บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ประกอบด้วยวัสดุ อุปกรณ์เครื่อง และขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

เชื้อราสาเหตุโรคพืช

เชื้อราก่อโรคพืชที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้แก่ *Pyricularia* sp. สาเหตุโรคไหม้ของข้าว, *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริก, *Alternaria* sp. สาเหตุโรคเมล็ดด่างในข้าว และ *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเร่งตายในถั่วเหลือง

เชื้อแอคติโนมัยซีท

เชื้อแอคติโนมัยซีทบริสุทธิ์ที่แยกได้จากดินในงานวิจัยของ อรนภา ณรงค์ศรี (2559) เก็บ ในสารละลาย 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -20°C

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Broth (PDB) ยี่ห้อ Himedia
2. Potato Dextrose Agar (PDA) ยี่ห้อ Himedia
3. International Streptomyces Project (ISP-2)

สารเคมี

1. Silver nitrate ($AgNO_3$)
2. Hydrochloric acid (HCl)
3. Sodium hydroxide (NaOH)
4. Glucose ($C_6H_{12}O_6$)
5. Yeast extract
6. Malt extract

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดการวัดการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมทรี (UV-Vis spectrophotometer ชนิด double beam)
2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM)
3. เครื่องเอ็กซเรยสเปคโตรสโคปแบบกระจายพลังงาน (Energy-Dispersive X-ray, EDX)
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

6. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
7. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
8. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Analytical balance)
9. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow clean bench)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
11. เตาให้ความร้อน (Hot plate)
12. เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH Meter)
13. เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating needle)
14. ที่เจาะหลุม (Cork borer)
15. คีมคีบ (Forcep)
16. อะลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminium foil)
17. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Filter paper Whatman No.1)
18. ถาดพลาสติก (Plastic tray)
19. กระถางพลาสติก (Plastic pot)
20. ถุงพลาสติก (Plastic bag)

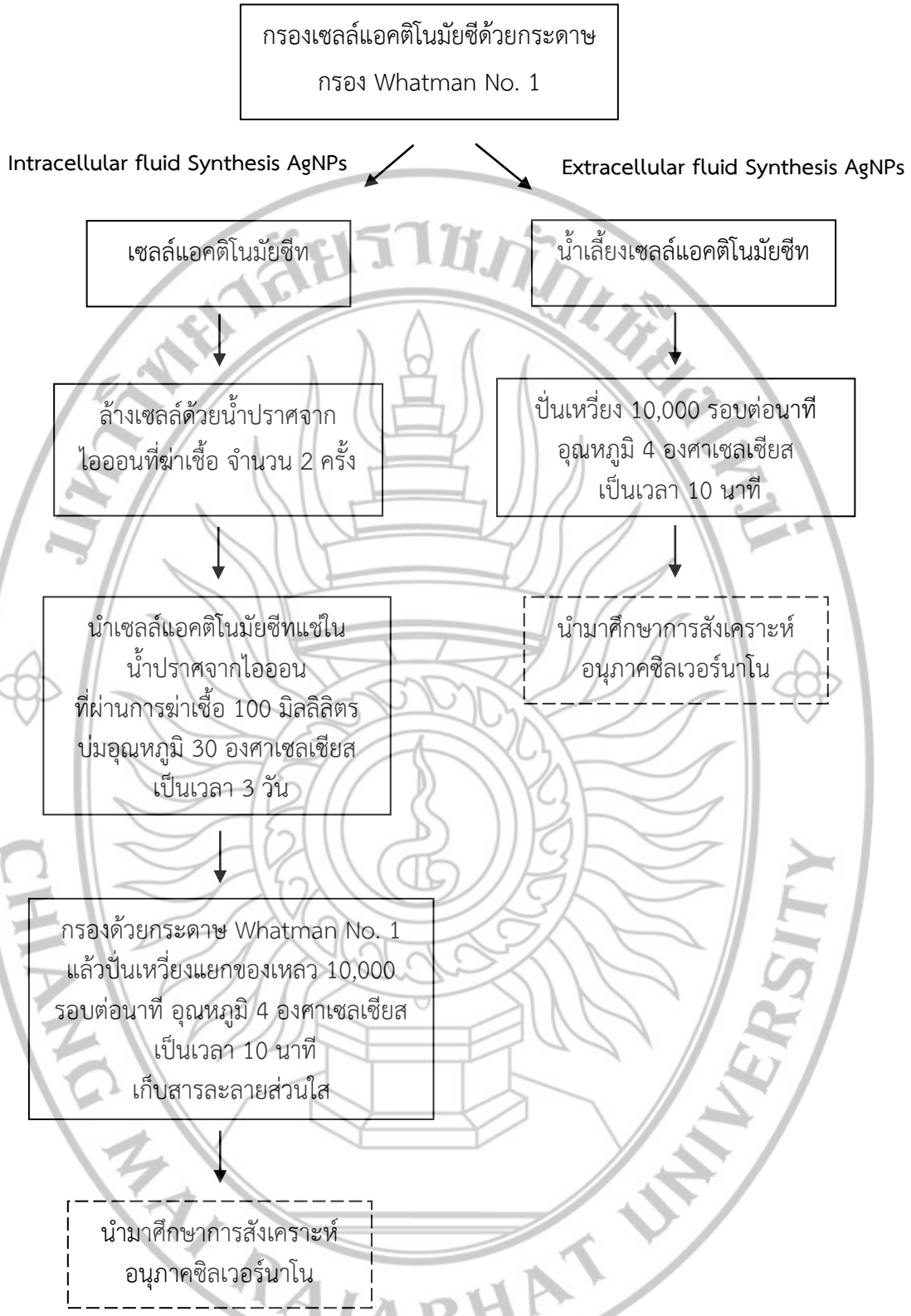
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเมทาโบไลท์ชักนำให้เกิดสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยสารละลาย $AgNO_3$ โดยดัดแปลงวิธีการของ Gupta et al. (2017)

