3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1. เชื้อทดสอบ

ราโรคพืช: *Alternalia brassicicola* DOAC 0436, *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782 และ *Fusarium oxysporum* DOAC 0436 จัดซื้อจากกรมวิชาการเกษตร

แบคทีเรียและยีสต์: *Bacillus subtilis* TISTR, *Escherichia coli, Candida albicans* TISTR 5239, จัดซื้อจาก TISTR และ *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus, MRSA* แยกได้จากคนไข้

3.2. ราเอ็นโดไฟท์

เป็นราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากใบโพธิ์ทะเล ลำพูและโปรงแดง จากโรงเรียนบางปะกงบวรวิทยายน (พิพิธภัณฑ์นิเวศป่าชายเลน) อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา และศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่ใช้ในการศึกษาแยกได้จากพืชป่าชายเลนชนิดต่าง ๆ และการจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอ็นโดไฟท์	host	การจัดจำแนก
Th021	โพธิ์ทะเล	Mycelia sterilia
Th121	โพธิ์ทะเล	Hyphomycete
Sc10A3	ลำพู	Ascomycete
Sc15A3	ลำพู	Mycelia sterilia
Br830	โปรงแดง	*Colletotrichum* sp.
Br834	โปรงแดง	Mycelia sterilia

3.3 แอคติโนมัยซีท

เป็นแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลน จากจังหวัดจันทบุรี และจังหวัดชลบุรี ทั้งจากบริเวณที่ใกล้รากพืชชายเลน ดินเต็มไปด้วยสาหร่ายสีเขียวปกคลุม และจากบริเวณดินที่ค่อนข้างแห้ง

ตารางที่ 4 แอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกมาศึกษา แยกได้จาก ตะกอนชนิดต่าง ๆ

แอคติโนมัยซีท	แหล่งที่แยกเชื้อ	การจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์
CH 54-4	ป่าชายเลนจันทบุรี	*Streptomyces*
A1-3	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
A3-3	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
A11-8	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
A16-1	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
SM16-2	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
A19-5	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*

3.4 วิธีการทดลองสำหรับราเอ็นโดไฟท์

การทดสอบยืนยันปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอ็นโดไฟท์และราสาเหตุ โรคพืช

3.4.1 ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะชิ้นวุ้นจากบริเวณขอบโคโลนีเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่ทราบว่าสามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ที่เพาะเลี้ยงไว้ มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, SDA และ LNA

3.4.2 ใช้ cork borer ขนาดเดียวกัน เจาะชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporoides* หรือ *F. oxysporum* มาวางลงในจานเพาะเลี้ยงเดียวกันกับเอ็นโดไฟท์ โดยให้ราทั้ง 2 ชนิดห่างกัน 2.5 เซนติเมตร

3.4.3 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-7 วัน

3.4.4 บันทึกระยะห่างของเส้นใยราทั้งสองชนิด และแปลผลเป็นระดับยับยั้งแบบ antibiosis (antibiosis level or inhibition level, I.L.)

การแปลผลใช้หลักเกณฑ์ ดังนี้

Inhibition level; Very Strong (4+) I.L. >1 cm, Strong (3+) I.L. >0.6 -1cm, Moderate (2+) I.L. >0.2- 0.6 cm, Weak (1+) I.L. $\leq$ 0.2 cm

การเพาะเลี้ยงเชื้อเอ็นโดไฟท์ในอาหารเหลวและการสกัดสาร

3.4.5 ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะบริเวณขอบของโคโลนีราเอ็นโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 5 ชิ้น ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 0.5x PDB และ SDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.4.6 บ่มโดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน 7 วัน หรือ 14 วัน

3.4.7. นำราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงไว้มากรองด้วยกระดาษกรอง No.3 เพื่อแยกส่วนของเส้นใยราและอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกัน นำส่วนอาหารเลี้ยงราที่ได้มาสกัดสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate เขย่าแรง ๆ 2 รอบ นานรอบละ 15-20 นาที

3.4.8 นำส่วน ethyl acetate ทั้ง 2 รอบมารวมกัน นำไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้ง (evaporator) ละลายสารสกัดที่ได้ด้วย 0.5% DMSO ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราเพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ

แบ่งการศึกษาเป็น 2 ขั้นตอน

3.4.9. **การศึกษาสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงราในอาหารเหลว**

ทำการศึกษาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ความเค็มในอาหารที่เหมาะสม และระยะเวลาการเลี้ยง ของราเอ็นโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (จากผลปฏิสัมพันธ์) ได้แตกต่างกัน 6 สายพันธุ์ นำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหมัก) ไปทดสอบการยับยั้ง บันทึกผลเป็นระดับการยับยั้ง (I.L.)

