บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1.1 เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) (Buchi, R-205/ V basic, Switzerland)

1.2 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert, 700, Germany)

1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance) (Mettler Toledo, PB602, USA)

1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) (Mettler Toledo, ML303, USA)

1.5 ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume hood) (Major, Super flow, ไทย)

1.6 ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinets) (Nuaire, NU-440, USA)

1.7 ตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Low temperature incubator) (Shel-lab, 2020, USA)

1.8 เครื่องมือวัดความเค็ม (Salinity refractometer) (Atago, 2441-W05, Japan)

1.9 หม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, SS-325, Japan)

1.10 เครื่องเขย่าไม่ควบคุมอุณหภูมิ (Orbital shaker) (Pnp, OS1, USA)

1.10 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Innova, 4300, Germany)

1.11 ไมโครปิเปต (Micropipete) ขนาด P20, P200 และ P1000 (Gilson, USA)

1.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Denver, UB-10, USA)

1.13 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) (Genie 2, G-560 E, USA)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร

2.2 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100 200 และ 500 มิลลิลิตร

2.3 กรวยแยก (Separator funnel) พร้อมขาตั้ง

2.4 Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 และ 6 มิลลิเมตร

2.5 เข็มเขี่ยเชื้อ (Hook)

2.6 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Micro centrifuge tube)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.7 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 1000 มิลลิลิตร

2.8 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

2.9 ขวดฝาเกลียว (Duran bottle) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

2.10 แผ่นดิสก์มาตรฐาน (AA-disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Whatman, USA)

2.11 กระดาษกรองเบอร์ 2 (Whatman, USA)

2.12 แผ่น Thin layer chromatography (TLC) สำเร็จรูป (Merck, Siliga gel 60F_{254}, Germany)

2.13 ขวดก้นกลมขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร สำหรับใช้กับ Rotary evaporator

2.14 โถดูดความชื้น (Desiccator)

2.15 เครื่องเจาะกระดาษ

3. สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide: DMSO) (Analytical reagent grade: Fisher Scientific, India)

3.2 เอธิลอะซิเตต (Ethyl acetate) (Analytical reagent grade: Fisher Scientific, USA)

3.3 คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (Analytical reagent grade: Fisher Scientific, USA)

3.4 เมทานอล (Methanol) (Analytical reagent grade: Fisher Scientific, USA)

3.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ชนิดเม็ด (Sodium hydroxide pellets) (Univar, USA)

3.6 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Analytical reagent grade: Fisher Scientific, England)

3.7 D-glucose (Fisher Scientific, England)

3.8 Potato dextrose broth (PDB) (Difco, USA)

3.9 Potato dextrose agar (PDA) (Difco, USA)

3.10 Sabouraud dextrose broth (SDB) (Difco, USA)

3.11 Malt extracts (Bacto, USA)

3.12 Yeast extracts (Bacto, USA)

3.13 Fluconazole powder (TCI, Japan)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ราจากป่าชายเลนที่เป็นตัวแทนในการศึกษา จำนวน 6 สายพันธุ์ เก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ไว้ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้แก่ ราทะเลที่พบบนเศษไม้ในป่าชายเลนซึ่งต่อจากนี้จะเรียกสั้น ๆ ว่าราทะเล จำนวน 3 สายพันธุ์ และราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบพืชป่าชายเลนซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่าราเอนโดไฟท์ จำนวน 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3-1)

2. ราสาเหตุโรคพืชจัดซื้อจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กลุ่มงานวิทยาไมโครกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098

ตารางที่ 3-1 ราจากป่าชายเลนจำนวน 6 สายพันธุ์ ที่เป็นตัวแทนในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ลำดับที่	ราจากป่าชายเลน	สายพันธุ์
1	ราทะเล	BUCS 004
2	ราทะเล	BUCS 032-2
3	ราทะเล	BUSK 055-1
4	เอนโดไฟท์	BUEN 121
5	เอนโดไฟท์	BUEN 830
6	เอนโดไฟท์	BUEN 834

