ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora*

Study on preservation technique of *Erwinia carotovora*

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ดารุณี ปุญญพิทักษ์ สุรีย์พร บัวอาจ

1/ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

นำเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีกลมตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว สีขาวขุ่น มีคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) มาทดสอบวิธีการเก็บรักษาวิธีต่างๆ จำนวน 8 วิธี โดยมีวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ทำการตรวจสอบความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียและความบริสุทธิ์ ทุก 3 เดือน บันทึกลักษณะโคโลนี ความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย และอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธี ผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท เก็บไว้ด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 8 วิธีเป็นเวลา 24 เดือนยังคงมีชีวิตอยู่ ทั้ง 10 ไอโซเลทที่มีลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงตามเดิมทุกประการ

รหัสโครงการ 09-02-49-02-01-07-01-51

คำนำ

วิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชมีหลายวิธีการ ได้แก่ การเก็บรักษาไว้ภายใต้น้ำมัน (Zensen et al. 1944, และ Graham, 1952) วิธีเก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเก็บไว้ได้นาน 2-3 ปี (Devay et al. 1963, Kelman and Person, 1961) เก็บด้วยวิธี 15 % glycerol ใน Deep freezing (Quadling, 1960, Sleemsman and Leben, 1978) วิธีการนี้ส่วนใหญ่ใช้ในเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช Quadling (1960) ได้รายงานสามารถเก็บรักษาเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *phascoli* และ *Erwinia* spp และ *Pseudomonas* spp. ไว้ได้นาน 18 เดือนที่อุณหภูมิ –200C Sleesman and Leben (1978) รายงานการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้ 2 ถึง 3 ปีที่อุณหภูมิ –70^{0}C และวิธี Lyophilization เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการเก็บระยะยาว (long-term preservation) (Dhimgra and Simclair, 1985) ได้มีรายงานวิธีการ Lyophilization สามารถเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้เป็นระยะเวลามากกว่า 10 ปี (Proom and Hemmon, 1949, Stark and Herrington, 1931)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น

3.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

ทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* วิธีต่างๆ จำนวน 8 วิธี ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 เก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 2 เก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ10 °C

กรรมวิธีที่ 3 เก็บภายใต้น้ำมัน ที่อุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 4 เก็บภายใต้น้ำมัน ที่อุณหภูมิ10 °C

กรรมวิธีที่ 5 เก็บภายใต้เหยือกแข็ง – 20 °C โดยเติมสาร glycerol จำนวน 10 %

กรรมวิธีที่ 6 เก็บภายใต้เหยือกแข็ง – 20 °C โดยเติมสาร glycerol จำนวน 50 %

กรรมวิธีที่ 7 เก็บภายใต้เหยือกแข็ง – 80 °C โดยเติมสาร glycerol จำนวน 10 %

กรรมวิธีที่ 8 เก็บภายใต้เหยือกแข็ง – 80 °C โดยเติมสาร glycerol จำนวน 50 %

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เชื้อ *Erwinia carotovora* จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากพืชตระกูลกระหล่ำ และตระกูลผักกาด

2. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato semisynthetic agar (PSA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวอายุ 48 ชั่วโมง

3. เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆตามกรรมวิธีทดลอง

4. ตรวจสอบความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบในทุกๆกรรมวิธี ทุก 3 เดือน โดยในกรรมวิธีที่เก็บภายใต้เหยือกแข็งเมื่อนำออกมาต้องแช่ในน้ำแข็งไว้ตลอดเพื่อให้อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงฉับพลัน ค่อยๆเย็นลง

5. บันทึกลักษณะโคโลนี ความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย และอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธี

เวลาและสถานที่

ต.ค.50 – ก.ย.53 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีกลมตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว สีขาวขุ่น มีคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) มาทดสอบวิธีการเก็บรักษาวิธีต่างๆ จำนวน 8 วิธี โดยมีวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ทำการตรวจสอบความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียและความบริสุทธิ์ ทุก 3 เดือน บันทึกลักษณะโคโลนี ความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย และอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธี ผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท เก็บไว้ด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 8 วิธีเป็นเวลา 24 เดือนยังคงมีชีวิตอยู่ ทั้ง 10 ไอโซเลทที่มีลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงตามเดิมทุกประการ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาวิธีการเก็บรักษาวิธีต่างๆ จำนวน 8 วิธี พบว่า เก็บไว้ด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 8 วิธีเป็นเวลา 24 เดือนยังคงมีชีวิตอยู่ทั้ง 10 ไอโซเลทที่มีลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงตามเดิมทุกประการ

เอกสารอ้างอิง

Correll, J.C., J.E. Puhalla, and R.W. Schneider. 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the Basis of Colony Size, Virulence, and Vegetative Compatibility. Phytopathology. 76 (4) : 396-400.

Goldie-Smith, E.K.1956. Maintenance of stock Cultures of aquatic fungi. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society.72:158-166.

Manoch, L., and S. Piriyaprin. 1993. Isolating fungi from soil and other organic materials. pp. 69-89. *In* Application of Soil Microorganism in Planting Stock Production. Training Course Proceeding No. 3. Muak-Lek, Saraburi, Thailand.

Marx, D.H. and W.J. Daniel. 1976. Maintaining cultures of Ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile cold water storage. Can. J. Microbiol. 22:338 – 341.

Smith, S. and Agies H.S. Onions. 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. Commonwealth Mycological Institute,. Furry Lane Kew, Richmond, Serrey, England. 51 p. No. 54, 53-57.

Smith, D. 1988. Culture and Preservation. *In* Filamentous Fungi, Living Resource Biotechnology, ed. D.L.Hawksworth and B.E. Kirsop, pp. 75-99. Cambridge University Press, UK.

Tolley P.W., 1993. Simple Liquid Nitrogen Storage Method update for *Phytophthora* species. *Phytophthora* New letler19 (13).

Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and Disease It cause, Monograph No.10, The American *Phytopathological* Socicty, Minnesota. 96 p.