearum* to biocontrol agents from bacteria *Bacillus spp.* BC5

Student Name Wittaya Somanawat Student ID 603090623

Advisor Name Assistant Professor Dr. Nawaporn Vinayavekhin

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

Ralstonia solanacearum is a bacterium that cause wilt disease plants, such as tomato potatoes and gingers. From previous research , it was found that the bacteria *Bacillus spp.* strain BC5 could inhibit the growth of *Ralstonia solanacearum* and wilt disease. However, the mechanism of how this works was still unknown. Thus, this research aims studying the effect of biocontrol agents from *Bacillus spp.* strain BC5 on the growth inhibition of *R. solanacearum*. The work started from finding suitable media for the experiments, which found that both bacteria grow well in casamino acid-peptone-glucose (CPG) media. After that BC5 was grown in CPG media for 24 hours. The supernatant of which was either sterilized filtered or extracted with ethyl acetate, and used to test the growth of *R. solanacearum*. The results indicated that 3.0, 3.5 and 4.0 mL of BC5 supernatant in 20 mL CPG media led to the reduction in growth of *R. solanacearum* to 58, 50 and 39 % of the untreated *R. solanacearum* after 9 hours of incubation, respectively. The results were similar to those obtained with 3.5, 4.0 and 4.5 mL of BC5 supernatant ethyl acetate extracts in DMSO in 20 mL CPG media, which reduced the growth of *R. solanacearum* to 58, 50 and 38 % of those of the *R. solanacearum* cultures without addition of the extracts after 9 hours of incubation, respectively.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus spp.*

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้ถ้าขาดความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่คอยให้คำปรึกษา แนะแนวทางในการทำโครงการ ถ่ายทอดความรู้ และบอกถึงข้อบกพร่องในการทำโครงการ

ขอขอบคุณนายคณิน เลิศรังสี ที่ช่วยสอนการใช้เครื่อง Rotary evaporator เครื่อง autoclave และสอนวิธีทำ high vacuum

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพี่ๆทุกคนในห้องปฏิบัติการชีวเคมี ที่ช่วยให้คำแนะนำ ชี้แจงการใช้อุปกรณ์ต่างๆในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่คอยเป็นกำลังใจจนโครงการสำเร็จ และขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนในการทดสอบนิสิตก่อนจบการศึกษา ในการฝึกประสบการณ์ก่อนทำงานจริง

นาย วิทยา โสมณวัตร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญแผนภาพและตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	1
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 2 การทดลอง	4
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์	4
2.2 รายการสารเคมี	5
2.3 ขั้นตอนการทดลอง	5
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	18
3.1 ทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* และ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ	18
3.2 การทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก Bacillus spp. สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N =1)	20
3.3 การทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N = 6)	23
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	29
ประวัติผู้วิจัย	40

สารบัญแผนภาพและตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างผลการวัดค่า OD600 ของ RS ใน MM media 9

ตารางที่ 2.2 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 13

ตารางที่ 2.3 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 13

ตารางที่ 2.4 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติม สารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ 9 ชั่วโมง 14

ตารางที่ 2.5 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ 9 ชั่วโมง 14

ตารางที่ 2.6 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 16

ตารางที่ 2.7 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 17

ตารางที่ 3.1 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) (N = 6) 23

ตารางที่ 3.2 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) (N = 6) 24

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ surfactin iturin และ fengycin 3

รูปที่ 2.1 การทดลองการสกัดเอทิลอะซิเตตของ Bacillus spp 11

รูปที่ 3.1 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media เทียบกับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM media 18

รูปที่ 3.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 เทียบกันของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media, CPG media และ MM media 19

รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) 20

รูปที่ 3.4 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ 9 ชั่วโมง 22

รูปที่ 3.5 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) (N = 6) 24

รูปที่ 3.6 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) (N = 6) 25

สัญลักษณ์และคำย่อ

RS	*Ralstonia solanacearum*
BC5	*Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5
CPG	casamino acid-peptone-glucose
OD600	Optical density ที่ 600 nm
O/N	Overnight culture
CM	Conditioned media
EtOAC ext	Ethyl acetate Extraction
eq	equilibrium
UV	Ultraviolet light

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีทางการเกษตรอย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณมาก แต่ผลของการใช้สารเคมี คือ การเกิดสารตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งเกิดผลเสียต่อสุขภาพทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการใช้สารทางชีวภาพเพื่อที่นำมาใช้ทดแทนและนำมาควบคุมการเกิดโรคในพืช จากงานวิจัยได้ค้นพบแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Ralstonia solanacearum* แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเข้าไปทำลายพืชและเป็นสาเหตุของการทำให้เกิดโรคเหี่ยวในพืชได้มากกว่า 200 ชนิด โดยพืชเศรษฐกิจที่มักเกิดปัญหาโรคเหี่ยวจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ยาสูบ ฯลฯ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้สามารถที่จะอยู่รอดในดินและในน้ำได้เป็นเวลานาน เมื่อเชื้อเข้าสู่พืชทางช่องเปิดบริเวณราก เชื้อจะเจริญไปตามระบบท่อลำเลียงน้ำ เกิดการเพิ่มจำนวน และแพร่กระจายไปทั่วต้น จึงทำให้เกิดการอุดตันในระบบท่อลำเลียงน้ำ ส่งผลให้ต้นพืชขาดน้ำและแสดงอาการเหี่ยวตายทั้งต้น [1] โดยทั่วไปแล้วจะการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาใช้เป็น biocontrol ในการควบคุมโรคในพืช เพราะเป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเชื้อราได้หลายชนิด เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปในดิน [2] แต่พบว่าราชนิดนี้ไม่สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้ เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถป้องกันและควบคุมสารเคมีบางอย่าง ทำให้สารเคมีจากยาปฏิชีวนะ หรือ สารเคมีจากเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่ใช้เป็น biocontrol ไม่สามารถที่จะให้ผลใดๆ กับเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้ [3] เพราะเหตุนี้ จากการที่พืชบางต้นไม่เกิดโรคเหี่ยว อาจเพราะในดินที่ต้นพืชเจริญอยู่นั้นมีแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการควบคุมแบคทีเรียดังกล่าวที่ทำให้ไม่เกิดโรคเหี่ยว ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus spp*. เป็นแบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก อยู่ในวงศ์ Bacillaceae โดยสามารถสร้างสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี สามารถพบได้ในดินทั่วไป โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีสามารถที่จะควบคุมและป้องกันโรคในพืชได้ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์รวมถึงแบคทีเรีย รา และไส้เดือนฝอย [4] จึงจะทำการศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 ว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้จริงหรือไม่

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

เพื่อศึกษาการตอบสนองของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ต่อสารสกัดที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus spp.* BC5

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่าง และขนาดของเชื้อเป็นรูปร่างแท่งเล็กๆ หัวท้ายมน มีขนาดรูปร่างที่แตกต่างกันตามสภาพของอาหาร และสิ่งแวดล้อมที่เจริญเติบโต เชื้อชนิดนี้ไม่สามารถสร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูล ติดสีแกรมลบ [6]

แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิด โรคเหี่ยวเขียว หรือ bacterial wilt ในพืชได้มาถึง 200 ชนิด โดยสามารถอยู่รอดได้ในดินและในน้ำเป็นเวลานาน และแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตทางการเกษตร เช่น ขิง งา มะเขือเทศ มะเขือยาว มันฝรั่ง พริก ยาสูบ เป็นต้น เมื่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เข้าสู่พืชผ่านช่องทางเปิดบริเวณราก เชื้อจะทำการเจริญเติบโตตามระบบท่อลำเลี้ยงน้ำ (xylem) แล้วแพร่กระจายไปทั่วต้น โดยทำการปล่อยสารชนิดหนึ่งในกลุ่ม exopolysaccharid (EPS) ออกมาเป็นปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดการอุดตันของท่อลำเลียงน้ำ และทำให้พืชเกิดอาการขาดน้ำ แสดงอาการเหี่ยวตายทั้งต้น [1] ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และชุมพร [6]

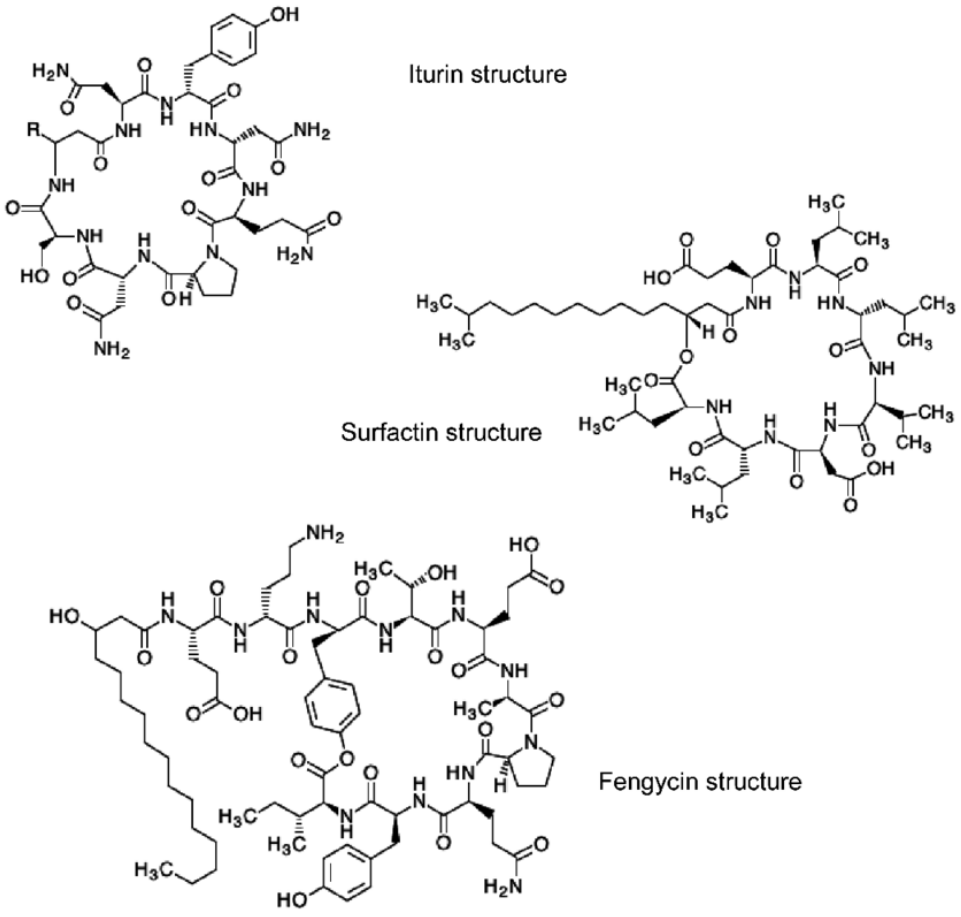
1.3.2 แบคทีเรีย *Bacillus spp*

Bacillus spp เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อยู่ในวงศ์ Bacillaceae มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน ทรงกระบอก อาจมีท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย ต้องการออกซิเจนในการหายใจ และบางครั้งก็สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ในที่ไม่มีออกซิเจน สามารถที่จะสร้างสปอร์ได้ ทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ อาหารมีความหลากหลาย และเติบโตได้อุณหภูมิปกติ [7]

โดยแบคทีเรียชนิดนี้มีสามารถที่จะควบคุมและป้องกันโรคในพืชได้ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์รวมถึงแบคทีเรีย รา และไส้เดือนฝอย [4] โดย *Bacillus spp* มีกลไกในการควบคุมโรคในพืชได้ โดยใช้วิธีการแข่งขันกับเชื้อชนิดอื่นในการเจริญเติบโต และผลิตสารที่มีคุณสมบัติที่จะสามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อชนิดอื่นได้ โดยมีรายงานว่า *Bacillus spp* สายพันธุ์ AP01 สามารถเติบโตแข่งกับเชื้อรา *Fusarium roseum* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเหี่ยวและโรคโคนเน่าของกล้วยไม้ได้ [7]

