

เทคนิคโรคพืช

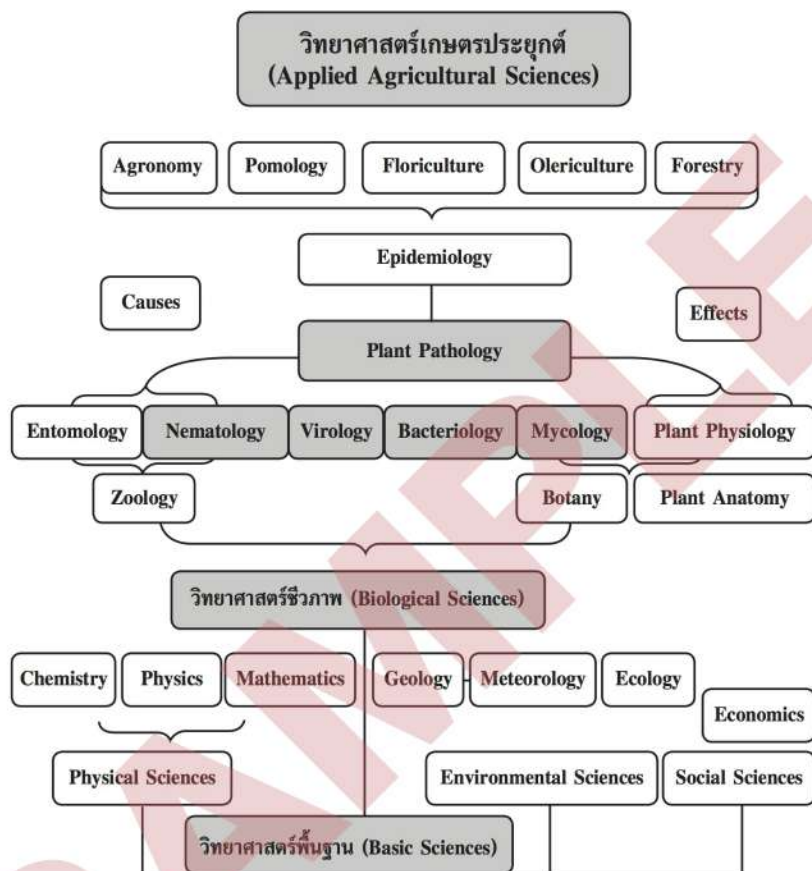
Plant Pathology Techniques



เกวลิน คุณาด้กตากุล

สารบัญ

	หน้า	
บทที่ 1	บทนำ	11
	1.1 ความสำคัญของโรคพืช	11
	1.2 การศึกษาวิจัยด้านโรคพืช	13
	เอกสารอ้างอิง	18
บทที่ 2	การทำให้อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์	19
	2.1 การฆ่าเชื้อด้วยตูบลมร้อน	20
	2.2 การฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ	21
	2.3 การฆ่าเชื้อด้วยรังสี	25
	2.4 การทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง	26
	2.5 การฆ่าเชื้อด้วยการรมก๊าซ	29
	2.6 การฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย	32
	2.7 ข้อควรระวังในการทำให้ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์	37
	2.8 ตู้ปลอดเชื้อ	38
	เอกสารอ้างอิง	41
บทที่ 3	การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช	43
	3.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคจากดิน	43
	3.2 การแยกเชื้อจากชิ้นพืชที่เป็นโรค	50
	3.3 การแยกเชื้อจากเมล็ดพืชที่เป็นโรค	56
	3.4 การแยกเชื้อบริสุทธิ์	61
	เอกสารอ้างอิง	66
บทที่ 4	การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืช	67
	4.1 องค์ประกอบและการแบ่งกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ	67
	4.2 เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	72
	4.3 อาหารที่ใช้แยกและเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช	75



ภาพที่ 1.1 แผนภาพแสดงความเชื่อมโยงระหว่างวิทยาศาสตร์เกษตรประยุกต์และวิทยาศาสตร์พื้นฐาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Robert and Boothroyd (1972)