ตารางที่ 5 สภาวะการเลี้ยงราในอาหารเหลวที่ศึกษา

เอ็นโดไฟท์	ชนิดอาหาร	ความเค็ม	ระยะเวลาการหมัก	ราทดสอบ
Th21	0.5xPDB, SDB, LNB	0, 10, 15, 20 และ 30 ppt	3 วัน 7 วัน และ 14 วัน	*C.gloeosporioides*
Th121				*A.brassicicola*
Sc10A3				*A.brassicicola*, *F.oxysporum*
Sc15A3				*A.brassicicola*, *F.oxysporum*
Br830				*C.gloeosporioides*, *F.oxysporum*
Br834				*C.gloeosporioides*, *F.oxysporum*

นำสภาวะที่ดีที่สุดจากข้อ 3.3.1 ทีละปัจจัย มาศึกษาผลต่อการสร้างสารก่อฤทธิ์ของราเอ็นโดไฟท์ 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ และทดสอบการยับยั้งการเจริญต่อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ บันทึกผลเป็นระยะการยับยั้ง (Inhibition distance)

3.4.10 **การศึกษาสภาวะเหมาะสมด้วยการหมักแบบ** solid state

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state
2. นำธัญญพืชที่ใช้เลี้ยงสัตว์หลายชนิด ผสมกันในอัตราส่วนแตกต่างกัน บรรจุลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดลองเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ดังนี้

- รำข้าวผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 60 กรัม: 40 มิลลิลิตร (รำข้าว: น้ำกลั่น)
- ปลายข้าวสุก 100 กรัม (1:1) (เป็นการหุงปลายข้าว 1 ถ้วยตวง ในน้ำกลั่น 1 ถ้วยตวง)
- ปลายข้าวสุก 100 กรัม (2:1) (เป็นการหุงปลายข้าว 2 ถ้วยตวง ในน้ำกลั่น 1 ถ้วยตวง)

- ข้าวฟ่าง 100 กรัม (1:1) (เป็นการหุงข้าวฟ่าง 1 ถ้วยตวง ในน้ำกลั่น 1 ถ้วยตวง)
- รำข้าวผสมกับปลายข้าว (1:1) นำรำข้าว 50 กรัมมาผสมกับปลายข้าวที่หุงสุกแล้ว 50 กรัม
- รำข้าวผสมกับปลายข้าว (2:1) นำรำข้าว 65 กรัมมาผสมกับปลายข้าวที่หุงสุกแล้ว 35 กรัม
- รำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง (1:1) นำรำข้าว 50 กรัมมาผสมกับปลายข้าวฟ่างที่หุงสุกแล้ว 50 กรัม
- รำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง (2:1) นำรำข้าว 65 กรัมมาผสมกับปลายข้าวฟ่างที่หุงสุกแล้ว 35 กรัม

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. การหมัก

1. คัดเลือกราเอ็นโดไฟท์ที่ให้ผลยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีนอาหารแข็งแต่ไม่ดีในอาหารเหลว เลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state ที่ได้เตรียมไว้ดังข้อ 3.4.1 ในการทดลองนี้ได้เลือกรา Br834

2. นำรา Br834 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3. ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตรเจาะโคโลนีของรา BUEN 834 นำชิ้นวุ้น ใส่ลงในฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state ฟลาสก์ละ 5 ชิ้น (ชนิดละ 4 ฟลาสก์)

4. นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

5. นำฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state ชนิดละ 2 ฟลาสก์มาสกัดด้วย absolute ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 เก็บสารละลายที่กรองได้ใส่หลอดปราศจากเชื้อเพื่อนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง

6. นำฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state ชนิดละ 2 ฟลาสก์มาผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 มิลลิลิตร สกัดด้วย ethyl acetate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ หลาย ๆ ครั้ง แล้วทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3