1.3.3 งานวิจัยการทดลองเชื้อ *Ralstonia solanacearum* กับ *Bacillus velezensis*

จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีการทดลองเกี่ยวกับการนำแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* ทำการทดลองกับแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และ เชื้อรา *Fusarium oxysporum* จากการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus velezensis* สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ และทำการค้นพบสารประกอบไลโปเปปไทด์ (Lipopeptide) 3 ชนิด ได้แก่ surfactin iturin และ fengycin ซึ่งสารประกอบดังกล่าวมีฤทธิ์ที่จะทำการต่อต้านของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และ เชื้อรา *Fusarium oxysporum* [5]



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ surfactin iturin และ fengycin [8]

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 สารตัวอย่าง

เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. บีกเกอร์
2. กระบอกตวง
3. แท่งคนแม่เหล็ก
4. ขวดขนาด 60 mL
5. ขวดขนาด 600 mL
7. culture tube
8. microtube
9. จานเลี้ยงเชื้อที่มี LB และ CPG agar
10. หลอด centrifuge 50 mL
11. tipe 1 mL ,tipe 5 mL ,tipe 200 mL
12. filter 0.2 ไมโครมิลลิเมตร
13. syringe filter
14. ไมโครปิเปต ขนาด 1 mL ,5 mL ,200 mL
15. เครื่อง autoclave
16. ตู้ laminar flow
17. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
18. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
19. เครื่อง centrifuge สำหรับใส่หลอด centrifuge 50 mL
20. เครื่อง Incubatorshaker
21. เครื่อง Rotary evaporator
22. ตู้สำหรับเก็บเชื้อ 4 องศา ,-20 องศา ,-80 องศา
23. ตู้สำหรับบ่มเชื้อ 30 องศา
24. เครื่องวัดค่า Optical Density 600 nm
25. เครื่อง magnetic stirrer
26. pH meter

27. toothpick

28. loop สำหรับขีดเชื้อ

2.3 สารเคมี

1. ethyl acetate

2. casamino acid

3. peptone (meat)

4. D-glucose

5. DMSO

6. tryptone

7. yeast extract

8. NaCcl

9. ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)

10. potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)

11. ferrous sulfate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)

12. magnesium sulfate($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

13. 50 % glucose

1.4 KOH

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. ทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* และ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media 210 mL

สารเคมี	น้ำหนัก
tryptone	2.1 กรัม
yeast extract	1.05 กรัม
NaCl	2.1 กรัม

ขั้นตอนการเตรียม LB media 210 mL

1. เตรียมน้ำ DI water ประมาณ 150 mL ใส่ในภาชนะผสมบนเครื่อง magnetic stirrer
2. ชั่งสาร tryptone, yeast extract และ NaCl ตามที่กำหนด เทใส่ในภาชนะผสม เปิดเครื่อง magnetic stirrer ผสมจนสารเป็นเนื้อเดียวกัน

3. เทสารผสมลงในกระบอกตวงทำการปรับปริมาตรด้วย dropper จนกระทั่งได้ปริมาตร 210 mL
4. เท LB media จากกระบอกตวงใส่ขวดขนาด 600 mL ปิดฝาครึ่งเกลียว แล้วคลุมด้วยฟรอยด์ เตรียมไว้ autoclave

1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media 200 mL

สารเคมี	น้ำหนัก
Casamino acid	0.2 กรัม
peptone (meat)	2.0 กรัม
D-glucose	1.0 กรัม

ขั้นตอนการเตรียม CPG media 200 mL

1. เตรียมน้ำ DI water ประมาณ 150 mL ใส่ในภาชนะผสมบนเครื่อง magnetic stirrer
2. ชั่งสาร Casamino acid, peptone (meat) และ D-glucose ตามที่กำหนด เทใส่ในภาชนะผสม เปิดเครื่อง magnetic stirrer ผสมจนสารเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เทสารผสมลงในกระบอกตวงทำการปรับปริมาตรด้วย dropper จนกระทั่งได้ปริมาตร 200 mL
4. เท CPG media จากกระบอกตวงใส่ขวดขนาด 600 mL ปิดฝาครึ่งเกลียว แล้วคลุมด้วยฟรอยด์ เตรียมไว้ autoclave

1.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MM media 200 mL

สารเคมี	น้ำหนัก
$(NH_4)_2SO_4$	0.1 กรัม
KH_2PO_4	0.68 กรัม
$FeSO_4{\cdot}7H_2O$	0.02 mL
1 M $MgSO_4{\cdot}7H_2O$	0.05 mL (ทำการใส่หลังจากที่ autoclave แล้ว)
50 % glucose	0.8 mL (ทำการใส่หลังจากที่ผ่านการ filter แล้ว)

ขั้นตอนการเตรียม $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ และ $MgSO_4{\cdot}7H_2O$

1. เตรียม $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ โดยทำการชั่ง 12.5 mg เตรียมใส่หลอดขนาด 15 mL เติมน้ำ DI water และปรับปริมาตรด้วย dropper ให้ได้ 10 mL โดยใช้สเกลบนหลอด
2. เตรียม 1 M $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ โดยชั่ง 1.232 g เตรียมใส่หลอดขนาด 15 mL เติมน้ำ DI water ทำการปรับปริมาตรด้วย dropper ให้ได้ 10 mL โดยใช้สเกลบนหลอด จากนั้นทำการเทใส่ขวด 30 mL ปิดฝาครึ่งเกลียวแล้วนำไป autoclave

ขั้นตอนการเตรียม 50 % glucose

1. ชั่ง D-glucose 10 g ละลายใน DI water 20 mL ในหลอด 50 mL

2. ทำให้ละลายโดยการเข้าไมโครเวฟ ปิดฝาครึ่งเกลียว จ้องจนกว่าจะเดือด และปิดไมโครเวฟทันทีเมื่อเดือด
3. เขย่าด้วยเครื่อง votexmixer เก็บใส่ตู้เย็น 4 องศา
4. ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการทำ syringe filter 0.2 ไมโครมิลลิเมตร ใส่หลอด 50 mL ที่ autoclave แล้ว

ขั้นตอนการเตรียม MM media 200 mL

1. เตรียมน้ำ DI water ประมาณ 150 mL ใส่ในภาชนะผสม บนเครื่อง magnetic stirrer
2. ชั่งสาร $(NH_4)_2SO_4$ และ KH_2PO_4 ตามที่กำหนด เทใส่ในภาชนะผสม เปิดเครื่อง magnetic stirrer ผสมจนสารเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใช้ไมโครปิเปต ปิเปต $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่เราเตรียมไว้แล้ว 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะผสม
3. ทำการเตรียม 1M KOH เพื่อใช้ในการปรับค่า pH ของสารให้ได้เท่ากับ 7 เตรียม KOH $1\frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 40\ \text{mL} \times 56.11\frac{\text{g}}{\text{mol}} = 2.244\ \text{g}$
4. ชั่ง KOH ตามที่คำนวณ (ชั่งได้จริง 2.256 g ดังนั้นจึงต้องปรับปริมาตรเป็น 40.2 mL)
5. เมื่อเตรียม 1M KOH ค่อยๆ หยด KOH ลงในสารผสมเพื่อปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7 โดยอ่านค่า pH บนเครื่อง pH meter โดยสารผสมตั้งอยู่บนเครื่อง magnetic stirrer
6. เทสารผสมที่ปรับค่า pH แล้วใส่กระบอกตวงแล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 200 mL
7. เท MM media จากกระบอกตวงใส่ขวดขนาด 600 mL ปิดฝาครึ่งเกลียว แล้วคลุมด้วยฟรอยด์ เตรียมไว้ autoclave
8. หลังจาก autoclave MM media 200 mL แล้ว เติม 1 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 mL และ 50 % glucose 0.8 mL ที่ sterile แล้วในขวด MM media

1.4 ทำการ autoclave ของที่ใช้ในการทดลองเพื่อทำการฆ่าเชื้อ (ขวดทุกขวดปิดฝาครึ่งเกลียว)

- toothpick
- microtube
- culture tube
- 15 mL tube
- หลอด centrifuge 50 mL
- tipขนาดต่างๆ 1 mL , 5 mL , 200 mL

- ขวดขนาด 60 mL 24 ขวด
- อาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ,CPG media ,MM media
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

1.5 ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และ แบคทีเรีย *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ลง plate และทำการบ่มในตู้สำหรับบ่มเชื้อ 30 องศา

1. ทำการเตรียมตู้ laminar flow โดยการเปิดแสง UV เป็นการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการเช็ดพื้นผิวของตู้ laminar flow ด้วยแอลกอฮอล์ เปิดไฟและเปิดเป่าอากาศ
2. นำเชื้อ RS และ BC5 ใน microtube ที่แช่แข็งในตู้ -80 องศา ใส่ถังเก็บความเย็น เตรียม plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ CPG เตรียมไว้ภายในตู้ laminar flow
3. ทำการฆ่าเชื้อ loop สำหรับขีดเชื้อ โดยการจุ่ม 95% EtOH แล้วลนไฟให้ทั่วปลายจนเป็นสีส้ม พักไว้ให้หายร้อน
4. ทำการขีดเชื้อ RS ลงในเตรียม plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ CPG
5. ทำการขีดเชื้อ BC5 ลงในเตรียม plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ CPG
6. นำเชื้อ RS และ BC5 ใน microtube เก็บเข้าตู้-80 องศา ทันที
7. ทำการบ่มเชื้อที่ 30 องศา (ทำการบ่มวันที่ 31/08/2563 เวลา 16.50 น.)

1.6 เตรียม LB media, CPG media และ MM media ใส่ขวดขนาด 60 mL โดยทำการปิเปต media ละ 20 mL อย่างละ 3 ขวด เตรียมไว้ 2 ชุดเพื่อทำการเลี้ยงเชื้อ RS และ BC5 รวมทั้งหมด 18 ขวด เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (ทำใน laminar flow)

1.7 เตรียม LB media, CPG media และ MM media 5 mL ใส่หลอด culture tube โดยเตรียม 2 ซ้ำ สำหรับเชื้อ RS และ BC5 รวมทั้งหมด 12 หลอด เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (ทำใน laminar flow)

1.8 ทำการ inoculate เชื้อ RS และ BC5 ลงใน culture tube ที่เตรียม LB media, CPG media และ MM media 5mL (ข้อ 1.7) ไว้แล้ว แล้วนำเข้าเครื่อง Incubatorshaker ทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง เพื่อเป็น overnight culture

1.9 ทำการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อ RS และ BC5 ใน LB media, CPG media และ MM media (ผลจากการสังเกต overnight culture จากความขุ่นของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อ RS ไม่โตใน LB media จึงทำการทดลองโดย RS เลี้ยงใน CPG media และ MM media ส่วน BC5 ใน LB media, CPG media และ MM media) (วันที่ทำการทดลอง 2/09/2563)

1. ปิเปต O/N ของเชื้อ RS (จากข้อ 1.8) 400 ไมโครลิตร ใส่ CPG media และ MM media ที่เตรียมจากข้อ 1.6 และเก็บ O/N ใส่ microtube เพื่อวัดค่า OD600

2. ปิเปต O/N ของเชื้อ BC5 (จากข้อ 1.8) 400 ไมโครลิตร ใส่ LB media, CPG media และ MM media ที่เตรียมจากข้อ 1.6 และเก็บ O/N ที่เหลือใส่ microtube เพื่อวัดค่า OD600
3. นำขวดที่มีทั้งเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าเครื่อง Incubatorshaker แล้วทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง โดยเก็บ 1 mL ใส่ microtube แล้วเก็บตัวอย่างใส่ในน้ำแข็ง เพื่อรอวัดค่า OD 600 โดยทำการวัด 2 ซ้ำ หรือค่าห่างกันไม่เกิน 0.01 จะได้ตัวอย่างที่ทำการเลี้ยงไว้เป็น 3 h, 6 h, 9 h, 12 h และสุดท้าย 24 h (เริ่มเข้าเครื่อง Incubatorshaker 6:52 น.)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างผลการวัดค่า OD600 ของ RS ใน MM media

RS (MM)	ขวดที่ 1		ขวดที่ 2		ขวดที่ 3	
Time (h)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
0 (dilute x3)/50	0.073x3	0.076x3	-	-	-	-
3 (dilute x3)	0.002x3	0.006x3	0.004x3	0.009x3	0.005x3	0.001x3
6 (dilute x3)	0.004x3	0.004x3	0.005x3	0.004x3	0.007x3	0.003x3
9 (dilute x3)	0.006x3	0.005x3	0.007x3	0.01x3	0.012x3	0.007x3
12 (dilute x3)	0.017x3	0.048x3	0.026x3	0.023x3	0.0014x3	0.0017x3
24 (dilute x3)	0.108x3	0.107x3	0.122x3	0.128x3	0.204x3	0.203x3

วิธีการคำนวณหาค่าOD600

ค่า OD600 ของ overnight culture หรือ ที่เวลา 0 h = (ค่าOD600 x ค่า dilute เท่า)/50

ค่า OD600 ของเวลาล่างต่าง = (ค่าOD600 x ค่า dilute เท่า)

2. การเตรียมสารสกัดเอทิลอะซิเตตของ *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 สำหรับใช้ในการทดสอบการตอบสนองของ *Ralstonia solanacearum* ต่อสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp*.