1.1 นำแอคติโนมัยซีทที่เก็บรักษาเซลล์ในสารละลาย 20% glycerol อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 (yeast extract 4 กรัม, malt extract 10 กรัม, glucose 4 กรัม, agar 15 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร, pH 6.8) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

1.2 นำแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ISP2 ไปเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 (yeast extract 4 กรัม, malt extract 10 กรัม, glucose 4 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร, pH 6.8) ที่อยู่ใน ฟลาสก์ 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน แยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ตามขั้นตอนในภาพที่ 3.1

1.3 สังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์อนุภาคนาโน (AgNPs) โดยนำสารละลาย intracellular fluid และ intracellular fluid ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย 1 mM $AgNO_3$ 20 มิลลิลิตร แล้วบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีเหลือง (yellowish color) ถึง สีเหลืองน้ำตาล (yellowish-brown color) ซึ่งแสดงว่ามีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนของสารละลายจากแอคติโนมัยซีท โดยถ้าเปลี่ยนปีสีเข้มมาก แสดงถึงความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้มาก จากนั้นรายงานผลการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนในสารละลาย บันทึกและรายงานผลการทดลอง โดยไม่มีการเปลี่ยนสีให้อ่านผลเป็นลบ (-) เปลี่ยนเป็นสีเหลืองให้อ่านผลเป็นบวกหนึ่ง (+1) และ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาลให้อ่านผลเป็นบวกสอง (+2)

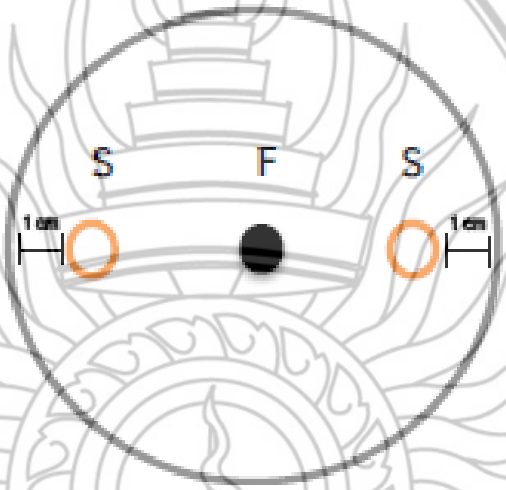


ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายจากเซลล์แอคติโนมัยซีทเพื่อทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs)

2. การศึกษาความสามารถการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชของอนุภาคซิลเวอร์นาโน

2.1 เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alternaria* sp. *Collectotrichum* sp. *Fusarium* sp. และ *Pyricularia* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อราเริ่มต้นในการทดสอบ