2.1 การฆ่าเชื้อด้วยตู้อบลมร้อน

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนแห้ง (dry heat sterilization) มักใช้ในการฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว หรือเครื่องมือที่เป็นโลหะ เช่น เข็ม เข็มเย็บเนื้อ มีด ปากคีบ หรือพลาสติกที่ทนร้อน หลักการฆ่าเชื้อของวิธีนี้ คือการที่ความร้อนไปทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของโปรตีน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนเสื่อมสภาพ หรือทำให้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แห้ง หรือถูกเผาไหม้ตายไป สำหรับเครื่องมือที่ใช้ในการฆ่าเชื้อโดยวิธีนี้ ปัจจุบันมีจำหน่ายหลายตราสินค้า ส่วนใหญ่มักเป็นเครื่องมือที่มีชุดควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ โดยผู้ใช้งานสามารถตั้งระดับอุณหภูมิและระยะเวลาให้เครื่องทำงานตามค่าที่ตั้งไว้ (ภาพที่ 2.1) โดยความร้อนนั้นอาจมาจากการใช้กระแสไฟฟ้า หรือก๊าซก็ได้ รังสีความร้อนจะส่งผ่านโดยวิธีแผ่รังสีจากผนังตู้มายังวัตถุ การกระจายลมร้อนของตู้อบลมร้อนที่มีใช้ในปัจจุบัน มี 2 แบบ ได้แก่ การกระจายโดยอาศัยความแตกต่างของอุณหภูมิตามแรงโน้มถ่วงของโลก และการกระจายลมร้อนแบบมีพัดลมช่วยในการกระจายความร้อนให้ทั่วถึง ซึ่งแบบหลังจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมากกว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะเป็นสัดส่วนผกผันกับอุณหภูมิ (ตารางที่ 2.1) โดยระยะเวลาที่ตั้งไว้จะเริ่มนับตั้งแต่ความร้อนหรืออุณหภูมิถึงระดับที่ต้องการ ดังนั้นในบางครั้งหากสิ่งที่ต้องการอบฆ่าเชื้อมีปริมาณมากจึงควรเผื่อเวลาไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายในของตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่มีแผงควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาในการอบฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ



ภาพที่ 2.2 หม้อนึ่งไอน้ำแบบใช้ความดัน (autoclave) ใช้ไฟฟ้าควบคุมความดัน อุณหภูมิ และระยะเวลาแบบอัตโนมัติ

วิธีที่ปฏิบัติกันโดยทั่วไปในการใช้หม้อนึ่งไอน้ำแบบใช้ความดัน จะใช้อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือ 115 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว และ 9.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว ตามลำดับ ทั้งนี้สามารถปรับระยะเวลา และอุณหภูมิของการทำงานตามวัตถุหรือสิ่งของที่นำมาฆ่าเชื้อได้ตามความเหมาะสม โดยระวังไม่ให้ปริมาณของวัตถุที่นำมาฆ่าเชื้อมีมากกว่า 2 ใน 3 ของปริมาตรความจุของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ สำหรับระยะเวลาในการฆ่าเชื้ออาจเพิ่มหรือลดลงได้ในช่วง 12-25 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของภาชนะและปริมาณของของเหลวที่บรรจุในภาชนะนั้น และหากวัสดุที่ต้องการฆ่าเชื้อทนร้อนได้ไม่ดีนั้นอาจลดระยะเวลาในการฆ่าเชื้อลงได้ ดังตารางที่ 2.2 สำหรับ น้ำมัน เมล็ดพืช และแป้ง อาจแยกบรรจุในภาชนะขนาดเล็กและใช้เวลาในการฆ่าเชื้อที่นานขึ้น



ether alcohol และ ketones หรือในสารละลายที่เป็นด่างจัด สามารถใช้กรองได้เพียงครั้งเดียว ใช้ซ้ำไม่ได้ และมีอายุการเก็บรักษาประมาณ 2 ปี กรณีต้องการความสะดวกในการใช้งานมากยิ่งขึ้น อาจเลือกใช้ชุดกรองสำเร็จรูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วก็ได้ (ภาพที่ 2.4 ค, ง) แต่มีราคาค่อนข้างสูง