2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media 600 mL

สารเคมี	น้ำหนัก
Casamino acid	0.6 กรัม
peptone (meat)	6.0 กรัม
D-glucose	3.0 กรัม

ขั้นตอนการเตรียม CPG media 600 mL

1. เตรียมน้ำ DI water ประมาณ 550 mL ใส่ในภาชนะผสม บนเครื่อง magnetic stirrer
2. ชั่งสาร Casamino acid, peptone (meat) และ D-glucose ตามที่กำหนด เทใส่ในภาชนะผสม เปิดเครื่อง magnetic stirrer ผสมจนสารเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เทสารผสมลงในกระบอกตวง ทำการปรับปริมาตรโดยใช้น้ำ DI water ด้วย dropper จนได้ปริมาตร 600 mL
4. เท CPG media จากกระบอกตวงใส่ขวดขนาด 600 mL ปิดฝาครึ่งเกลียว แล้วคลุมด้วยฟรอยด์ เตรียมไว้ autoclave

2.2 autoclave อุปกรณ์ และ อาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media

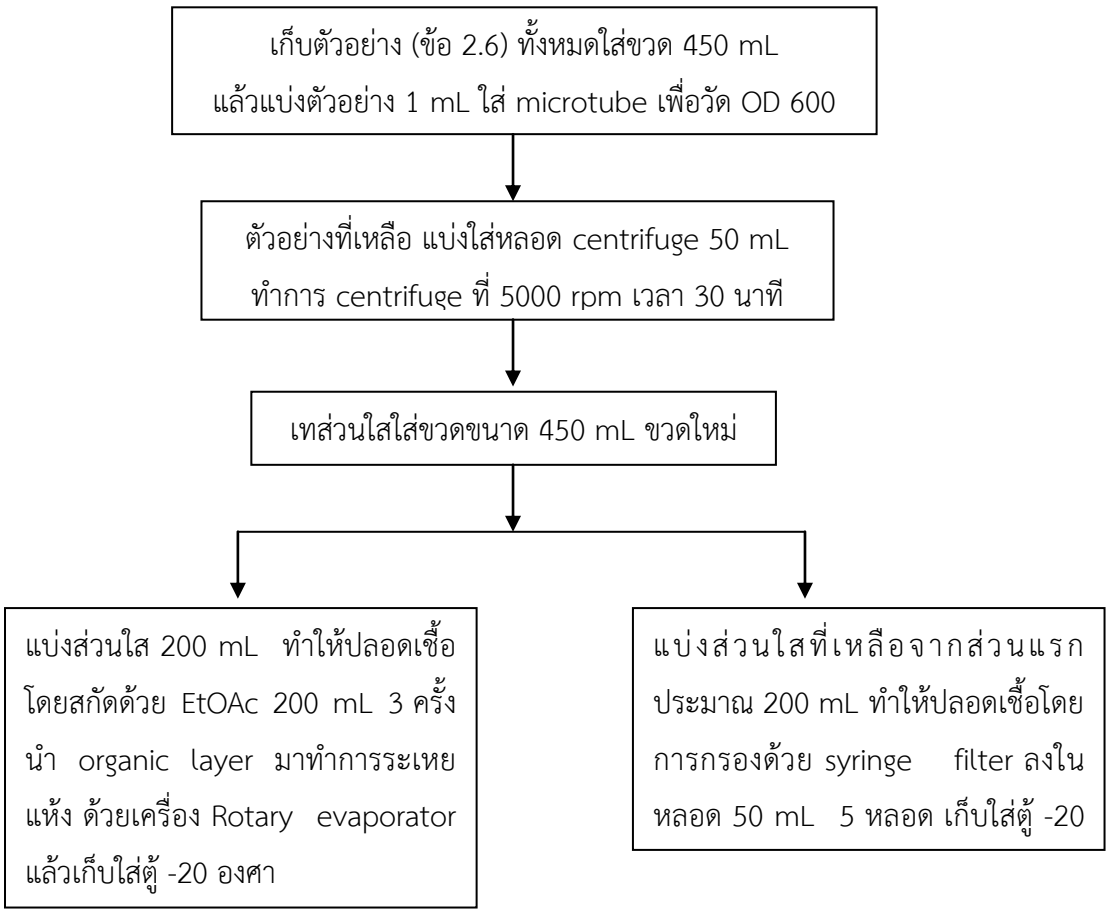
2.3 ทำการเตรียมเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 ลงplate CPG agar และทำการบ่มในตู้สำหรับบ่มเชื้อ 30 องศา (บ่มวันที่ 19/09/2563 เวลา 11:11 น.)

2.4 เตรียม CPG media ใส่ขวดขนาด 60 mL โดยทำการปิเปต media 20 mL รวมทั้งหมด 21 ขวด (420 mL) เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (ทำใน laminar flow) และเตรียม CPG media ใส่หลอด culture tube ปิเปต 5 mL จำนวน 3 หลอด

2.5 ทำการ inoculate BC5 ลงใน culture tube ที่เตรียม CPG media (ข้อ 2.4) แล้วนำเข้าเครื่อง Incubatorshaker ทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง เพื่อเป็น overnight culture (21/09/2563 เวลา 15:52 น.)

2.6 ปิเปต O/N ของเชื้อ BC5 400 ไมโครลิตร (ข้อ 2.5) ใส่ CPG media 21 ขวด (ข้อ 2.4) นำเข้าเครื่อง Incubatorshaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (22/09/2563 เวลา 08:40 น.)

2.7 เก็บตัวอย่างเพื่อเตรียมสารสกัดเอทิลอะซิเตตของ *Bacillus spp*



รูปที่ 2.1 การทดลองการสกัดเอทิลอะซิเตตของ *Bacillus spp*

3. การทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N =1)

3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media 300 mL

สารเคมี	น้ำหนัก
Casamino acid	0.3 กรัม
peptone (meat)	3.0 กรัม
D-glucose	1.5 กรัม

3.2 autoclave อุปกรณ์ และ อาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media

3.3 ทำการเตรียมเชื้อ แบคทีเรีย RS ลง plate CPG agar และทำการบ่มในตู้สำหรับบ่มเชื้อ 30 องศา 2 วัน (บ่มวันที่ 5/10/2563 เวลา 12:26 น.)

3.4 ทำการละลายสารสกัดจาก *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 200 mL ที่ทำการระเหยแห้งแล้ว น้ำหนักสาร 41.0 mg (EtOAc ext) ด้วยตัวทำละลาย DMSO (จากผลการทดลองสารสกัดละลายหมดเมื่อเติม DMSO 2 ml) แล้วทำการกรองผ่าน syringe filter (BC5 DMSO)

3.5 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติม สารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL และ 40 mL โดยทำการเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่เราทำการสกัด 200 mL (ข้อ3.4) (conc. eq.)

<u>กำหนดการทดลอง A</u> : การทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext)

การคำนวณหาว่าแต่ละความเข้มข้นควรเติม EtOAc ext กี่ไมโครลิตร

A1 : ความเข้มข้น 20 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 20 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = $\frac{\mathbf{20\ mL\ x\ 2\ mL}}{\mathbf{200\ mL}}$ = 0.2 mL หรือ 200 ไมโครลิตร

A2 : ความเข้มข้น 10 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 10 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = $\frac{\mathbf{10\ mL\ x\ 2\ mL}}{\mathbf{200\ mL}}$ = 0.1 mL หรือ 100 ไมโครลิตร

A3 : ความเข้มข้น 40 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 40 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = $\frac{\mathbf{40\ mL\ x\ 2\ mL}}{\mathbf{200\ mL}}$ = 0.4 mL หรือ 400 ไมโครลิตร

A4 : ความเข้มข้น 5 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 5 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = $\frac{\mathbf{5\ mL\ x\ 2\ mL}}{\mathbf{200\ mL}}$ = 0.05 mL หรือ 50 ไมโครลิตร

A5 : ความเข้มข้น 2 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 2 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = $\frac{\mathbf{2\ mL\ x\ 2\ mL}}{\mathbf{200\ mL}}$ = 0.02 mL หรือ 20 ไมโครลิตร

A6 : ความเข้มข้น 0 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 0 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = $\frac{\mathbf{0\ mL\ x\ 2\ mL}}{\mathbf{200\ mL}}$ = 0 mL หรือ 0 ไมโครลิตร

จากนั้นทำการเติม DMSO เพื่อให้ปริมาตรแต่ละขวดเท่ากัน ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (7/10/2563)

ขวด sample	CPG media	BC5 (DMSO)	DMSO
A1	20 mL	200 µL	200 µL
A2	20 mL	100 µL	300 µL
A3	20 mL	400 µL	0 µL
A4	20 mL	50 µL	350 µL
A5	20 mL	20 µL	380 µL
A6	20 mL	0 µL	400 µL

3.6 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) (ส่วนใสที่ผ่านการ syringe filter ข้อ 2.7) 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL และ 20 mL ดังตารางที่ 2.3

<u>กำหนดการทดลอง B</u> : การทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media)

ตารางที่ 2.3 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (7/10/2563)

ขวด sampel	conditioned media	Fresh CPG
B1	20 mL	0 mL
B2	10 mL	10 mL
B3	5 mL	15 mL
B4	2 mL	18 mL
B5	1 mL	19 mL
B6	0 mL	20 mL

3.7 ทำการ Inoculate RS ลงใน culture tube ที่เตรียม CPG media 5 mL จำนวน 2 หลอด แล้วนำเข้าเครื่อง Incubatorshaker ทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง เพื่อเป็น overnight culture (7/10/2563 เวลา 15:58 น.)

3.8 ปิเปต overnight culture ของเชื้อ RS (จากข้อ 3.7) 400 ไมโครลิตร ใส่ media ที่เตรียมจากข้อ 3.5 และข้อ 3.6 ทุกขวด และเก็บ overnight culture ที่เหลือใส่ microtube เพื่อวัดค่า OD600

3.9 นำเชื้อ RS ที่ใส่ใน media ตามข้อ 3.8 เข้าเครื่อง Incubatorshaker เป็นเวลา 9 ชั่วโมง (8/10/2563)

3.10 เก็บตัวอย่าง วัดค่า OD600 แล้วสร้างกราฟการเจริญเติบโต

ตารางที่ 2.4 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติม สารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ 9 ชั่วโมง

sample	OD600		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
A1 (dilute x3)	0.108	0.105	0.1065
A2 (dilute x3)	0.138	0.159	0.1485
A3 (dilute x3)	0.102	0.12	0.111
A4 (dilute x3)	0.24	0.255	0.2475
A5 (dilute x5)	0.73	0.74	0.735
A6 (dilute x5)	0.84	0.845	0.8425

ตารางที่ 2.5 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ 9 ชั่วโมง

sample	OD600		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	เฉลี่ย
B1 (dilute x3)	0.072	0.075	0.0735
B2 (dilute x3)	0.141	0.129	0.135
B3 (dilute x3)	0.225	0.234	0.2295
B4 (dilute x5)	0.84	0.825	0.8325
B5 (dilute x5)	1.065	1.09	1.0775
B6 (dilute x5)	1.075	1.09	1.0825

4.การทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N = 6)

4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media 600 mL

สารเคมี	น้ำหนัก
Casamino acid	0.6 กรัม
peptone (meat)	6.0 กรัม
D-glucose	3.0 กรัม

4.2 autoclave อุปกรณ์ และ อาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media

4.3 ทำการเตรียมเชื้อ แบคทีเรีย RS ลง plate CPG agar และทำการบ่มในตู้สำหรับบ่มเชื้อ 30 องศา เป็นเวลา 2 วัน (บ่มวันที่ 13/11/2563 เวลา 14:52 น.)

