บทที่ 2
วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างยางแผ่นของเกษตรกรที่อยู่ในช่วงตากระหว่างรออบหรือรอขาย และมีเชื้อราเจริญจำนวน 13 แห่ง จากจังหวัดต่าง ๆ ทางฝั่งทะเลตะวันออก และฝั่งทะเลตะวันตก โดยเก็บตัวอย่างยางแผ่นใส่ในถุงพลาสติก นำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อรา (ตามข้อ 4 และ 5) ในระหว่างการเก็บตัวอย่างทำการตรวจวัดสภาวะแวดล้อมบริเวณห้องตากหรือเก็บยางแผ่นดังนี้

1) ความชื้นสัมพัทธ์ โดยใช้เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์

2) อุณหภูมิ โดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิ

3) ความเร็วลม โดยใช้เครื่องวัดความเร็วลม

2. การวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่พบในบรรยากาศขณะตากหรือเก็บยางแผ่น

นำจานอาหารวุ้น PDA (Potato Dextrose Agar) ไปเปิดไว้ในบริเวณที่ทำการตากหรือเก็บแผ่นยาง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมายังห้องปฏิบัติการเพื่อบ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน แล้วทำการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อรา ตามข้อ 4 และ 5

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยางแผ่น

นำตัวอย่างอย่างยางแผ่นกลับมาห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

3.1 การวิเคราะห์ความชื้น โดยหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (AOAC, 1990)

3.2 การหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry method ดัดแปลงจาก ASTM D5712 นำตัวอย่างชิ้นยางชั่งน้ำหนัก 2-3 กรัม หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์ก แล้วอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเขย่าทุก 30 นาที ครั้งละ 1 นาที แยกส่วนใสโดยการปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปหาโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

3.3 การหาปริมาณน้ำตาล นำส่วนใสจากข้อ 2) ที่ได้มาทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Nelson-Somogyi method (Plummer, 1978) และหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol-sulfuric (Chaplin, 1986)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.4 การวัดค่าพีเอช (pH) ใช้กระดาษวัดพีเอช จุ่มน้ำกลั่นและนำมาแตะกับแผ่นยาง สังเกตการเปลี่ยนสีของกระดาษและนำมาเทียบสีที่ค่าพีเอชต่างๆ

4. การแยกเชื้อราจากตัวอย่างยางแผ่น

นำตัวอย่างยางแผ่นที่เก็บได้มาแยกเชื้อราโดยการตัดชิ้นส่วนยางแผ่นบริเวณที่มีราเจริญปนเปื้อน ด้วยใบมีดที่จุ่ม 95% แอลกอฮอล์ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ชั่งชิ้นยางแผ่นปริมาณ 10 กรัม ตัดตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กขนาด 3x5 มิลลิเมตร ใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อรามาทำการเจือจางเชื้อให้อยู่ในช่วง 10^{-2} ถึง 10^{-6} ดูดสารแขวนลอยด้วยปิเปต ที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารวุ้น PDA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานโดยวิธี spread plate บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน นับจำนวนโคโลนีเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation โดยใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา (hyphal tip) ประมาณ 1 มิลลิเมตร นำไปวางไว้บนอาหารวุ้น PDA จานใหม่ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2- 3 วัน ทำซ้ำจนได้เชื้อราบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5. การจำแนกชนิดของเชื้อรา

5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา นำเชื้อราที่แยกได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของโคโลนี (macroscopic morphology) โดยสังเกตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง เช่น ลักษณะของโคโลนี สี ขอบและขนาดของโคโลนี ลักษณะเส้นใย และระยะเวลาการเจริญ และศึกษาลักษณะทางจุลสัณฐาน (microscopic morphology) ศึกษาในระดับที่มองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วยการมีหรือไม่มีผนังกั้นของเส้นใย การมีสีหรือไม่มีสีของเส้นใย การมีหรือไม่มีการสร้างสปอร์ ลักษณะของสปอร์ตามหลักการของ Samson และคณะ (2004) และ Barnett และ Hunter (1998) นอกจากนี้ยังได้จัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่พบโดยใช้ API 20C AUX Kit

5.2 การจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล สำหรับเชื้อราที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้โดย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จะจำแนกโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล โดยสกัด DNA ของเชื้อราโดยใช้CTAB lysis บัฟเฟอร์ ตามวิธีดัดแปลงของ O'Donnell และคณะ (1997) แล้วเพิ่มปริมาณ 18S rRNA และ internal transcribed spacer regions (ITS1/ITS2) โดยใช้ universal primers คือ ITS1, ITS4 และ ITS5 โดยใช้