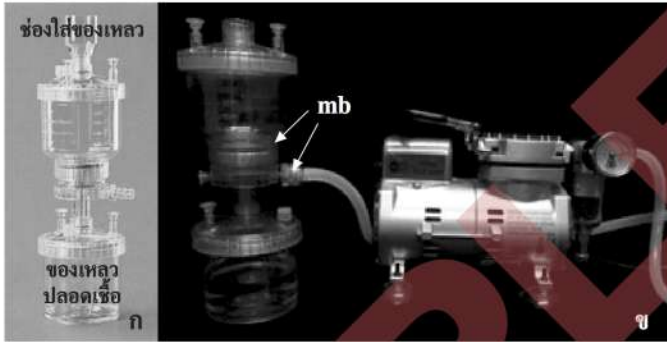


ภาพที่ 2.4 แผ่นกรองชนิด cellulose ester ที่มีรูพรุน (pore size) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบบใช้ร่วมกับ filter holder ประกอบเอง (ก, ข) และแบบพร้อมใช้ (ค) และลักษณะการใช้งานร่วมกับหลอดฉีดยาที่ต้องใช้แรงกดของนิ้วมือ (ง)

ในการกรองสารละลายด้วยเครื่องกรอง ต้องอาศัยแรงดึงดูดของโลก (gravity force) ซึ่งจะทำให้ช้ามาก ดังนั้นโดยทั่วไปจึงต้องใช้แรงกดของอากาศเข้ามาช่วย การเลือกใช้เครื่องกรองมักเลือกตามปริมาตรของสารละลายที่ต้องการทำให้ปลอดเชื้อ เช่น การกรองสารละลายที่มีปริมาตร 1-10 ลูกบาศก์เซนติเมตร อาจเลือกใช้เครื่องกรองที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 3 เซนติเมตร ที่ใช้ร่วมกับกระบอกฉีดยา (syringe) และใช้แรงคนกดด้วยนิ้วมือ แต่หากจำเป็นต้องกรองสารละลายที่มีปริมาตรมาก อาจจำเป็นต้องใช้เครื่องกรองที่มีความจุมากขึ้น โดยใช้แรงกดของอากาศที่ได้จากการประยุกต์ใช้เครื่อง suction pump ช่วย (ภาพที่ 2.5) จะทำให้สามารถกรองสารละลายที่ต้องการทำให้ปลอดเชื้อได้รวดเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ต้องพึงระมัดระวังไว้เสมอว่า แผ่นกรองทุกอันจะมีค่า bubble point ซึ่งเป็นค่าเฉพาะผันแปรตามขนาดของรูพรุนของแผ่นกรอง และเป็นค่าที่ใช้กำหนดแรงดันสูงสุดที่จะดันอากาศให้ผ่านแผ่นกรองที่เปียกน้ำ ที่จุดนี้จะกักไม่ให้น้ำไหลผ่านแผ่นกรองออกไป เว้นแต่มีรอยร้าวหรือรอยแตก ในการกรองจึงไม่ควรใช้



แรงกดหรือแรงดันที่สูงกว่าค่า bubble point ของแผ่นกรอง เนื่องจากจะทำให้แผ่นกรองแตก หรือ นึกขาดได้



ภาพที่ 2.5 ชุดกรองขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร (ก) ที่ต่อเชื่อมกับเครื่องปั๊ม (ข) ใช้ดึงอากาศออกเพื่อทำให้เกิดแรงกดของอากาศในช่องใส่ของเหลวด้านบนผ่านแผ่นกรอง (mb) ที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ลงสู่ช่องเก็บของเหลวที่ปลอตเชื้อด้านล่าง