4.4 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL โดยจากการทดลองที่ 3.5 ได้ทำการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติม สารสกัดจาก BC5 culture (EtOAc ext) โดยเลือกความเข้มข้น 3.5 mL, 4.0 mL, 4.5 mL และ 0 mL (คำอธิบายเอยู่ในบทที่ 3 ข้อที่ 3.2)

กำหนดการทดลอง A : การทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติม สารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext)

การคำนวณหาว่าแต่ละความเข้มข้นควรเติม EtOAc ext กี่ไมโครลิตร

A1 : ความเข้มข้น 3.5 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 3.5 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = (3.5 mL x 2 mL)/200 mL = 0.035 mL หรือ 35 ไมโครลิตร

A2 : ความเข้มข้น 4.0 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 4.0 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = (4.0 mL x 2 mL)/200 mL = 0.04 mL หรือ 40 ไมโครลิตร

A3 : ความเข้มข้น 4.5 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 4.5 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = (4.5 mL x 2 mL)/200 mL = 0.045 mL หรือ 45 ไมโครลิตร

A4 : ความเข้มข้น 0 mL (conc. eq.)

ความเข้มข้น 0 mL จาก สารสกัดจาก 200 mL ของ BC5 culture ที่ละลายด้วย DMSO 2 mL

ดังนั้นต้องใช้ BC5 (DMSO) = (0 mL x 2 mL)/200 mL = 0 mL หรือ 0 ไมโครลิตร

จากนั้นทำการเติม DMSO เพื่อให้ปริมาตรแต่ละขวดเท่ากัน ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

sample	ขวดที่	CPG media	BC5 (DMSO)	DMSO
A1	1	20 mL	35 µL	10 µL
	2	20 mL	35 µL	10 µL
	3	20 mL	35 µL	10 µL
A2	1	20 mL	40 µL	5 µL
	2	20 mL	40 µL	5 µL
	3	20 mL	40 µL	5 µL
A3	1	20 mL	45 µL	0 µL
	2	20 mL	45 µL	0 µL
	3	20 mL	45 µL	0 µL
A4	1	20 mL	0 µL	45 µL
	2	20 mL	0 µL	45 µL
	3	20 mL	0 µL	45 µL

4.5 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL โดยจากการทดลองที่ 3.6 ได้ทำการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) โดยเลือกความเข้มข้น 3.5 mL, 4.0 mL, 4.5 mL และ 0 mL (คำอธิบายอยู่ในบทที่ 3 ข้อที่ 3.2) ดังตารางที่ 2.7

<u>กำหนดการทดลอง B</u> : การทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media)

ตารางที่ 2.7 เตรียม media ใส่ขวด 60 mL เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

sample	ขวดที่	conditioned media	Fresh CPG
B1	1	3.0 mL	17 mL
	2	3.0 mL	17 mL
	3	3.0 mL	17 mL
B2	1	3.5 mL	16.5 mL
	2	3.5 mL	16.5 mL
	3	3.5 mL	16.5 mL
B3	1	4.0 mL	16 mL
	2	4.0 mL	16 mL
	3	4.0 mL	16 mL
B4	1	0 mL	20 mL
	2	0 mL	20 mL
	3	0 mL	20 mL

4.6 ทำการ Inoculate RS ลงใน culture tube ที่เตรียม CPG media 5 mL จำนวน 2 หลอด แล้วนำเข้าเครื่อง Incubatorshaker ทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง เพื่อเป็น overnight culture (17/11/2563 เวลา 14:00 น.)

4.7 ปิเปต overnight culture ของเชื้อ RS (จากข้อ 4.6) 400 ไมโครลิตร ใส่ media ทุกขวด ที่เตรียมจากข้อ 4.4 และข้อ 4.5 และเก็บ overnight culture ที่เหลือใส่ microtube เพื่อวัดค่า OD600

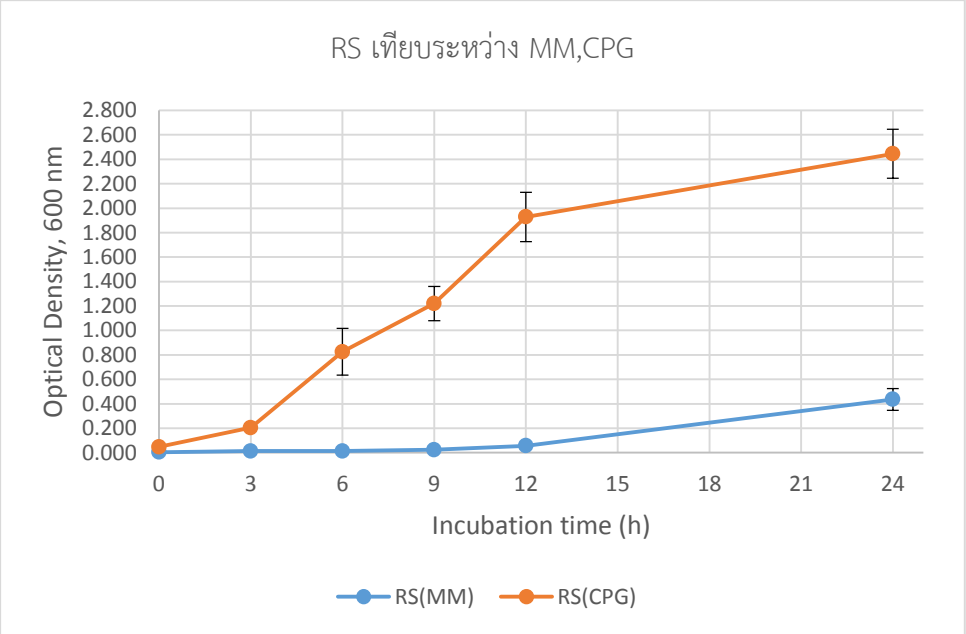
4.8 นำเชื้อ RS ที่ใส่ใน media ตามข้อ 4.7 เข้าเครื่อง Incubatorshaker เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 รอบ รอบละ 1 ml (18/11/2563)

4.9 เก็บตัวอย่าง วัดค่า OD600 แล้วสร้างกราฟการเจริญเติบโต

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 ทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* และ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

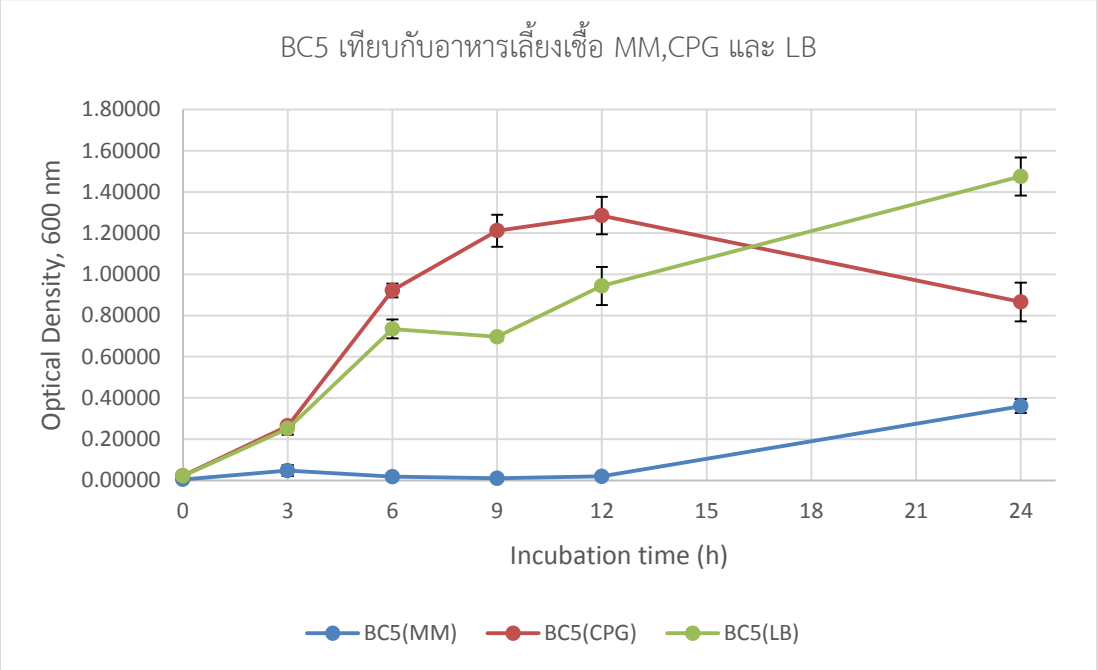
จากการทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และ แบคทีเรีย *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ LB media, CPG media และ MM media โดยทำการเก็บสารตัวอย่างแล้วนำไปวัดค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อหาว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดที่สามารถทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญเติบโตได้ดีมากที่สุด และไม่ทำให้แบคทีเรียนั้นตาย จากการทดลอง ได้ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อที่จะนำมาทำเป็นกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 อย่าง แล้วทำการสร้างกราฟการเจริญเติบโต โดยการนำค่าของ Optical Density มาทำการพล็อตกราฟ เทียบกับเวลา ได้กราฟการเจริญเติบโตดังรูปที่ 3.1 และ 3.2



รูปที่ 3.1 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media เทียบกับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM media

จากกราฟจะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media เพราะเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นในเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะเห็นระยะการเจริญเติบโต 3 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่แบคทีเรียเริ่มพบกับ

อาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ โดยแบคทีเรียทำการปรับตัวให้เข้ากับอาหารและพร้อมที่จะเจริญเติบโต ซึ่งจากในกราฟจะเป็นช่วง 3 ชั่วโมงแรก ระยะที่ 2 Exponential phase เป็นระยะที่แบคทีเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีการแบ่งส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ออกมาในระยะนี้ ซึ่งจะอยู่ที่ช่วงหลัง 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป ระยะที่ 3 Stationary phase (ระยะคงที่) คือ ระยะที่แบคทีเรียไม่มีการเพิ่มจำนวน ซึ่งหลังจาก 24 ชั่วโมงไปนั้น น่าจะเข้าสู่ระยะนี้ ดังนั้นจากที่กล่าวมา CPG media มีความเหมาะสมอย่างมากที่จะนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MM media จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่ช้ามาก จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลอง



รูปที่ 3.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 เทียบกันของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media, CPG media และ MM media