7. เติม ethyl acetate ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ข้อ 3.4.2.6 อีกครั้ง แล้วเขย่าเพื่อสกัดสารประมาณ 10 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 และแยกสารออกด้วยกรวยแยกเพื่อแยกเอาส่วนของ ethyl acetate เก็บใส่หลอดปราศจากเชื้อรวมกับในข้อ 3.2.2.6 แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง

3.4.11. **ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธี** Disc diffusion

1. ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะวุ้นที่มีราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporoides* หรือ *F. oxysporum* มาวางบนอาหารทดสอบ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน

2. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดราจากเอ็นโดไฟท์ 20 ไมโครลิตร หยดลงบน disc มาตรฐานที่เตรียมไว้ วางตากลมให้แห้งสนิทจากนั้นนำมาวางบนจานอาหาร PDA โดยวางให้มีระยะห่างจากขอบโคโลนีราเอ็นโดไฟท์ ประมาณ 1.0 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน ใช้สารละลาย 0.5% DMSO เป็นสารควบคุมผลลบ (ทำ 2 ซ้ำ)

3. บันทึกลักษณะการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เทียบกับสารละลาย 0.5% DMSO (ทำ 3 ซ้ำ) โดยการวัดระยะห่างเส้นใยรากับแผ่น disc แปลผลเป็นระดับการยับยั้ง (inhibition Distance, I.L.) หรือบันทึกระยะยับยั้ง (inhibition Distance, I.D.)จากการวัดระยะห่างเส้นใยรากับแผ่น disc โดยตรง

การแปลผลใช้หลักเกณฑ์ ดังนี้

Inhibition level: Very strong 3+, I.L. $\geq$0.6 cm; Strong 2+, I.L. $\geq$0.3 -< 0.6 cm; weak 1+, I.L. $\geq$ 0.1 - < 0.3 cm; not inhibit -, IL < 0.1 cm; I.L. = Level of Inhibition distance between colony and disc

3.4.12 **ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากราในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธี** Disc diffusion

1. นำสารสกัดจากเอ็นโดไฟท์ที่ให้ผลยับยั้งราก่อโรคพืชมาเจือจางด้วยสารละลาย 10% DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 5,000, 4,000, 3,000, 2,000 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการทดสอบการยับยั้งราก่อโรค ด้วยวิธี Disc diffusion แต่ใช้สารสกัดจากรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างที่ไม่เติมสารสกัด อัตราส่วน 1:1และสารละลาย 10% DMSO เป็นสารละลายควบคุม (ทำ 2 ซ้ำ)

2. บันทึกลักษณะการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เทียบกับสารละลายควบคุม โดยการวัดระยะห่างเส้นใยรากับแผ่น disc แปลผลเป็นระยะห่างขอบโคโลนีจากแผ่น disc (inhibition Distance, I.D.) หาค่าเฉลี่ย บันทึกระยะยับยั้งที่คำนวณได้เป็นเซนติเมตร

3.4.13 **ศึกษารูปแบบสารองค์ประกอบในสารสกัดด้วยวิธี** Thin layer chromatography (TLC)

1. หยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 20 x20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น silica gel $60F_{254}$ ขนาด 20x20 เซนติเมตร ให้จุดอยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่น 1.5 เซนติเมตร วางผึ่งให้สารแห้ง

2. นำแผ่น TLC วางในภาชนะปิดสนิท ภายในบรรจุสารละลาย chloroform และ methanol ในอัตราส่วน 9:1 ให้ระดับสารละลายต่ำกว่าสาร

3. เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนถึงตำแหน่ง 0.5 เซนติเมตร จากขอบบนนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะวางผึ่งให้แห้ง

4. ตรวจสอบสารประกอบที่แยกออกจากกันใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
วันที่ -8 ส.ค. 2550
เลขทะเบียน 245681
เลขเรียกหนังสือ