2.5 การฆ่าเชื้อด้วยการรมก๊าซ

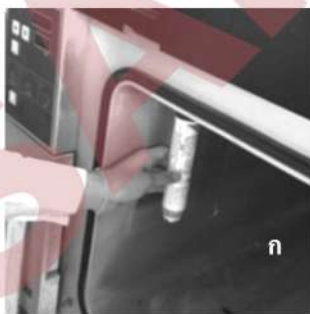
การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการรมก๊าซ (sterilization by fumigation) จะใช้กับวัสดุที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือการกรองได้ ข้อดีคือสามารถฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิต่ำและความดันปรกติ ใช้ได้กับภาชนะบรรจุวัสดุที่ต้องการฆ่าเชื้อได้หลายแบบ เนื่องจากก๊าซสามารถแทรกซึมไปได้ทั่ว เช่น อาจใช้ถุงพลาสติกเป็นภาชนะบรรจุ แต่มีข้อเสียที่วิธีการนี้จะใช้เวลาในการฆ่าเชื่อนานกว่าวิธีอื่น ๆ และอาจเกิดอันตรายได้หากก๊าซที่ใช้เป็นก๊าซชนิดติดไฟได้และมีความเป็นพิษ นอกจากนั้นยังเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ก๊าซที่นิยมใช้ในการรมเพื่อการฆ่าเชื้อ มีดังนี้

เอทิลีนออกไซด์ (ethylene oxide; C_2H_4O , CH_2CH_2O) เป็นก๊าซที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ มีความเป็นพิษสูง ละลายในกระแสเลือดได้ดี ทำให้ปวดหัว หากสัมผัสจะทำให้เกิดการระคายเคืองกับตา ผิวหนัง สามารถจุดระเบิดได้หากปล่อยให้รวมกับอากาศ ในทางการค้าจึงป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นโดยการผสมกับ inert gases เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในอัตราส่วน 90 เปอร์เซ็นต์ ต่อเอทิลีนออกไซด์



10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผสมนี้มักบรรจุในกระบอกโลหะ โดยบรรจุในสภาพเป็นของเหลวน้ำหนัก 100-350 กรัมต่อกระบอก เนื่องจากก๊าซชนิดนี้มีจุดเดือดต่ำที่ 10.8 องศาเซลเซียส จึงควรเก็บกระบอกบรรจุก๊าซไว้ในตู้เย็น ความเข้มข้นที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในภาชนะบรรจุ ประมาณ 400-1000 มิลลิลิตร/ลิตรหรือประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความดันบรรยากาศ ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อไม่ต่ำกว่า 3 ชั่วโมง ก๊าซชนิดนี้สามารถใช้ในการฆ่าเชื้อของเหลวได้ แต่ต้องทำในสภาพอุณหภูมิต่ำประมาณ 3-5 องศาเซลเซียส เช่นใน ice bath หรือในตู้เย็น โดยใช้ปิเปตต์ที่แช่เย็นจัดดูดเอทิลีนออกไซด์เหลวที่เย็นจัดนำไปใส่ลงในของเหลวที่ต้องการฆ่าเชื้อ ที่อัตราความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งวันนาน 1-6 ชั่วโมง ที่ 3-5 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาจึงย้ายภาชนะไปเก็บไว้ในตู้ดูดควัน โดยอาจแช่ไว้ในน้ำอุ่นเพื่อให้ก๊าซระเหยออกไปจากของเหลว อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่เหมาะในการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อเพราะอาจทำให้องค์ประกอบของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ (Dhingra and Sinclair, 1995)

นอกจากนั้น ยังสามารถเลือกใช้ก๊าซเอทิลีนออกไซด์ชนิด 100 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุในหลอดก๊าซขนาดเล็กปิดผนึก (cartridge) ที่นำไปใช้ในช่องรมฆ่าเชื้อของเครื่องรมฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 2.6) ที่มีอุปกรณ์เจาะให้ก๊าซออกมาเองโดยอัตโนมัติ ซึ่งสามารถเลือกอุณหภูมิการฆ่าเชื้อได้ 2 ระดับ คือ ระบบอุ่น ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง และระบบเย็น อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง (Dhingra and Sinclair, 1995)