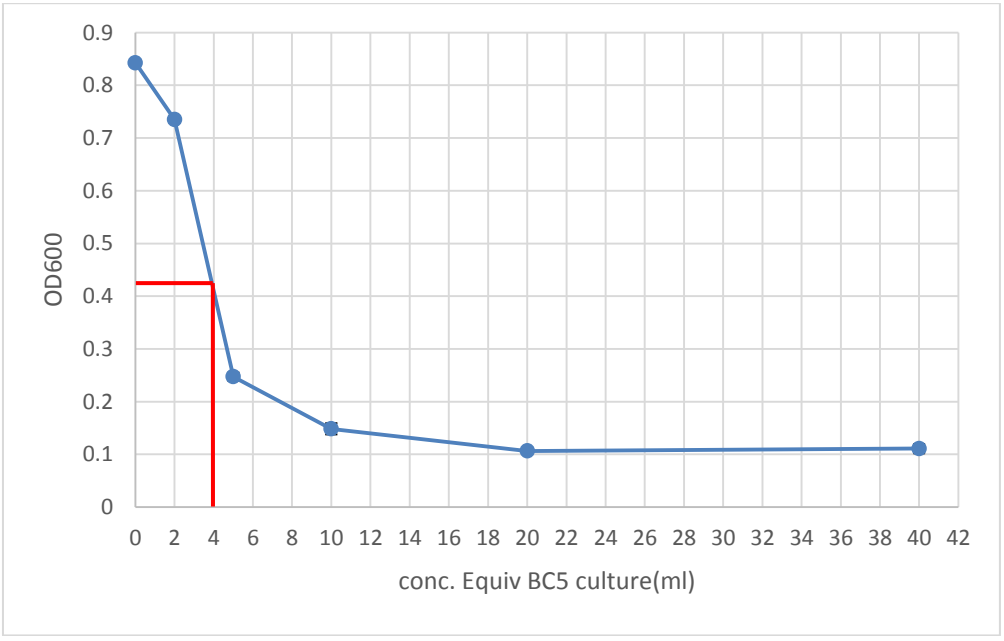
จากกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีที่เมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media เนื่องจากจะเห็นได้ว่าปริมาณของเชื้อมีมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ในช่วงเวลา 3 ชั่วโมง ถึง 15 ชั่วโมง (รูปที่ 3.2) ซึ่งเป็นช่วง Exponential phase ดังนั้น การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาทำการทดลองต่อไป

3.2 การทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N =1)

การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อที่จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ผลิตจากแบคทีเรีย BC5 สำหรับการทดลองถัดไป ซึ่งการพิจารณาความเข้มข้นที่เหมาะสม เราได้เลือกทำการทดลองโดยการสารจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture 2 แบบ คือ 1. สารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 ด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วนำไปทำการระเหย เพื่อให้ได้สารที่ผลิตจาก BC5 culture (EtOAc ext) และ 2. ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (conditioned) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media โดยความเข้มข้นต่างๆ ที่เลือกทำการทดลองแสดงดังตารางที่ 2.2 และ 2.3 แล้วทำการเลี้ยง 9 ชั่วโมง

จากการพิจารณาเพื่อที่จะเลือกหาความเข้มข้นที่จะไม่ทำให้เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ตายจนหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมง จะเลือกเอาความเข้มข้นที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เหลือเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อครบ 9 ชั่วโมง จากตารางที่ 2.4 ผลการวัดค่า OD600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ความเข้มข้น 0 ml (conc. eq.) ของ BC5 culture หรือก็คือไม่ได้ใส่สารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture เป็นตัวพิจารณาว่าความเข้มข้นใด ที่ทำให้เชื้อ RS เหลือเป็นครึ่งหนึ่ง จากการนำค่า OD600 ทำการหารสอง ดังนี้

ที่ความเข้มข้น 0 mL (conc. eq.) ของ BC5 culture (EtOAc ext) มีค่า OD600 = 0.8425 ทำการหารสองได้เท่ากับ 0.42125 ทำการเลือกจากกราฟ



รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext)

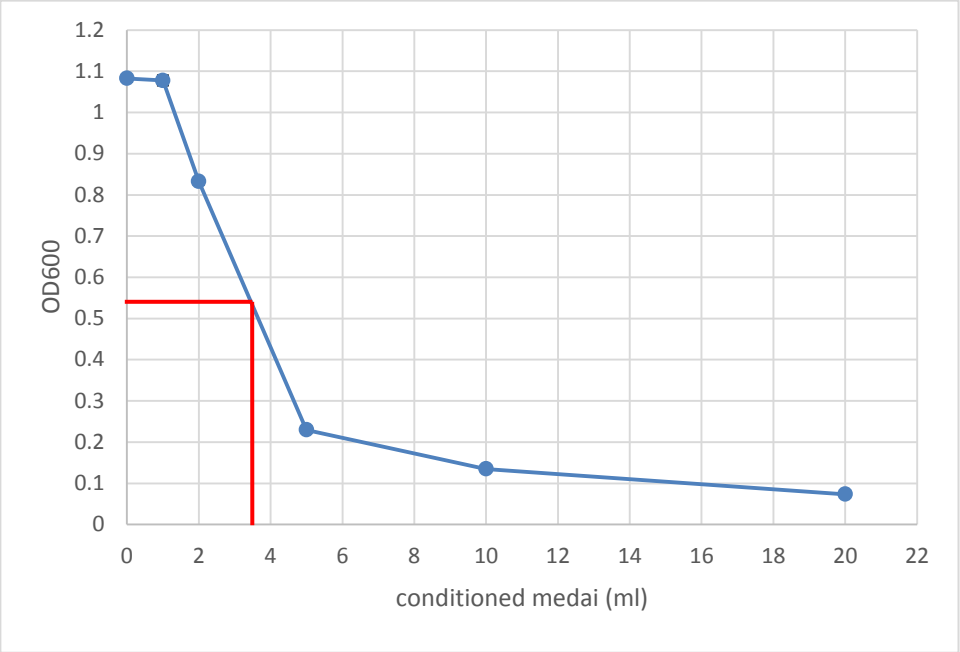
จากกราฟ OD600 ประมาณ 0.421 จะอยู่ที่ความเข้มข้นประมาณ 4 mL ของ eq. BC5 culture ดังนั้นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะไม่ทำให้เชื้อตายจนหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมง จึงควรเลือกช่วงความเข้มข้น $\pm$ 0.5 mL ตามที่ทำการเลือกจากการวิเคราะห์ OD600 ก็คือความเข้มข้น 3.5 mL, 4.0 mL และ 4.5 mL ของ eq. BC5 culture (EtOAc ext) จากตารางที่ 2.6 ที่ทำการเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) 0.035, 0.040 และ 0.045 mL คำนวณ เป็น % v/v ได้ดังนี้

- อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20.045 mL เติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) 0.035 mL คำนวณเป็น % v/v = (0.035 mL x 100)/20.045 mL = 0.175
- อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20.045 mL เติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) 0.040 mL คำนวณเป็น % v/v = (0.040 mL x 100)/20.045 mL = 0.199
- อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20.045 mL เติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) 0.040 mL คำนวณเป็น % v/v = (0.045 mL x 100)/20.045 mL = 0.224

ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้เชื้อ RS ตายจนหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมง คือ 0.175, 0.199 และ 0.224 % v/v และ เชื้อ RS ลดลงเหลือ 58, 50 และ 38 % ของการเจริญเติบโตของ RS เมื่อไม่ใส่สารสกัดที่เวลา 9 ชั่วโมง ตามลำดับ

ทำเช่นเดียวกันกับการทดลองส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (conditioned) ควรพิจารณาเลือกช่วงความเข้มข้นที่จะไม่ทำให้เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ตายจนหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมง โดยทำการพิจารณาเลือกเอาความเข้มข้นที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เหลือเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อครบ 9 ชั่วโมง จากตารางที่ 2.5 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ความเข้มข้น 0 mL มาพิจารณา

ที่ความเข้มข้น 0 mL (conditioned media) ของ BC5 culture (conditioned media) มีค่า OD600 = 1.0825 ทำการหารสองได้เท่ากับ 0.54125 ทำการเลือกจากกราฟ



รูปที่ 3.4 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) ที่ 9 ชั่วโมง

จากกราฟ OD600 ประมาณ 0.54125 จะอยู่ที่ความเข้มข้นประมาณ 3.5 mL ของ BC5 culture (conditioned media) ดังนั้นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะไม่ทำให้เชื้อตายจนหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมง จึงควรเลือกช่วงความเข้มข้น $\pm$ 0.5 mL ตามที่ทำการเลือกจากการวิเคราะห์ OD600 ก็คือ ความเข้มข้น 3.0 mL, 3.5 mL และ 4.0 mL ของ BC5 culture (conditioned media) จากตารางที่ 2.7 ที่ทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) 3.0, 3.5 และ 4.0 mL คำนวณ เป็น % v/v ได้ดังนี้

- อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 mL เติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) 3.0 mL คำนวณเป็น % v/v = (3.0 mL x 100)/20 mL = 15
- อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 mL เติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) 3.5 mL คำนวณเป็น % v/v = (3.5 mL x 100)/20 mL = 17.5
- อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 mL เติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) 4.0 mL คำนวณเป็น % v/v = (4.0 mL x 100)/20 mL = 20

ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้เชื้อ RS ตายจนหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมง คือ 15, 17.5 และ 20 %v/v และ เชื้อ RS ลดลงเหลือ 58, 50 และ 39 % ของการเจริญเติบโตของ RS เมื่อไม่ใส่สารสกัดที่เวลา 9 ชั่วโมง ตามลำดับ

การทดลองนี้สามารถบอกได้ว่าเมื่อทำการเติมสารสกัดจากแบคทีเรียจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media ที่ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สารที่ถูกปล่อยออกมาจาก BC5 สามารถที่จะทำการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย RS ได้จริง จากรูปที่ 3.3 และ 3.4 ยิ่งเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 ความเข้มข้นมากเท่าไหร่ ก็สามารถที่จะลดการเติบโตของแบคทีเรีย RS ได้ดีมากยิ่งขึ้น

3.3 การทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N = 6)

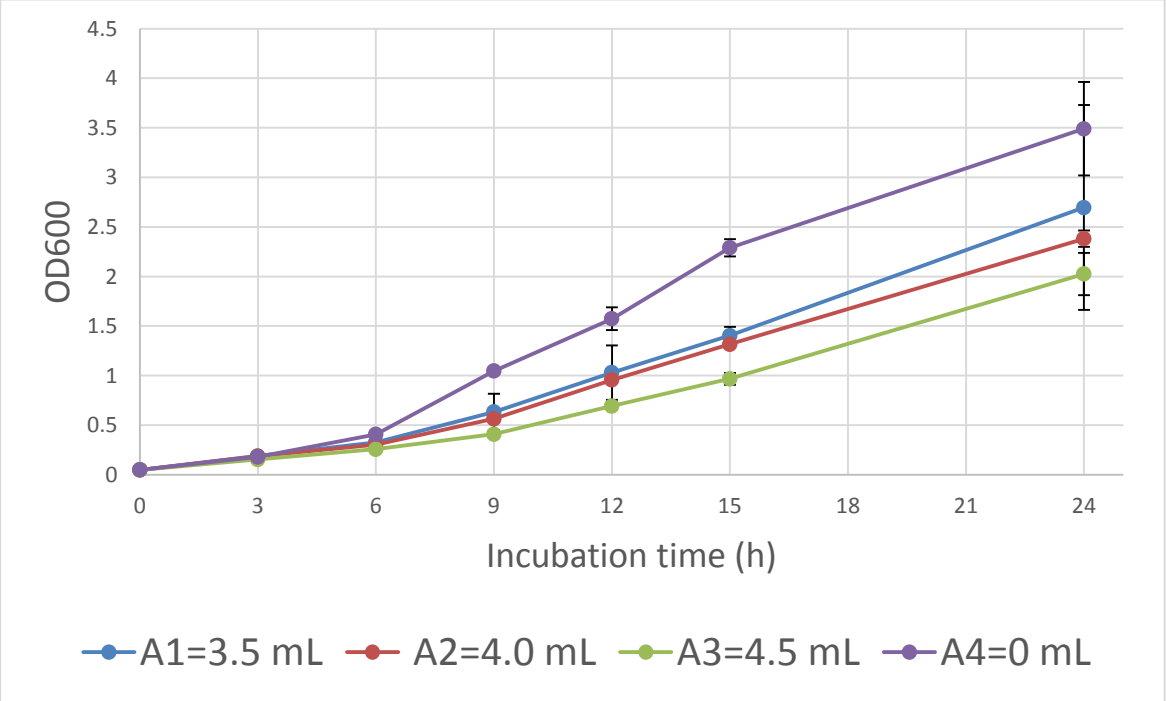
จากการทดสอบการเจริญเติบโต*ของ Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N =1) สามารถเลือกได้แล้วว่าช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ช่วงความเข้มข้น 3.5 mL ,4.0 mL และ 4.5 mL ของ eq. BC5 culture (EtOAc ext) และช่วงความเข้มข้น 3.0 mL, 3.5 mL และ 4.0 mL ของ BC5 culture (conditioned media) ซึ่งผลการทดลองและวัดค่า OD600 เป็นดังนี้