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของราจากป่าชายเลนต่อราสาเหตุโรคพืชบนอาหารแข็งด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique) (ดัดแปลงจากวิธีของ Adebola and Amadi (2010))

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

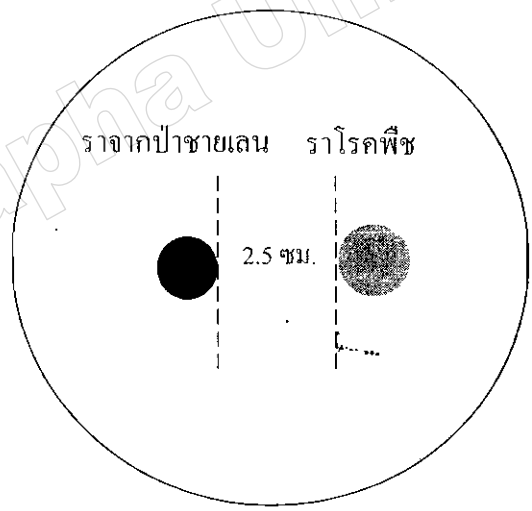
ถ่ายเชื้อราจากป่าชายเลนจากหลอดเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ ลงบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเค็ม 15 ppt (PDA/SW) บ่มเป็นเวลา 4-7 วัน (ราเอนโดไฟท์) และ 10-14 วัน (ราทะเล) และถ่ายเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากหลอดเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ลงบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (PDA/DW) เป็นเวลา 3-5 วัน บ่มราทุกชนิดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้ Cork borer ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เจาะชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยราเจริญ ถ่ายลงอาหารแข็งจานใหม่ บ่มโดยใช้สภาวะข้างต้น เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบในขั้นตอนต่อไป

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ใช้ Cork borer ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นจากขอบโคโลนีราทะเล หรือราเอนโดไฟท์ มาเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช บนอาหาร PDA/DW และ PDA/SW ตามลำดับ โดยวางชิ้นวุ้นให้มีระยะห่างระหว่างราทั้งสองชนิดเท่ากับ 2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3-1) ในกรณีที่ราทะเลที่เจริญช้าจะเลี้ยงราทะเลบนอาหารทดสอบก่อนประมาณ 4-7 วัน (บ่มดังสภาวะในข้อ 1.1) แล้วจึงถ่ายเชื้อราสาเหตุโรคพืชมาเลี้ยงร่วมกัน (ทำ 3 ซ้ำ) ตรวจผลการทดลองโดยสังเกตการเกิด Antibiosis หลังจากเลี้ยงเชื้อร่วมกันในวันที่ 3 โดยวัดระยะ Antibiosis ระหว่างขอบโคโลนีราจากป่าชายเลน ถึงขอบโคโลนีราสาเหตุโรคพืช บันทึกระยะที่ได้ และแบ่งระดับความแรงของระยะ Antibiosis ที่ได้ออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ผลลบ – ไม่พบระยะยับยั้ง หรือไม่เกิด Antibiosis ผลบวกอ่อน + ระยะยับยั้ง $\leq$0.50 เซนติเมตร ผลบวกปานกลาง ++ ระยะยับยั้ง > 0.50-1.00 เซนติเมตร ผลบวกแรง +++ ระยะยับยั้ง >1.00-2.00 เซนติเมตร และผลบวกแรงมาก ++++ ระยะยับยั้ง > 2.00 เซนติเมตร ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Prapagdee, Kuekulvong, & Mongkolsuk, 2008)



ภาพที่ 3-1 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างราจากป่าชายเลน กับราสาเหตุโรคพืชบนอาหารแข็ง

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราป่าชายเลน โดยใช้สภาวะตั้งต้น

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ และการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในอาหารเหลว

เตรียมกล้าเชื้อราทะเล ราเอนโดไฟท์ วิธีเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อในข้อ 1.1 ถ่ายเชื้อโดยเจาะบริเวณขอบโคโลนีราจากป่าชายเลนในจานอาหารใหม่ จำนวน 5 ชิ้น ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt (PDB/SW) สำหรับเลี้ยงราทะเล และอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น ความเค็ม 0 ppt (PDB/DW) สำหรับเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เลี้ยงราในอาหารเหลว จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน (ราเอนโดไฟท์ และราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004) และ 7 วัน (ราทะเล) ให้สภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะแบบตั้งทิ้งไว้ (Static) และเขย่า (Shaking) ที่ 150 รอบ/นาที เมื่อครบกำหนดนำอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงรามากรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดสาร และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากราจากป่าชายเลนอีกครั้งก่อนนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

สภาวะตั้งต้น (ตารางที่ 3-2) ที่ผู้วิจัยศึกษาประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง คือชุดที่ 1 บ่มโดยตั้งทิ้งไว้ เป็นสภาวะตั้งต้นที่ 1 ชุดการทดลองที่ 2 บ่มโดยให้เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ส่วนสภาวะอื่น ๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เป็นสภาวะตั้งต้นที่ 2

2.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ดัดแปลงวิธีการจาก Isaka et al. (2009))

นำอาหารเหลวที่ผ่านการกรองมาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ ประมาณ 10 นาที ถึง 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น โดยชั้นบนเป็นส่วนของเอธิลอะซิเตต ชั้นล่างจะเป็นส่วนของอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงราจากป่าชายเลน ไขแยกส่วนของน้ำเลี้ยงราแล้วสกัดซ้ำด้วยเอธิลอะซิเตตอีกรอบ จากนั้นรวมส่วนของเอธิลอะซิเตตเข้าด้วยกัน (ประมาณ 100 มิลลิลิตร) นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ให้แห้ง ละลายสารที่ได้ด้วยสารละลายไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ (50% DMSO) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการเป็นสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion โดยถ่ายเชื้อราสาเหตุโรคพืชเลี้ยงบนจานอาหาร PDA/DW ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สำหรับ *C. gloeosporioides*, *F. oxysporumi* และ *Pestalotiopsis* sp. และ 5 วัน สำหรับ *A. brassicicola* หยดสารสกัดที่ละลายในสารละลาย 50% DMSO ลงบนแผ่นดิสก์มาตรฐานปราศจากเชื้อปริมาตร

20 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้งสนิท จากนั้นวางแผ่นดิสก์ที่ชุบสารสกัด ให้ห่างจากขอบโคโลนีราสาเหตุโรคพืช 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลการยับยั้งของสารสกัดโดยวัดระยะห่างจากขอบโคโลนีราสาเหตุโรคพืช ถึงขอบแผ่นดิสก์ (ระยะยับยั้ง; Inhibition distance) เทียบกับชุดควบคุมเชิงลบ คือแผ่นดิสก์ที่ชุบเฉพาะสารละลาย 50% DMSO ทำการทดสอบ 3 ซ้ำต่อ 1 สารสกัด

ตารางที่ 3-2 สภาวะตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลน

สภาวะสภาวะตั้งต้น	ระดับสภาวะ
สภาวะตั้งต้นที่ 1 (ตั้งทิ้งไว้)	
ความเค็ม	0 ppt สำหรับราเอนโดไฟท์ และ 15 ppt สำหรับราทะเล
อาหารเหลว	PDB
ค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้น	5
ความเร็วในการเขย่า	0 รอบ/นาที
อุณหภูมิ	28 องศาเซลเซียส
ระยะเวลา	4 วัน (ราเอนโดไฟท์) 7 วัน (ราทะเล)
สภาวะตั้งต้นที่ 2 (เขย่าให้อากาศ)	
	เหมือนสภาวะตั้งต้นที่ 1 ทุกประการ ยกเว้นการเขย่าที่ 150 รอบ/นาที

หมายเหตุ PDB: Potato dextrose broth, ppt: Part per thousand

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราจากป่าชายเลนให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ดัดแปลงวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาของ Kiran et al. (2009))