2.2 ทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยวิธี well diffusion test (ภาพที่ 3.2) ใช้อุปกรณ์ cock borer ที่ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะหลุมที่อาหารแข็ง PDA โดยให้ห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.0 เซนติเมตร จำนวน 2 จุด (ตำแหน่ง S) แล้วใช้อุปกรณ์ cock borer ที่ปราศจากเชื้อ เจาะบริเวณขอบโคโลนีนอกสุดของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่อายุ 7 วัน แล้วใช้เข็มเขี่ยที่ปราศจากเชื้อนำชิ้นวุ้นเชื้อรามาวางที่หน้าอาหารแข็ง PDA บริเวณจุดกึ่งกลางตำแหน่ง F



ภาพที่ 3.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยวิธี well diffusion test

2.3 ปิเปตตัวอย่างของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะทั้งสองหลุม นำไปบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เทียบกับการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนอาหารแข็ง PDA ที่ไม่มีอนุภาคซิลเวอร์นาโนซึ่งเป็นชุดควบคุมที่เป็น

2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น สังเกตการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้วติดตามการเจริญของเชื้อราโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA ของชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ตามสมการด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(\text{ขนาดโคโลนีชุดทดสอบ-ขนาดโคโลนีชุดควบคุม})}{\text{ขนาดโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

2.6 นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไปจัดระดับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชตามเกณฑ์ของ Phanjom and Ahmed (2017) ดังนี้

76-100% = ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
51-75% = ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
26-50% = ประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
1-25% = ประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

3. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์แอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกและความเข้มข้นสารละลาย $AgNO_3$ ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนและการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช

3.1 การศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

3.1.1 นำแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP2 ไปเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ที่อยู่ใน ฟลาสก์ 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 10 และ 15 วัน

3.1.2 กรองแยกเซลล์ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บรวบรวมสารละลายส่วนใสไปสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs)

3.1.3 นำสารละลายส่วนใสปริมาณ 50 มิลลิลิตร ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 1mM และ 5mM ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยชุดการทดลองที่มีอาหารเหลว YM ผสมสารละลาย $AgNO_3$ เป็นชุดควบคุม โดยสังเกตการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์ นาโนจากการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองน้ำตาล (yellowish-brown color

3.1.4 นำตัวอย่างของมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) จำนวน 2 ครั้ง เพื่อกำจัดสารลาย $AgNO_3$ ส่วนเกินทิ้ง โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกระจายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในน้ำ deionized water ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช และทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ

3.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชบนอาหารแข็ง

3.2.1 นำอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์จากแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alternaria* sp. *Collectotrichum* sp. *Fusarium* sp. และ *Pyricularia* sp. โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อราเริ่มต้นในการทดสอบ

3.2.2 นำตัวอย่างสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง PDA ด้วยแท่งแก้ว spreader ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งเป็นเวลา 15 นาที

3.2.3 ใช้อุปกรณ์ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่มีอายุครบ 7 วัน มาวางบริเวณจุดกึ่งกลางบนหน้าอาหารแข็ง PDA ที่มีสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน นำไปบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยทำ

การทดสอบ 3 ซ้ำ เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์ นาโนของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์

3.2.4 สังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้ววัดการเจริญของเชื้อราโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA ของชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition)

4. ศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโน

นำตัวอย่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้มาศึกษาคุณลักษณะดังต่อไปนี้

4.1 การดูดกลืนแสงยูวี (UV-Visible spectroscopy)

นำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไปวัดค่าดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 200-600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer เพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุด

4.2 ศึกษาขนาดและรูปร่างของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโน

การศึกษาขนาดและรูปร่างของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยกลกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) เป็นการวิเคราะห์ขนาดและรูปร่างของอนุภาคเงินนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ ทำได้โดย นำผงอนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้ประมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้ว sonication เป็นเวลา 30 นาที โดยไม่ใช้ความร้อน หยดสารคอยลอยด์ 1 หยด ลงบน copper grid ทิ้งไว้ ให้แห้งประมาณ 15-30 นาที จากนั้นนำไปดูลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Tecnai G2 20 S-Twin

4.3 การวิเคราะห์องคประกอบของธาตุบนพื้นผิวของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโน

การวิเคราะห์ธาตุบนพื้นผิวของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิคเอกซเรยสเปคโตรสโคปแบบกระจายพลังงาน (Energy-Dispersive X-ray, EDX) ภายใต้กล้องจุลทรรศนอิเล็กตรอน SEM