ตารางที่ 3.1 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) (N = 6)

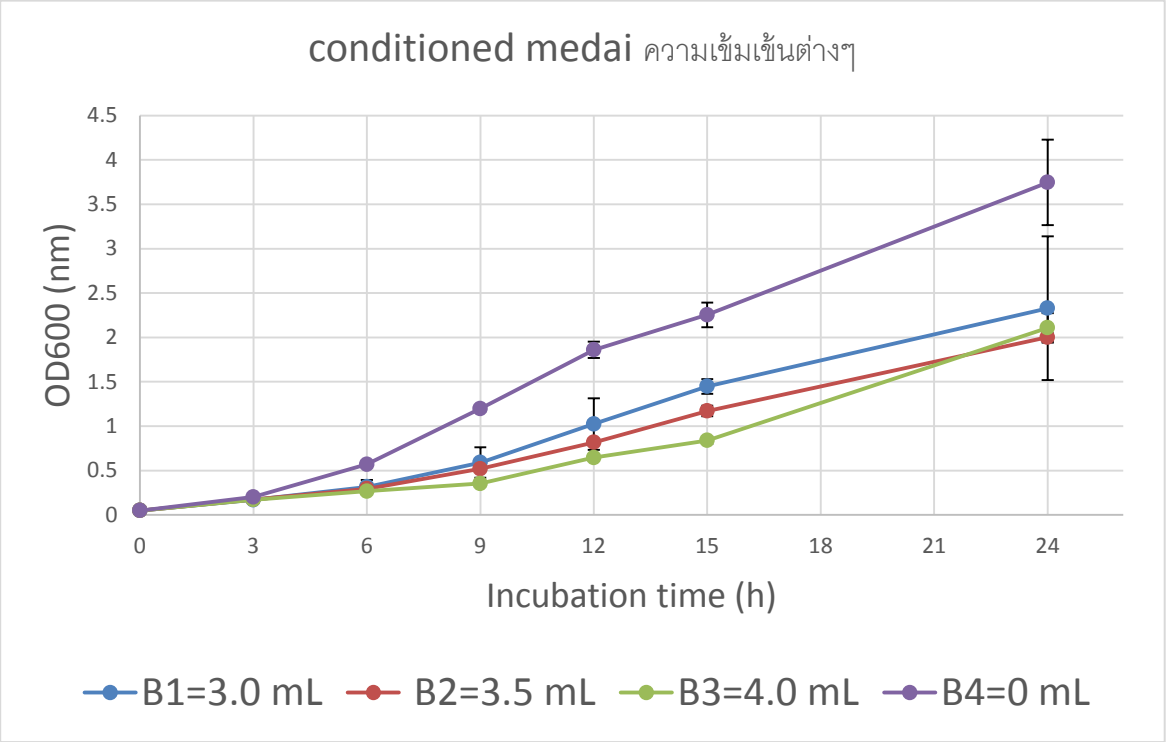
เวลา (ชั่วโมง)	OD 600			
	A1=3.5 mL	A2=4.0 mL	A3=4.5 mL	A4=0 mL
0	0.049	0.049	0.049	0.049
3	0.1895	0.1855	0.1530	0.1795
6	0.3260	0.3040	0.2570	0.4065
9	0.6325	0.5642	0.4090	1.0467
12	1.030	0.9567	0.6933	1.5733
15	1.404	1.316	0.968	2.2900
24	2.696	2.380	2.025	3.4903

ตารางที่ 3.2 ผลการวัดค่า OD 600 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) (N = 6)

เวลา (ชั่วโมง)	OD600			
	B1=3.0 mL	B2=3.5 mL	B3=4.0 mL	B4=0 mL
0	0.049	0.049	0.049	0.049
3	0.1705	0.1760	0.1710	0.2025
6	0.3155	0.2935	0.2675	0.57083333
9	0.5900	0.5192	0.3535	1.1983
12	1.025	0.8175	0.6467	1.8600
15	1.449	1.171	0.839	2.2550
24	2.328	2.002	2.108	3.7467



รูปที่ 3.5 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) (N = 6)



รูปที่ 3.6 การเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ BC5 culture (conditioned media) (N = 6)

จากผลการทดลอง เมื่อทำการเติมสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่เลือกไว้จากข้อ 3.2 สามารถที่จะบอกได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะทำการทดลองการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* แต่ไม่ทำให้เชื้อนั้นตายหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมง คือ 4.0 mL ของ BC5 culture (EtOAc ext) หรือ 0.199 % v/v และ ที่ 3.5 mL ของ BC5 (conditioned media) หรือ 17.5 % v/v ข้อมูลนี้สามารถนำไปทำการศึกษาต่อได้ โดยการเติมสารสกัดจาก BC5 ที่ความเข้มข้นเหมาะสมที่กล่าวมา เพื่อทำการหาต่อว่าสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย RS ที่ถูกปล่อยออกมาจาก BC5 คือสารอะไร และไปยับยั้งสารตัวไหนของ RS จึงส่งผลแบคทีเรีย RS ไม่เจริญเติบโต

บทที่ 4
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* และ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ LB media, CPG media และ MM media ผลคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถทำให้เชื้อทั้งสองเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ CPG media หรือ casamino acid-peptone-glucose โดยพิจารณาจากกราฟการเจริญเติบโต (รูปที่ 3.1 และรูปที่ 3.2) ของแบคทีเรียเทียบกับแต่ละ media พบว่ากราฟของ CPG media มีความชันมาก และเห็นระยะแต่ละระยะการเติบโตได้ชัด ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งผลนี้ทำให้ผู้ทำการทดลองไม่ต้องรอให้เชื้อเจริญเติบโตเป็นเวลานาน ประหยัดเวลาในการทดลองได้มาก

การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ตายจนหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมง จากการเติมสารสกัดที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 โดยการทำการทดลอง เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* แล้วเติมสารสกัด BC5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละขวด เป็นเวลา 9 ชั่วโมง จากกราฟ (รูปที่ 3.3 และรูปที่ 3.4) ได้ทำการเลือกความเข้มข้น จากการพิจารณาจากค่า OD600 ที่ความเข้มข้น 0 mL หารสองค่า OD600 เพราะว่าค่าความเข้มข้นช่วงนั้นจะทำให้เชื้อ RS เหลือเป็นครึ่งหนึ่ง เมื่อครบ 9 ชั่วโมง และความเข้มข้นช่วงนั้นจะไม่ทำให้เชื้อ RS ตายจนหมดก่อนครบ 24 ชั่วโมงแน่นอน พบว่าผลจากสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) ที่ความเข้มข้น 0.175, 0.199 และ 0.224 % (v/v) ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* ลดลงเหลือ 58, 50 และ 38 % ของการเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* เมื่อไม่ใส่สารสกัดที่เวลา 9 ชั่วโมง ตามลำดับ และมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (conditioned media) ที่ความเข้มข้น 15, 17.5 และ 20 % (v/v) ทำให้การเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* ลดลงเหลือ 58, 50 และ 39 % ของการเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* เมื่อไม่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 ที่เวลา 9 ชั่วโมง การทดลองนี้ยังบอกได้ว่าเมื่อทำการเติมสารสกัดที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 สามารถที่จะทำการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้จริง สามารถที่จะนำ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ทำเป็น biocontrol ในการควบคุมโรคเหี่ยวในพืชได้

การทดลองการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) และการทดลองเมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (conditioned media) เพื่อสร้างกราฟการเจริญเติบโต โดยทำการทดลอง 24 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นตามที่เลือกจากข้อ 3.2 สามารถที่จะบอกได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะทำการทดลองการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* แต่ไม่ทำให้เชื้อนั้นตายหมดก่อนครบ 24 โมง ซึ่งความเข้มนั้น คือ หรือ 0.199 % v/v BC5 culture (EtOAc ext) และ 17.5 % v/v BC5 (conditioned media) สามารถนำไปทำการทดลองต่อเพื่อหาสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่ถูกปล่อยออกมาจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 และไปยับยั้งสารตัวไหนของ *Ralstonia- solanacearum* จึงส่งผลให้เชื้อไม่เจริญเติบโต

4.2 ข้อเสนอแนะ

1. การเจือจางสารเพื่อทำการวัดค่า OD600 ถ้าเป็นการเจือจาง 5 เท่า หรือ 10 เท่า ค่า OD600 ต้องไม่น้อยกว่า 0.1 และไม่เกิน 0.3 เพื่อความแม่นยำของค่าที่ได้สารตัวอย่างจริงๆ
2. เมื่อทำการ autoclave media ปริมาตรของ media ลดลง ดังนั้นจึงควรทำการเตรียม media เผื่อไว้ด้วย
3. การทดลองเพื่อไม่ให้ผิดพลาด ควรวางแผนการทดลองให้ดีๆ โดยการเขียน Flowchart ให้ละเอียด เพราะถ้าผิดพลาดแล้วจะเสียเวลาเป็นอย่างมากในการมาทำใหม่ เพราะการทดลองแต่ละครั้งใช้เวลานาน

เอกสารอ้างอิง

[1] On-Uma Ruangwong, Benjawan Jaijanthra. Using of Soil Actinomycetes to Inhibit Ralstonia solanacearum Causal Agent of Tomato Wilt Disease for Journal of Agriculture 2560 , ISSN 0857-0841, 49-59

[2] Saithong Kaewchai, Ph.D. Application of Trichoderma spp. for Plant Disease Control for Princess of Naradhiwas University Journal of year 4 Issue 3 September - December 2012 , 108-123

[3] Karim, Z. and M. S. Hossain. MANAGEMENT OF BACTERIAL WILT (Ralstonia solanacearum) OF POTATO: FOCUS ON NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS for Journal of Biodiversity Conservation and Bioresource Management 4(1):73 August 2018 , DOI: 10.3329/jbcbm.v4i1.37879

[4] Muhammad Fazle Rabbee, Md. Sarafat Ali, Jinhee Choi, Buyng Su Hwang, Sang Chul Jeong, and Kwang-hyun Baek. Bacillus velezensis: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes for NCBI, 2019 Mar, Article number PMC6470737

[5] Yu Cao, Hualiang Pi, Pete Chandrangsu, Yong Li, Yuqi Wang, Han Zhou, Hanqi Xiong, John Helmann & Yanfei Cai. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting Bacillus velezensis Isolates Against Ralstonia solanacearum and Fusarium oxysporum for Scientific Repots, 2018 , Article number: 4360 (2018)

[6] ปริยสภรณ์ โก่งศร, การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการป้องกันกำจัด โรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของขิง, ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, พ.ศ.2543

[7] พรพรรณ อู่สุวรรณ, การใช้ *Bacillus spp*. และ Streptomyces spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น,สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, พ.ศ. 2550

[8] Mongkolthanaruk, Wiyada, of Classification of *Bacillus spp* Beneficail Substances Related to Plants, Humans and Animals. Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University. Journal of Microbiology and Biotechnology .(2012), 22(12),1597-1604, October 4, 2012 pISSN 1017-7825 eISSN 1738-8872

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมสารจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5

1.1 คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของ *Ralstonia solanacearum* เมื่อเติมสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture (EtOAc ext) (จากรูปที่ 3.3) เทียบกับที่ความเข้มข้น 0 mL (conc. eq.) ของ BC5 culture (EtOAc ext) มีค่า OD600 = 0.8425

At 3.5 mL (conc. eq.) ของ BC5 culture (EtOAc ext) ได้ค่า OD600 = 0.49

การลดลงของ RS = (0.49 x 100) / 0.8425 = 58 %

At 4.0 mL (conc. eq.) ของ BC5 culture (EtOAc ext) ได้ค่า OD600 = 0.42125

การลดลงของ RS = (0.42125 x 100) / 0.8425 = 50 %

At 4.5 mL (conc. eq.) ของ BC5 culture (EtOAc ext) ได้ค่า OD600 = 0.32

การลดลงของ RS = (0.32 x 100) / 0.8425 = 38 %

1.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของ Ralstonia solanacearum เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5(conditioned media) (จากรูปที่ 3.4) เทียบกับที่ความเข้มข้น 0 mL ของ BC5 culture (conditioned media) มีค่า OD600 = 1.0825