เทคนิค PCR แล้วตรวจสอบลักษณะและคุณภาพของลำดับเบส DNA โดยทำ BLAST search จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nim.nih.gov) แล้วเปรียบเทียบเป็นลำดับเบสของเชื้อราอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.05 (Hall, 2005)โดยส่งตัวอย่างตรวจหาลำดับเบส ณ หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยนำลำดับเบสของ DNA ของเชื้อราที่ต้องการจำแนกชนิด ไปเปรียบเทียบกับเชื้อราที่มีความสัมพันธ์อยู่ใกล้เคียงกัน ใช้โปรแกรม PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) กำหนดให้ช่องว่างในลำดับเบสเป็น missing data ทำให้ได้ Most Parimonius Trees (MPTs) แล้วเลือก MPTs ที่แสดงความสัมพันธ์ที่ดีที่สุด จากวิธีการทางสถิติ K-H test (Kishio and Hasegawa, 1989) แล้วนำมาพิจารณาร่วมกับวิธีวิเคราะห์แบบ Distance Neighbor Joining

6. การศึกษาผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อรา

ใช้เชื้อราที่แยกจากยางแผ่นจำนวน 20-30 ไอโซเลต ที่มีความแตกต่างกันและพบมากกว่า 1 แห่ง มาศึกษาต่อโดย

6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้น ทำการทดสอบผลของสารยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี hyphal extension-inhibition assay (Huynh, *et al.*, 1996) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 20 มิลลิเมตร เจาะวุ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และห่างจากขอบโคโลนีรา 5 มิลลิเมตร (Huang, *et al.*, 2000) โดยหยดสารยับยั้งเชื้อราเป็นสารเคมี 13 ชนิดที่นำมาทดสอบ ได้แก่ กรดอะซิติก, แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต, แคลเซียมโพรพิโอเนต, แคลเซียมไฮดรอกไซด์, โปแตสเซียมซอร์เบต, โปแตสเซียมเบนโซเอต, โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์, โซเดียมไนเตรต, โซเดียมอะซิเตต, น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่, น้ำส้มควันไม้จากไม้ยูคาลิปตัส และ น้ำส้มควันไม้จากไม้กระถิน และพาราไนโตรฟีนอล โดยความเข้มข้น ดังนี้ 1%, 5% และ 10% (w/v) สำหรับสารที่เป็นของแข็ง และ %(v/v) สำหรับสารที่เป็นของเหลว ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ชุดทดสอบควบคุมใช้น้ำกลั่น ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารยับยั้งเชื้อรา นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน สังเกตผลทุกวัน ถ้ามีรอยเว้าของโคโลนีของเชื้อรา แสดงว่าสารนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ บันทึกผลโดยให้ระดับคะแนนดังนี้

คะแนน +++ คือ รัศมีความกว้างของการยับยั้งเป็นรอยเว้าวงใสในช่วงมากกว่า 5.0 มิลลิเมตร

คะแนน ++ คือ รัศมีความกว้างของการยับยั้งเป็นรอยเว้าวงใส ในช่วง 3.5-5.0 มิลลิเมตร

คะแนน + คือ รัศมีความกว้างของการยับยั้งเป็นรอยเว้าวงใส ในช่วง 1.0-3.5 มิลลิเมตร

คะแนน ± คือ รัศมีความกว้างของการยับยั้งเป็นรอยเว้าวงใส ในช่วง 0-1.0 มิลลิเมตร

คะแนน - คือ ไม่พบรอยเว้าจากการยับยั้ง

6.2 การทดสอบหา minimal inhibitory concentration (MIC) นำสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับของวงใสที่กว้างที่สุด และสามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด จากวิธี hyphal extension-inhibition assay ดังการทดลองข้อ 6.1 มาทดสอบหาค่า MIC โดยดัดแปลงวิธี broth dilution จาก CLSI (CLSI/NCCLS, 2002) โดยทำการทดลองดังนี้ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารวุ้น PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บเชื้อราโดยการแขวนลอยสปอร์ในน้ำเกลือ 0.85% ผสมกับ 0.01% tween 80 ประมาณ 3 มิลลิลิตร ใช้เม็ดแก้ว (glass bead) ขนาด 0.3 เซนติเมตร เขย่าคนผสมเพื่อให้สปอร์กระจาย เก็บตัวอย่างด้วยพาสเจอร์ไปเปต (pasture pipette tip) โดยดูดเฉพาะส่วนบนและนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (vortex mixer) ประมาณ 15 วินาที ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (heamacytometer) เตรียมสปอร์ของเชื้อราตัวอย่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง $1x10^4$ ถึง $5x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร (Espinel-InGroff *et al.*,1996; Serrano *et al.*, 2002) นำสารยับยั้งมาเจือจางโดยวิธีเจือจางแบบ 2 เท่า (two-flod dilution) 10 ความเข้มข้น ด้วยอาหารเหลว RPMI 1640 ใน multiwell microdilution plates (96 U-shaped wells) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสปอร์ของเชื้อรา 100 ไมโครลิตรโดยมีชุดควบคุมดังนี้

- negative control เติมสปอร์เชื้อราแต่ไม่เติมสารยับยั้งเชื้อราในอาหาร
- positive control เติม amphotericin B ความเข้มข้นเริ่มต้น และสปอร์เชื้อรา
- medium control อาหารเพียงอย่างเดียว

ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และใช้สารพาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) เป็นสารเปรียบเทียบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจค่า MICs ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลค่า MIC โดยสังเกตการเจริญของเชื้อราภายใต้กล้องสเตอริโอ แล้วบันทึกผล

(-) หลุมที่ไม่มีการเจริญ

(+) หลุมที่มีการเจริญของเชื้อรา

การอ่านผลค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ให้ผลเป็น (-)

6.3 การทดสอบค่า minimal fungicidal concentration (MFC) ตรวจหาค่า MFC ที่เวลาสุดท้ายที่ 72 ชั่วโมง โดยดูดสารละลายในหลุมที่มีค่า MIC ต่ำที่สุด และ หลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารวุ้น PDA ทำการกระจายเชื้อโดยวิธีการ spread plate บ่มไว้

ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน และสังเกตการเจริญของเชื้อรา การอ่านผลค่า MFC คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารยับยั้งที่ไม่พบการเจริญของเชื้อรา

7. การศึกษาการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น

โดยเลือกเชื้อราที่พบได้บ่อยบนยางแผ่นและมีความคงทนต่อสารยับยั้งเชื้อรามาทดสอบจำนวน 3 เชื้อ

7.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา ตัดยางแผ่นให้มีขนาด 5x5 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นต่อกล่อง ฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าของยางแผ่นโดยการใช้แสง UV เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา $1x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนยางแผ่นแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิดังต่อไปนี้ 25, 37, 45 และ 65 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศ สังเกตผลการเจริญของเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

7.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเจริญของเชื้อรา การเตรียมยางแผ่นและการเพาะเชื้อทำเช่นเดียวกันกับข้อ 7.1 จากนั้นนำยางแผ่นที่เพาะเชื้อราแล้วบ่มไว้ในกล่องพลาสติกใสขนาด 1 ลิตรที่ความชื้นสัมพัทธ์ดังต่อไปนี้ 57%, 67%, 80% และ 90% ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ภายในกล่องโดยใช้สารละลายอิ่มตัวของเกลือชนิดต่าง ๆ (Rockland, 1960)(ภาคผนวก ก) ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 23 มิลลิลิตร ในภาชนะแก้วใสที่บรรจุภายในกล่อง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 25 37 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตผลการเจริญของเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

8. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราของสารเคมี

นำสารยับยั้งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากข้อ 6 จำนวน 3 ชนิด และใช้เชื้อราทดสอบจากข้อ 7 จำนวน 3 เชื้อที่พบอยู่เสมอบนยางแผ่นมาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราของสารยับยั้งเชื้อรา

8.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อยางแผ่น นำยางแผ่นดิบมาตัดให้มีขนาด 5x5 เซนติเมตร โดยใช้ยางแผ่นที่ทำการรีดเป็นยางแผ่นดิบใหม่ มาจุ่มสารยับยั้งเชื้อรา(จากการทดลองข้างต้นในข้อ 6) โดยใช้ความเข้มข้นเป็น 1, 2 และ 4 เท่าของ MIC ตากยางแผ่นให้แห้งเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเพาะเชื้อราโดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่ $1\text{-}5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยหยดลงบนชิ้นยางแผ่น เก็บชิ้นยางแผ่นไว้ในกล่องพลาสติกใส ความชื้นสัมพัทธ์ 79% และที่ความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศ บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

8.2 การศึกษาการเติมสารยับยั้งในน้ำยางสด ทำการทดลองที่ โรงงานทำยางแผ่นของเกษตรกรที่สหกรณ์ตำบลพิจิต โดยเติมสารยับยั้งที่ความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองข้อ 8.1 ผสมกับน้ำยางสดในขั้นตอนการตกตะกอนยาง จากนั้นนำยางที่ตกตะกอนแล้วไปรีดให้เป็นแผ่น (การทำยางแผ่นทำตามวิธีเดียวกับชาวบ้านผลิตยางแผ่นจากตะกง) ตากให้แห้งเป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นทำการเพาะเชื้อราและสังเกตผลตามวิธีในข้อ 8.1

8.3 Natural infection นำยางแผ่นดิบที่พึ่งรีดเป็นแผ่นของชาวบ้าน มาตัดให้มีขนาด 5x5 เซนติเมตร นำมาจุ่มกับสารยับยั้งตามข้อ 8.2 แต่ไม่เพาะเชื้อราบนยางแผ่น ปล่อยให้เชื้อราเจริญเอง สังเกตการเจริญของเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน และสังเกตการเจริญต่อไปที่ 15 วัน และ 30 วัน เปรียบเทียบกับยางแผ่นที่ไม่ได้จุ่มสารยับยั้ง

9. จำนวนซ้ำและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

- โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) การศึกษาทุกขั้นตอนในแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ
- ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีบนยางแผ่น วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ตามวิธีของ Duncan โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) Version 14.0