3.5 ขั้นตอนและวิธีการสำหรับแอคติโนมัยซีท

3.5.1 การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ให้สารแอนติไบโอติก

เนื่องจากแอคติโนมัยซีทมีความแตกต่างของการสร้างสารแอนติไบโอติก ตามความแตกต่างของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุด จึงขอเน้นในเรื่องนี้เป็นพิเศษ นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากบริเวณรากพืชป่าชายเลน (ที่มีเศษซากของรากพืช)ที่สามารถสร้างสารแอนติไบโอติกได้ มาทดสอบการสร้างสารแอนติไบโอติกด้วยวิธี Streak plate technique ด้วยการเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ Antibiotic Production Medium2 , ISP2 (International Streptomyces Project 2), Glucose Yeast Extract, Starch Casein Agar และ TSA.(Trypticase Soy Agar) โดย Streak เชื้อให้เจริญบนจานอาหาร บ่มจานอาหารที่ 30 °C เป็นเวลา 2-5 วัน ขึ้นกับชนิดเชื้อ ก่อนที่จะ Streak เชื้อทดสอบ(จากอาหารเหลว) อายุ 18-24 ชั่วโมง *(Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus,* Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, *Bacillus subtilis Escherichia coli,* และ *Candida albicans)* บ่มเชื้อต่อไปอีก 24---48 ชั่วโมง แล้วสังเกตผล บันทึกผลด้วยการวัดระยะของการยับยั้ง

3.5.2 การสกัดสารแอนติไบโอติกจากแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อ แอคติโนมัยซีท มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมที่มากกว่า 1 ชนิด เพื่อให้ได้ปริมาณสารมากขึ้น โดยบ่มในตู้บ่ม 30 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-7 วัน สกัดสารออกจากเซลล์และ medium ด้วย ethyl acetate/ หรือ solvent ที่เหมาะสมอื่น ๆ เก็บสารที่แห้งแล้วใน vial

3.5.3 การศึกษาองค์ประกอบของ สารสกัดรออกฤทธิ์ด้วยการทำ Bioautography Assay

นำสารสกัดหยาบที่ได้ มาละลายใน DMSO (Dimethyl Sulphoxide) แล้วนำมาแยกสารขั้นต้นด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้แผ่น Silia Gel Aluminium sheet (Silica Gel 60 F254) ตัดให้ได้ขนาดที่สามารถวางลงใน Petridish ได้ แยกสารด้วย solvent system ที่เหมาะสม โดยเริ่มจาก Chloroform: methanol 9:1 (หรือ 8:2/ 7:3 หรือ solvent system อื่น ๆ เป็นต้น) จนกว่าสารสกัดจะแยกได้ดี ผลการแยกสารทำได้โดยนำแผ่น chromatogram มาส่องดูด้วยแสง UV แล้วทำเครื่องหมาย Spot ของสารไว้ นำแผ่น chromatogram นี้มาวางบนจานอาหารที่ swab เชื้อทดสอบไว้แล้ว นำจานอาหารไว้ที่ 4 °C 2-4 ชั่วโมง แล้วค่อยนำมา บ่มที่ 32 °C 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์ยับยั้งเชื้อของสารแต่ละ component - เปรียบเทียบกับการยับยั้งของ Chromatogram ที่ได้จากสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่น ๆ ในเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดเดียวกัน

3.5.4 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อ Actinomycetes และ ราเอ็นโดไฟท์ที่สร้างสารได้ดี และน่าสนใจ จะนำมาศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบลักษณะเชื้อ เส้นสายสปอร์/ ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์/ และหรือ

ด้วยกล้องอิเลคตรอน และจำแนกชนิดด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลด้วยการหาลำดับเบส ของ 16S rRNA gene และ 28S rRNA gene ในแอคติโนมัยซีท และรา ตามลำดับ สกัด DNA ตามวิธีของการสกัดของชุดสกัด

สำหรับแอคติโนมัยซีทเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Polymerase chain reaction) แล้ว จึงทำ DNA ให้บริสุทธิ์ด้วย ชุดทำความบริสุทธิ์ DNA (DNA purification Kit) ตรวจสอบปริมาณของ DNA บนอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟริซิส และหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้โดยใช้เครื่อง ABI automated DNA sequencer แล้วเชื่อมต่อลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้ให้สมบูรณ์ และทำ sequence alignment ของยีน 16S rRNA แล้วจึงเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่มีใน GenBank เพื่อวิเคราะห์ว่าแอคติโนมัยซีท เป็นชนิดใด หรือจีนัสใด