ก



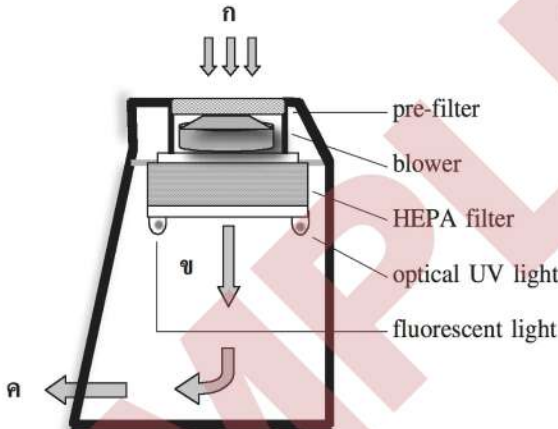
ข

ภาพที่ 2.6 เครื่องรมก๊าซเอทิลีนออกไซด์ (ethylene oxide) (ก) และลักษณะหลอดบรรจุก๊าซที่ใช้ในการรมฆ่าเชื้อ (ข)

ที่มา: ดัดแปลงจาก สเทโรล์ เทคโนโลยีส์ จำกัด (2556)



ได้แก่ แบบ vertical-flow หรือ down-flow (ภาพที่ 2.7) หมายถึงตู้ที่มีระบบกระแสลม พุ่งลงตั้งฉากกับแนวระนาบ และแบบ horizontal-flow หรือ cross-flow หมายถึง ตู้ที่มีระบบกระแสลมพุ่งขนานกับแนวระนาบ หลักการทั่วไปในการใช้ตู้ปลอดเชื้อชนิดนี้ ให้มีประสิทธิภาพ ได้แก่การป้องกันไม่ให้เกิดกระแสลมหมุนวนภายในตู้ ซึ่งอาจเป็น สาเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อนได้



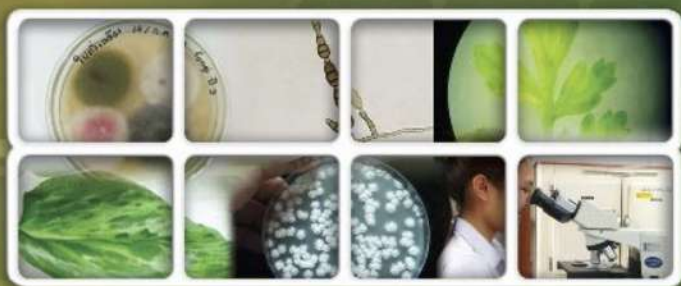
ภาพที่ 2.7 ไดอะแกรมแสดงการเคลื่อนที่ของกระแสลมภายในตู้ลามินาร์แอร์โฟลว์ แบบ vertical-flow โดยกระแสลมเข้าทาง ตำแหน่ง ก และถูกกดด้วย blower ให้ผ่านสู่ HEPA filter จากนั้น กระแสลมปลอดเชื้อเคลื่อนที่ ผ่านตำแหน่ง ข ภายในตู้ และออกไปจากตู้ทางตำแหน่ง ค

สำหรับการปฏิบัติงานด้านโรคพิษ ส่วนใหญ่มักเลือกใช้ตู้ลามินาร์แอร์โฟลว์ แบบ vertical-flow เนื่องจาก ทิศทางของกระแสลมไม่ปะทะตัวผู้ปฏิบัติงานโดยตรง และ ขณะปฏิบัติงานมีการเคลื่อนไหวที่ไม่ขวางทิศทางของกระแสลมมากนัก จึงมีข้อได้เปรียบ มากกว่าการใช้ตู้ปลอดเชื้อแบบ horizontal-flow ซึ่งมีทิศทางของกระแสลมปะทะตัว ผู้ปฏิบัติงานโดยตรงและขณะปฏิบัติงานมีการเคลื่อนไหวขวางทิศทางของกระแสลม มากกว่าซึ่งทำให้เสี่ยงต่อการเกิดการปนเปื้อนได้

อนึ่ง ควรระมัดระวังไว้เสมอว่า การใช้ตู้ปลอดเชื้อดังกล่าวข้างต้น สามารถใช้กับ จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายทั้งต่อผู้ปฏิบัติงานและสภาพแวดล้อมทั่วไปเท่านั้น หาก จำเป็นต้องทำงานกับจุลินทรีย์ที่อาจก่อให้เกิดอันตราย จะต้องใช้ตู้ปลอดเชื้อประเภท

เทคนิคโรคพืช

Plant Pathology Techniques



CHIANG MAI
UNIVERSITY PRESS



9 783745 728155

๕๓๓ 4๐๐ ๖๓๓