วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างของเชื้อราจากน้ำและปลาป่วย (Fungal sampling)

ทำการเก็บตัวอย่างของเชื้อรา จากไข่ปลา ปลา และน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาสวยงามทั้งจากฟาร์มเอกชน ร้านขายปลาตู้สวยงาม และหน่วยงานของรัฐในเขตภาคกลาง 4 จังหวัด ประกอบด้วย นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 8 จังหวัด ประกอบด้วย มหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ ยโสธร ร้อยเอ็ด อุบลราชธานี หนองคาย และนครราชสีมา โดยทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 6 ครั้ง (ต.ค., ธ.ค. 2549, ก.พ., เม.ย., มิ.ย. และ ส.ค. 2550)

2. การแยกเชื้อรา (Fungal isolation)

นำตัวอย่างของน้ำ และปลาที่ติดโรคจากเชื้อรามาทำการแยกเชื้อ โดยนำชิ้นเนื้อบริเวณที่ติดเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GY agar (Glucose–Yeast extract agar) ตามสูตรของ Hatai and Egusa (1977) ส่วนการแยกเชื้อราจากน้ำทำการเก็บตัวอย่างน้ำมาใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ แล้วใส่เมล็ด Hemp ลงไปเพื่อล่อให้ Zoospores มาเกาะ พร้อมทั้งเติมยาปฏิชีวนะลงไปเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อโคโลนีของเชื้อราเจริญขึ้นมา จึงทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Purification) ด้วยวิธี Single spore culture ตามวิธีของ Seymour (1970) (ภาพที่ 3) แล้วจึงทำการเก็บรักษาตัวอย่างโดยต่อเชื้อ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

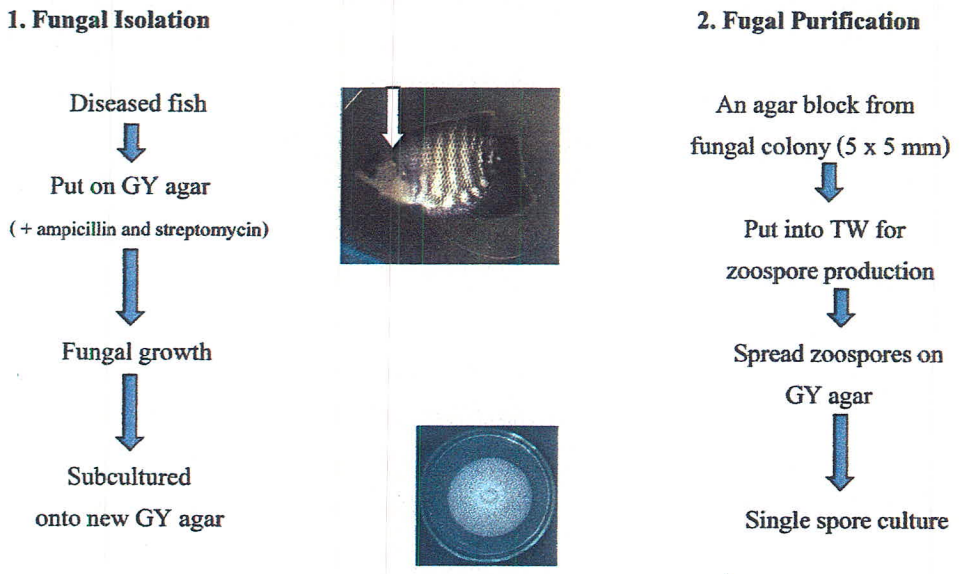
3. การจำแนกชนิดของเชื้อรา (Fungal identification)

การจำแนกชนิดของเชื้อรา จะทำการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) และลักษณะทางอณูชีววิทยา (Molecular characteristic)