At 3.0 mL (conc. eq.) ของ BC5 culture (conditioned media) ได้ค่า OD600 = 0.63

การลดลงของ RS = (0.63 x 100) / 1.0825 = 58 %

At 3.5 mL (conc. eq.) ของ BC5 culture (conditioned media) ได้ค่า OD600 = 0.54125

การลดลงของ RS = (0.54125 x 100) / 1.0825 = 50 %

At 4.0 mL (conc. eq.) ของ BC5 culture (conditioned media) ได้ค่า OD600 = 0.43

การลดลงของ RS = (0.43 x 100) / 1.0825 = 39 %

ภาคผนวก ข

1. ตารางผลการทดลอง

1.1 ตารางวัดค่า OD600 ของการทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* และ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

ตารางที่ 6.1 ค่า OD600 ของ *Ralstonia solanacearum* ใน MM media

RS (MM)	1			2			3			RS(OD)
Time (h)	rep1	rep2	Aver	rep1	rep2	Aver	Rep1	Rep2	Aver	Aver.
0 (dilute x3)/50	0.00438	0.00456	0.0045							0.0045
3 (dilute x3)	0.006	0.018	0.012	0.012	0.027	0.0195	0.015	0.003	0.009	0.014
6 (dilute x3)	0.012	0.012	0.012	0.015	0.012	0.0135	0.021	0.009	0.015	0.014
9 (dilute x3)	0.018	0.015	0.0165	0.021	0.03	0.0255	0.036	0.021	0.0285	0.024
12 (dilute x3)	0.051	0.048	0.0495	0.078	0.069	0.0735	0.042	0.051	0.0465	0.057
24 (dilute x3)	0.324	0.321	0.3225	0.366	0.384	0.375	0.612	0.609	0.6105	0.436

ตารางที่ 6.2 ค่า OD600 ของ *Ralstonia solanacearum* ใน CPG media

RS (CPG)	1			2			3			RS(OD)
Time (h)	rep1	rep2	Aver	rep1	rep2	Aver	Rep1	Rep2	Aver	Aver.
0 (dilute x10)	0.0496	0.045	0.0473							0.0473
3 (dilute x3)	0.231	0.222	0.2265	0.192	0.195	0.1935	0.183	0.201	0.192	0.204
6 (dilute x5)	0.725	0.725	0.725	0.49	0.62	0.555	1.365	1.025	1.195	0.825
9 (dilute x10)	1.25	1.15	1.2	1.19	1.75	1.47	1.06	0.92	0.99	1.220
12 (dilute x10)	1.81	1.89	1.85	2.33	2.29	2.31	1.75	1.5	1.625	1.928
24 (dilute x10)	2.76	2.87	2.815	2.36	2.43	2.395	2.09	2.16	2.125	2.445

ตารางที่ 6.3 ค่า OD600 ของ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ใน MM media

BC5 (MM)	1			2			3			BC5(OD)
Time (h)	rep1	rep2	Aver	rep1	rep2	Aver	Rep1	Rep2	Aver	Aver.
0 (dilute x3)	0.009	0.00054	0.00477							0.00477
3 (dilute x3)	0	0.018	0.009	0.099	0.099	0.099	0.042	0.027	0.0345	0.048
6 (dilute x3)	0.009	0.003	0.006	0.021	0.042	0.0315	0.003	0.03	0.0165	0.018
9 (dilute x3)	0.003	0.021	0.012	0.003	0.006	0.0045	0.015	0.009	0.012	0.010
12 (dilute x3)	0.006	0.009	0.0075	0.024	0.021	0.0225	0.027	0.03	0.0285	0.020
24 (dilute x3)	0.306	0.333	0.3195	0.345	0.324	0.3345	0.432	0.42	0.426	0.360

ตารางที่ 6.4 ค่า OD600 ของ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ใน CPG media

BC5 (CPG)	1			2			3			BC5(OD)
Time (h)	rep1	rep2	Aver	rep1	rep2	Aver	Rep1	Rep2	Aver	Aver.
0	0.0222	0.0222	0.0222							0.0222
3	0.255	0.24	0.2475	0.267	0.258	0.2625	0.279	0.285	0.282	0.264
6	0.865	0.865	0.865	0.92	0.92	0.92	0.975	0.985	0.98	0.922
9	1.14	1.18	1.16	1.32	1.41	1.365	1.15	1.07	1.11	1.212
12	1.37	1.33	1.35	1.37	1.43	1.4	1.12	1.09	1.105	1.285
15	1.38	1.44	1.41	1.75	1.8	1.775	1.18	1.22	1.2	1.462
24	1.03	1	1.015	0.9	0.88	0.89	0.71	0.675	0.6925	0.866

ตารางที่ 6.5 ค่า OD600 ของ *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ใน LB media

BC5 (LB)	1			2			3			BC5(OD)
Time (h)	rep1	rep2	Aver	rep1	rep2	Aver	Rep1	Rep2	Aver	Aver.
0 (dilute x10)	0.0212	0.0222	0.0217							0.0217
3 (dilute x3)	0.291	0.237	0.264	0.294	0.297	0.2955	0.207	0.183	0.195	0.252
6 (dilute x5)	0.655	0.675	0.665	0.715	0.725	0.72	0.975	0.665	0.82	0.735
9 (dilute x10)	0.64	0.73	0.685	0.69	0.78	0.735	0.69	0.65	0.67	0.697
12 (dilute x10)	0.8	0.81	0.805	1.01	0.8	0.905	1.21	1.03	1.12	0.943
24 (dilute x10)	1.63	1.69	1.66	1.36	1.38	1.37	1.39	1.4	1.395	1.475

1.2 ตารางวัดค่า OD600 ของการการทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N = 6)

ตารางที่ 6.6 ค่า OD600 ของ *Ralstonia solanacearum* ในสารสกัดของอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 culture

EtoAC ext								
sample		0h	3h	6h	9h	12h	15h	24h
RS_O/N culture	วัดครั้งที่1	0.0492	-	-	-	-	-	-
	วัดครั้งที่2	0.0488	-	-	-	-	-	-
	เฉลี่ย	0.049	-	-	-	-	-	-
A1 (1)	วัดครั้งที่1	-	0.1980	0.3360	0.6350	1.115	1.561	3.42
	วัดครั้งที่2	-	0.1920	0.3300	0.5900	1.12	1.596	3.348
	เฉลี่ย	-	0.1950	0.3330	0.6125	1.1175	1.5785	3.3840
A1 (2)	วัดครั้งที่1	-	0.1680	0.3270	0.6100	0.975	1.295	2.44
	วัดครั้งที่2	-	0.1800	0.3270	0.6350	0.945	1.274	2.41
	เฉลี่ย	-	0.1740	0.3270	0.6225	0.9600	1.2845	2.4250
A1 (3)	วัดครั้งที่1	-	0.2040	0.3060	0.6750	1.015	1.33	2.31
	วัดครั้งที่2	-	0.1950	0.3300	0.6500	1.01	1.365	2.25
	เฉลี่ย	-	0.1995	0.3180	0.6625	1.0125	1.3475	2.2800
A2 (1)	วัดครั้งที่1	-	0.1710	0.3300	0.6300	0.93	1.375	2.51
	วัดครั้งที่2	-	0.1890	0.3120	0.5900	0.97	1.38	2.57
	เฉลี่ย	-	0.1800	0.3210	0.6100	0.9500	1.3775	2.5400
A2 (2)	วัดครั้งที่1	-	0.1920	0.3000	0.5250	0.97	1.29	2.32
	วัดครั้งที่2	-	0.1800	0.2790	0.5150	0.99	1.28	2.35
	เฉลี่ย	-	0.1860	0.2895	0.5200	0.9800	1.2850	2.3350
A2 (3)	วัดครั้งที่1	-	0.1980	0.3060	0.5650	0.92	1.27	2.25
	วัดครั้งที่2	-	0.1830	0.2970	0.5600	0.96	1.3	2.28
	เฉลี่ย	-	0.1905	0.3015	0.5625	0.9400	1.2850	2.2650
A3 (1)	วัดครั้งที่1	-	0.1500	0.2580	0.3780	0.645	0.885	1.918
	วัดครั้งที่2	-	0.1530	0.2460	0.4020	0.665	0.88	1.96
	เฉลี่ย	-	0.1515	0.2520	0.3900	0.6550	0.8825	1.9390
A3 (2)	วัดครั้งที่1	-	0.1590	0.2670	0.3930	0.665	0.915	1.701
	วัดครั้งที่2	-	0.1590	0.2520	0.3930	0.645	0.96	1.708
	เฉลี่ย	-	0.1590	0.2595	0.3930	0.6550	0.9375	1.7045
A3 (3)	วัดครั้งที่1	-	0.1380	0.2700	0.4380	0.77	1.065	2.45
	วัดครั้งที่2	-	0.1590	0.2490	0.4500	0.77	1.1	2.41
	เฉลี่ย	-	0.1485	0.2595	0.4440	0.7700	1.0825	2.4300
A4 (1)	วัดครั้งที่1	-	0.1740	0.3810	1.0800	1.4	2.16	2.532
	วัดครั้งที่2	-	0.1800	0.3870	1.1200	1.33	2.1	2.604
	เฉลี่ย	-	0.1770	0.3840	1.1000	1.3650	2.1300	2.5680
A4 (2)	วัดครั้งที่1	-	0.1710	0.4110	1.0000	1.58	2.28	3.792
	วัดครั้งที่2	-	0.1770	0.3960	1.0800	1.61	2.34	3.768
	เฉลี่ย	-	0.1740	0.4035	1.0400	1.5950	2.3100	3.7800
A4 (3)	วัดครั้งที่1	-	0.1950	0.4440	1.0000	1.78	2.43	4.158
	วัดครั้งที่2	-	0.1800	0.4200	1.0000	1.74	2.43	4.088
	เฉลี่ย	-	0.1875	0.4320	1.0000	1.7600	2.4300	4.1230

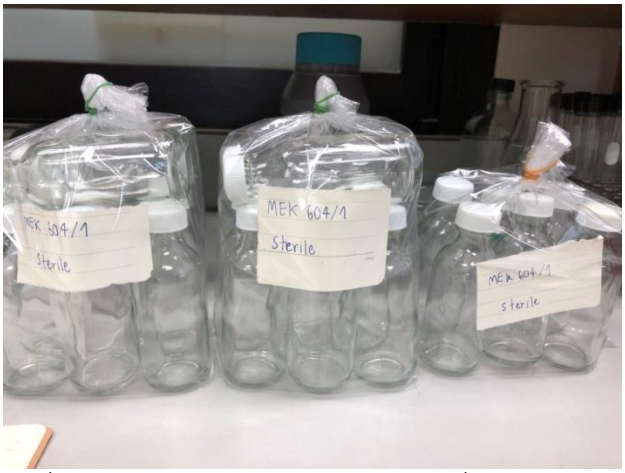
ตารางที่ 6.7 ค่า OD600 ของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BC5 (conditioned media)