ศึกษาสภาวะทางกายภาพที่มีรายงานว่าส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากป่าชายเลน ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว ชนิดของอาหารเหลว ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว อัตราเร็วในการเขย่าให้อากาศ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงราจากป่าชายเลน เพื่อศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อกระบวนการผลิตยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ทำการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในอาหารเหลวจำนวน 3 ชุดการทดลอง และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1 การเลี้ยงราจากป่าชายเลนในอาหารเหลว

ใช้สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ร่วมกับการปรับสภาวะทางกายภาพอื่น ๆ ดังตารางที่ 3-3 เริ่มจากการศึกษาความเค็ม 0, 10, 15, 20 และ 30 ppt ถ่ายเชื้อราจากป่าชายเลนลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารดังกล่าวเขย่าที่ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน (ราเอนโดไฟท์ และราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004) และ 7 วัน (ราทะเล)

3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เมื่อครบกำหนดเก็บขวดรูปชมพู่ในแต่ละชุดการทดลองมากรองแยกเส้นใย สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต ระเหยแห้ง และทดสอบความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี Disc diffusion ตามที่กล่าวมาในข้อ 2.2 และ ข้อ 2.3 ตามลำดับ

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูล (ระยะยับยั้ง) ที่ได้ในแต่ละสภาวะมาคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *A. brassicicola, C. gloeosporioides, F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป (SPSS version 16) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (P=0.05) เมื่อเกิดความแตกต่างทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของระยะยับยั้ง (Multiple comparison) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (P=0.05) หากพบว่ามีสภาวะเหมาะสมมากกว่าหนึ่งสภาวะ ให้คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากระยะยับยั้งเฉลี่ยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และยังต้องคำนึงถึงความสะดวก ประหยัดในเรื่องของเวลา หรือค่าใช้จ่าย เพื่อคัดเลือกสภาวะเหมาะสมไปใช้การทดลองขั้นต่อ ๆ ไปตามลำดับ

3.4 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งภาพของสารสกัดที่ได้จากราป่าชายเลน

3.4.1 เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่ได้ จากการศึกษาสภาวะเหมาะสม กับผลของสารสกัดจากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ และเขย่าที่ 150 รอบ/นาที

3.4.2 เปรียบเทียบสภาวะเหมาะสมของราจากป่าชายเลนทั้งสองกลุ่มคือ ราทะเลที่พบบนเศษไม้ และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน

3.4.3 เปรียบเทียบระยะยับยั้งสูงสุดที่ได้จากการศึกษาสภาวะเหมาะสมของราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกราจากป่าชายเลนที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด 2 สายพันธุ์ ไปศึกษารูปแบบการเจริญ และขยายขนาดการหมัก

ตารางที่ 3-3 สภาวะทางกายภาพที่ศึกษาสภาวะเหมาะสมของราป่าชายเลน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

สภาวะทางกายภาพ	
ความเค็ม	0, 10, 15, 20 และ 30 ppt
อาหารเหลว	0.5xPDB, PDB, YMB, SDB และ LNB
ค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้น	5, 6, 7, 8 และ 9
ความเร็วในการเขย่า	0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที
อุณหภูมิ	22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส
ระยะเวลา	2, 4, 7, 10 และ 14 วัน สำหรับราเอนโดไฟท์
	7, 10, 14, 21 และ 28 วัน สำหรับราทะเล

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มในอาหารด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl

4. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ กับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลน

ศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ กับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลน ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด 2 สายพันธุ์ โดยใช้ Cork borer เจาะชิ้นวุ้น บริเวณขอบโคโลนีราจากป่าชายเลนกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ จำนวน 5 ชิ้น ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 50 มิลลิลิตร และสภาวะทางกายภาพอื่น ๆ ที่เหมาะสมของราแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากการทดลอง บ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 2, 4, 7, 10 และ 14 วัน และราทะเล 7, 10, 14, 21 และ 28 วัน หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ดัดแปลงจากวิธีของ Rasooli and Abyaneh (2004)) กรองแยกเซลล์ และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากจากเชื้อ 2-3 ครั้ง นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ราติดอยู่ด้านบนไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้ง หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ ดูดความชื้นของเซลล์ราบนกระดาษกรองในโถดูดความชื้น (Desiccator) ประมาณ 30-40 นาที จนอุณหภูมิของกระดาษเป็นปกติ หาน้ำหนักเซลล์แห้งจากน้ำหนักเซลล์แห้งบนกระดาษกรองลบด้วยน้ำหนักกระดาษกรองอบแห้ง นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้ง ระยะเวลาในการบ่มราจากป่าชายเลน และระยะยับยั้งของสารสกัดต่อราสาเหตุโรคพืช

5. การศึกษาผลของการใช้สภาวะเหมาะสมกับการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในการขยายขนาดการหมัก (Scale up)

5.1 การขยายขนาดการหมัก (Scale up)

ขยายขนาดการหมักราจากป่าชายเลนที่พบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชสูง มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ใช้สภาวะที่เหมาะสมทั้ง 6 สภาวะจากการทดลองในข้อ 3

5.2 การหาผลผลิตที่ได้ (Yield)

5.2.1 การหาน้ำหนักสารสกัด

เมื่อครบกำหนดกรองแยกเซลล์ราจากอาหารเหลว นำส่วนของอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงราจากป่าชายเลนไปสกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต 2 รอบ นำสารมารวมกันในขวดก้นกลมที่ใช้กับเครื่อง Rotary evaporator จากนั้นระเหยสารให้เหลือปริมาตรสุดท้ายประมาณ 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดฝาเกลียวขนาด 21x70 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ อบแห้ง และชั่งน้ำหนัก ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง กลั้วสารที่ติดอยู่ในขวดก้นกลมในขั้นแรกด้วยเอธิลอะซิเตต 3-5 ครั้ง (ปริมาตรที่ใช้ประมาณ 5-7 มิลลิลิตร) ถ่ายลงในหลอดฝาเกลียวข้างต้น สุดท้ายจะมีปริมาตรรวมไม่เกิน 20 มิลลิลิตร นำหลอดฝาเกลียวใส่ในขวดก้นกลม และนำไประเหยให้แห้งอย่างระมัดระวัง หลังจากนั้นตั้งหลอดฝาเกลียวทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 2-3 วัน ชั่งน้ำหนักรวมที่ได้หักน้ำหนักหลอดฝาเกลียวในตอนต้นจะได้น้ำหนักของสารสกัด

5.2.2 เปรียบเทียบผลผลิต (Yield) ที่ได้ระหว่างก่อนการขยายขนาดการหมักและภายหลังการขยายขนาดการหมัก กับปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงราจากป่าชายเลน (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเปรียบเทียบผลของสารสกัดต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี Disc diffusion โดยหยดสารสกัดที่ได้จากการศึกษาสภาวะเหมาะสมในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย 50% DMSO ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารสกัดจากการขยายขนาดการหมักในอาหารเหลวปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ละลายด้วย 50% DMSO ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นดิสก์ปราศจากเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง ดังการทดลองข้อที่ 2.3 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่หยดสารละลาย 50% DMSO

6. การหาค่า Minimum inhibition concentration (MIC) ของสารสกัดที่ได้ต่อราสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธี Agar dilution (ดัดแปลงจากวิธีการของ Liu, Totora, Ryan, Lee, and Golub (2002))

นำราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 ชนิด มาทดสอบกับสารสกัดที่ได้จากการขยายขนาดการหมักบนอาหาร PDA/DW ที่ผสมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64 และ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ชุดทดสอบ) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการทดสอบยา Fluconazole ที่ผสมในอาหาร PDA/DW ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64 และ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ชุดควบคุมเชิงบวก; Positive control) ด้วยการทำ Two fold dilution ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร (การเตรียมสารสกัด และยา Fluconazole ด้วย DMSO ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงในภาคผนวก) หลุมที่ถ่ายเชื้อราสาเหตุโรคพืชลงบนอาหารที่เติมเฉพาะตัวทำละลาย (PDA/DW + 1% DMSO) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) และหลุมที่ไม่ถ่ายเชื้อเป็นชุดควบคุมปลอดเชื้อ (Sterility control) ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นตัดปลายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของราสาเหตุโรคพืชเจริญด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร วางลงบนอาหารที่มีลงบนอาหาร PDA/DW ที่มีสารสกัดและยา Fluconazole ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเตรียมสาร และยา Fluconazole ทั้งหมด 3 ชุด

7. การแยกสารองค์ประกอบของสารสกัดด้วยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) (ดัดแปลงวิธีการจาก Kaufman, Cseke, Warber, Duke, and Brielmann (1999))

นำสารสกัดจากราป่าชายเลนมาแยกองค์ประกอบบนแผ่นอลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล คือ TLC siliga gel $60F_{254}$ (Merk) ขนาด 1 x 8 เซนติเมตร หยดสารสกัดโดยใช้แคปิลลารีจุดสารให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 0.5 เซนติเมตร รอให้สารที่หยดไว้แห้งสนิท นำแผ่น TLC วางในภาชนะปิดที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองนี้ใช้สารละลายคลอโรฟอร์มกับเมทานอล (อัตราส่วน 9: 1, 8.5: 1.5, 8: 2, 7.5: 2.5 และ 7: 3) สารละลายคลอโรฟอร์ม กับเอธิลอะซิเตต (อัตราส่วน 9: 1, 8.5: 1.5, 8: 2, 7.5: 2.5 และ 7: 3) และสารละลายคลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต: เมทานอล (อัตราส่วน 9: 0.5: 0.5, 8.5 :1: 0.5, 8.5: 0.5: 1, 8: 1.5: 0.5, 8: 1: 1 และ 8: 0.5: 1.5) โดยให้ตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดสารสกัด เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 1 เซนติเมตร นำออกจากภาชนะแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นส่องดูจำนวนและรูปแบบของสารองค์ประกอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คัดเลือกสารละลายคู่ที่

เหมาะสมในอัตราส่วนที่ให้ผลการแยกสารองค์ประกอบได้ชัดเจน และคำนวณอัตราการเคลื่อนที่ของสารจากสมการ

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

8. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชของสารองค์ประกอบที่ได้ด้วยวิธี TLC disc diffusion (ดัดแปลงวิธีจาก Marston (2011))

นำสารสกัดภายหลังจากการขยายการหมัก ที่ผ่านการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช และพบแถบสารองค์ประกอบชัดเจนบนแผ่น TLC มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 ชนิด โดยถ่ายเชื้อราสาเหตุโรคพืชเลี้ยงบนอาหาร PDA/DW เช่นเดียวกับการศึกษาข้อ 2.3 จากนั้นเจาะแผ่น TLC บริเวณที่มีแถบสารองค์ประกอบ ด้วยเครื่องเจาะกระดาษเป็นวงกลมรัศมี 6 มิลลิเมตร วาง TLC disc ลงบนหน้าอาหาร PDA/DW โดยคว่ำส่วนซิลิกาเจลลงบนอาหารให้ห่างจากขอบโคโลนีราสาเหตุโรคพืช 1 เซนติเมตร เทียบกับชุดควบคุมที่เจาะแผ่น TLC สำเร็จรูปที่ผ่านการวางแผ่น TLC ในสารละลาย โดยไม่หยดสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบการยับยั้งของสารองค์ประกอบโดยวัดระยะห่างระหว่างขอบโคโลนีกับขอบของแผ่น TLC Disc (ระยะยับยั้ง) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ต่อสารองค์ประกอบ 1 ชนิด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University