conditioned medai								
sample		0h	3h	6h	9h	12h	15h	24h
RS_O/N culture	วัดครั้งที่1	0.0492	-	-	-	-	-	-
	วัดครั้งที่2	0.0488	-	-	-	-	-	-
	เฉลี่ย	0.049	-	-	-	-	-	-
B1 (1)	วัดครั้งที่1	-	0.1800	0.3150	0.6300	0.95	1.395	2.21
	วัดครั้งที่2	-	0.1770	0.3150	0.6100	0.975	1.404	2.24
	เฉลี่ย	-	0.1785	0.3150	0.6200	0.9625	1.3995	2.2250
B1 (2)	วัดครั้งที่1	-	0.1680	0.3120	0.5750	1.135	1.629	2.78
	วัดครั้งที่2	-	0.1800	0.3270	0.6000	1.13	1.593	2.72
	เฉลี่ย	-	0.1740	0.3195	0.5875	1.1325	1.6110	2.7500
B1 (3)	วัดครั้งที่1	-	0.1590	0.3120	0.5500	0.96	1.341	2.03
	วัดครั้งที่2	-	0.1590	0.3120	0.5750	1	1.332	1.99
	เฉลี่ย	-	0.1590	0.3120	0.5625	0.9800	1.3365	2.0100
B2 (1)	วัดครั้งที่1	-	0.1770	0.3030	0.5050	0.745	1.055	1.88
	วัดครั้งที่2	-	0.1770	0.2880	0.5100	0.785	1.06	1.94
	เฉลี่ย	-	0.1770	0.2955	0.5075	0.7650	1.0575	1.9100
B2 (2)	วัดครั้งที่1	-	0.1800	0.3030	0.5000	0.825	1.265	2.02
	วัดครั้งที่2	-	0.1890	0.3060	0.5450	0.835	1.245	2.1
	เฉลี่ย	-	0.1845	0.3045	0.5225	0.8300	1.2550	2.0600
B2 (3)	วัดครั้งที่1	-	0.1680	0.2790	0.5050	0.87	1.21	1.99
	วัดครั้งที่2	-	0.1650	0.2820	0.5500	0.845	1.19	2.08
	เฉลี่ย	-	0.1665	0.2805	0.5275	0.8575	1.2000	2.0350
B3 (1)	วัดครั้งที่1	-	0.1590	0.2850	0.3660	0.6	0.8	2.26
	วัดครั้งที่2	-	0.1680	0.2880	0.3450	0.615	0.81	2.22
	เฉลี่ย	-	0.1635	0.2865	0.3555	0.6075	0.8050	2.2400
B3 (2)	วัดครั้งที่1	-	0.1890	0.2610	0.3540	0.65	0.8	1.74
	วัดครั้งที่2	-	0.1860	0.2640	0.3600	0.615	0.78	1.82
	เฉลี่ย	-	0.1875	0.2625	0.3570	0.6325	0.7900	1.7800
B3 (3)	วัดครั้งที่1	-	0.1650	0.2490	0.3510	0.69	0.94	2.28
	วัดครั้งที่2	-	0.1590	0.2580	0.3450	0.71	0.905	2.33
	เฉลี่ย	-	0.1620	0.2535	0.3480	0.7000	0.9225	2.3050
B4 (1)	วัดครั้งที่1	-	0.2250	0.5050	1.2200	1.73	2	2.816
	วัดครั้งที่2	-	0.2070	0.5350	1.1500	1.69	1.97	2.784
	เฉลี่ย	-	0.2160	0.5200	1.1850	1.7100	1.9850	2.8000
B4 (2)	วัดครั้งที่1	-	0.2100	0.6000	1.2900	1.86	2.36	4.352
	วัดครั้งที่2	-	0.1980	0.6150	1.2300	1.83	2.31	4.4
	เฉลี่ย	-	0.2040	0.6075	1.2600	1.8450	2.3350	4.3760
B4 (3)	วัดครั้งที่1	-	0.1800	0.6000	1.1500	2.05	2.42	4
	วัดครั้งที่2	-	0.1950	0.5700	1.1500	2	2.47	4.128
	เฉลี่ย	-	0.1875	0.5850	1.1500	2.0250	2.4450	4.0640

ภาคผนวก ค

1. ภาพการทดลอง

1.1 เตรียมขวด autoclave และ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

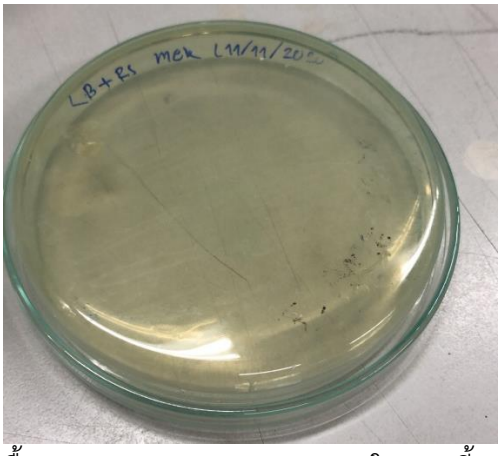


รูปที่ 6.1 ขวดขนาด 60 ml เตรียมใส่ถุงเพื่อ autoclave

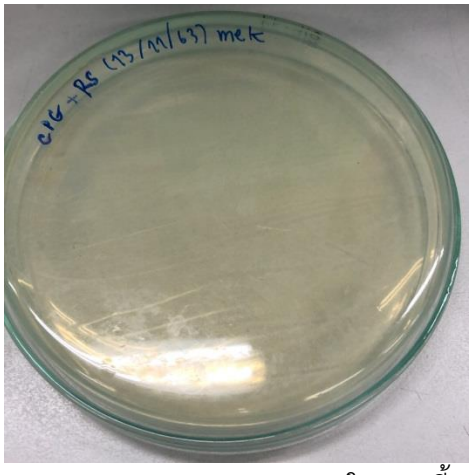
รูปที่ 6.2 สารเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CPG media

รูปที่ 6.3 เตรียมทำการนำ media ใส่ขวด 60 ml

1.2 ขีดเชื้อลง plate อาหารเลี้ยงเชื้อ

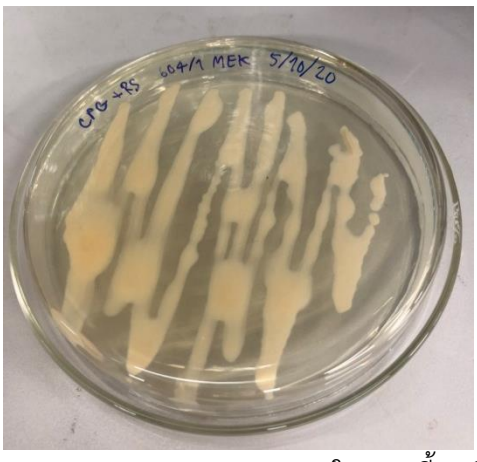


รูปที่ 6.4 ขีดเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในจานเลี้ยงเชื้อ LB agar



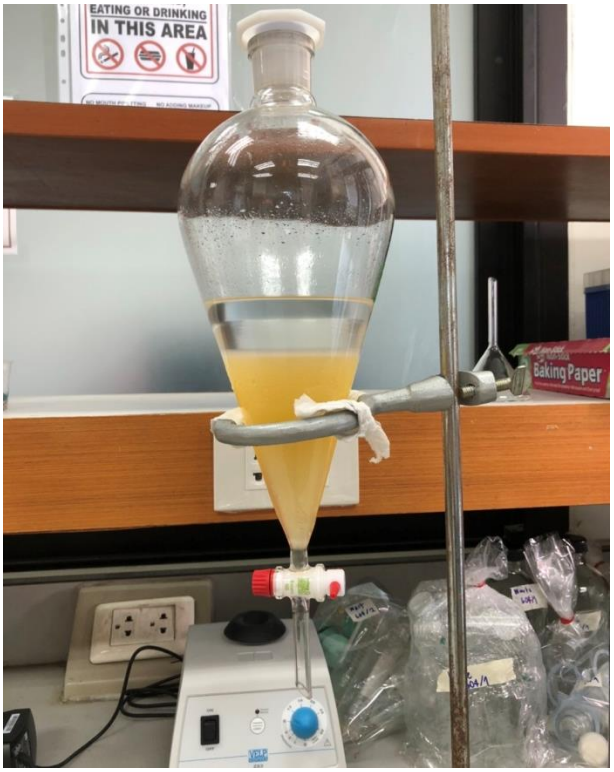
รูปที่ 6.5 ขีดเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในจานเลี้ยงเชื้อ CPG agar

1.3 เชื้อหลังจากการบ่มในตู้ 30 องศา



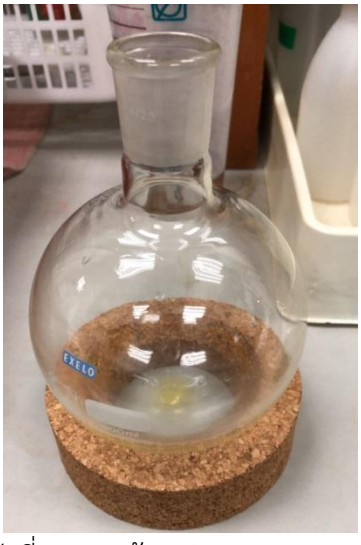
รูปที่ 6.6 เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในจานเลี้ยงเชื้อ CPG agar

1.4. สกัดสารจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ด้วย EtOAc



รูปที่ 6.7 สกัดสารจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ BC5 ด้วย EtOAc

รูปที่ 6.8 ระเหยแห้งสารสกัดด้วย เครื่อง Rotary evaporator



รูปที่ 6.9 สารสกัดที่ระเหยแห้งจาก Rotaryevaporator เสร็จแล้ว

รูปที่ 6.10 ไล่ความชื้นจากสารสกัด Gas Dry

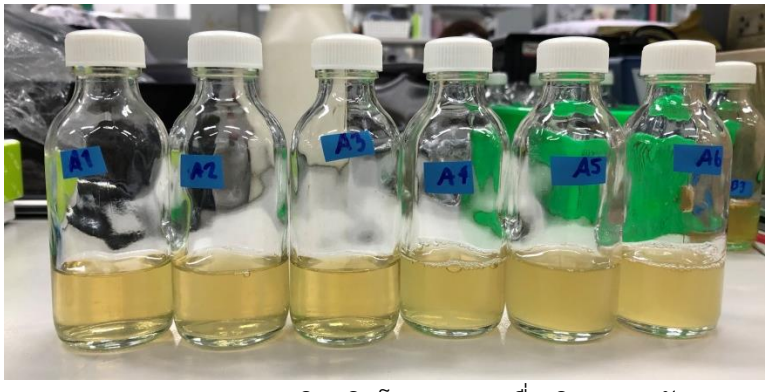
รูปที่ 6.11 นำสารสกัด ทำ high vacuum เพื่อให้สารแข็งตัว

รูปที่ 6.12 สารสกัด BC5 culture (EtOAc ext)

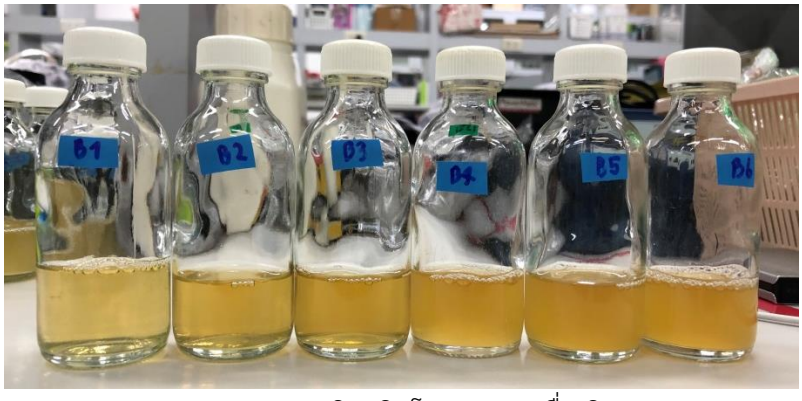
1.5 ละลายสารสกัดจาก *Bacillus spp*. สายพันธุ์ BC5 ด้วย DMSO

รูปที่ 6.13 ละลายสารสกัด BC5 culture (EtOAc ext) ด้วย DMSO

1.6 ผลการทดลองการทดสอบการเจริญเติบโตของ *Ralstonia solanacearum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ผลิตจาก Bacillus spp. สายพันธุ์ BC5 ความเข้มข้นต่างๆ (N =1)



รูปที่ 6.14 ผลการทดลองจากการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติม สารสกัดจาก BC5 culture (EtOAc ext) ที่ 9 ชั่วโมง



รูปที่ 6.15 ผลการทดลองการทดสอบการเจริญเติบโตของ RS เมื่อเติม BC5 (conditioned media) ที่ 9 ชั่วโมง

ประวัติผู้วิจัย

นายวิทยา โสมณวัตร์ เกิดเมื่อวันที่ 15 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเสลูมิพิทยาม จังหวัดร้อยเอ็ด เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 65 ตำบลกลาง อำเภอเสลูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด รหัสไปรษณีย์ 45120 อีเมล wittayasomanawat@gmail.com