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

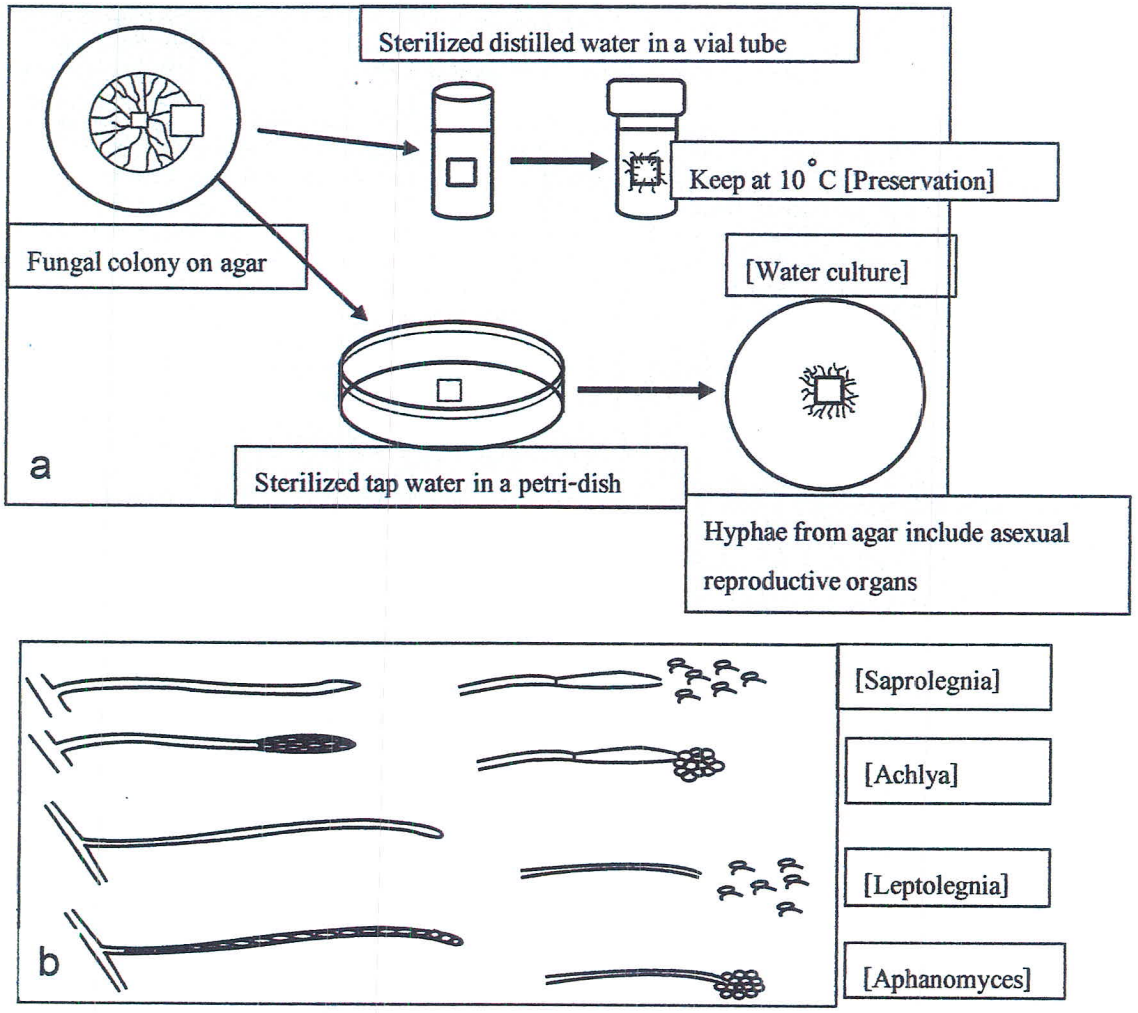
การศึกษาครั้งนี้จะทำการจำแนกชนิดของเชื้อรา จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) อันได้แก่ ลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น รูปแบบการสร้าง Zoosporangia และการปล่อย Zoospores และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เช่น เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Antheridia) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogonia และ Oospores) เป็นต้น

การจำแนกชนิดเชื้อราทำได้โดยการนำเชื้อราที่แยกได้นำมาทำการเลี้ยงในน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproductive organs) ได้แก่ ลักษณะการสร้าง Zoosporangia และวิธีการปล่อย Zoospores ของเชื้อราแต่ละชนิด โดยการตัดชิ้นอาหารเลี้ยง

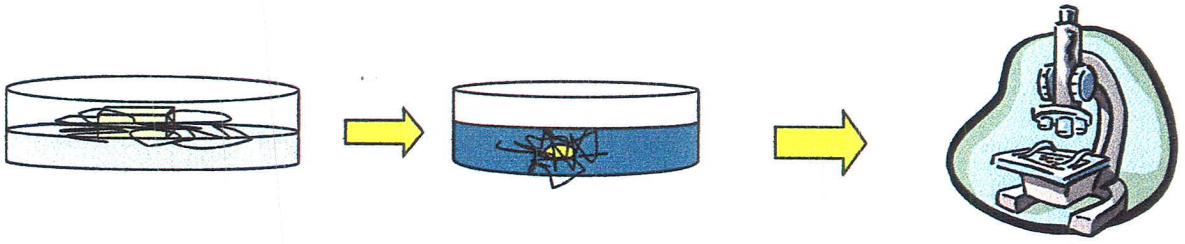


ภาพที่ 3 การแยกเชื้อราจากปลา และการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

เชื้อที่มีเชื้อราเจริญอยู่ขนาด 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร ใส่ลงใน 20 มิลลิเมตร ของ GY broth และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20-25°C ขึ้นกับสกุลของเชื้อรา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกเอาเฉพาะเส้นใยมาล้างในน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้ออยู่ 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20-25°C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง สังเกตรูปแบบการสร้าง Sporangium และการปล่อย Zoospores เพื่อจำแนกเชื้อราในระดับสกุล (Genus) (Seymour, 1970) (ภาพที่ 4) จากนั้นการทำการจำแนกในระดับชนิด (Spices) โดยการเหนี่ยวนำให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual organs reproduction) โดยการใส่เมล็ด Hemp ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันสูงลงน้ำประปาที่มี Zoospores อยู่ (Coker, 1923; Seymour,1970) แล้วเก็บไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อรอให้ Zoospores เข้าเกาะ จากนั้นนำเมล็ด Hemp นั้นไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 10, 15, 20 และ 25°C ตั้งแต่ 1 วัน หรือจนกว่าเชื้อราจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ภาพที่ 5) โดยในช่วงนี้สังเกตการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เกิดขึ้น และเก็บข้อมูลลักษณะต่างๆ เพื่อประกอบการจัดจำแนก อาทิ ขนาดและจำนวนของ Oogonia, Oocytes/Oogonium และลักษณะของ Mature oocytes และ Antheridia เป็นต้น แล้วทำการจำแนกตามวิธีของ Willoughby *et al.* (1983), Seymour (1970), Howard *et al.* (1970), Johnson (1956), Scott (1961), Khallil (2001), Rattan *et al.* (1978) และ Coker (1923) สำหรับสายพันธุ์ที่ไม่สามารถกระตุ้นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ในห้องปฏิบัติการจะจัดจำแนกถึงระดับสกุลเท่านั้น



ภาพที่ 4 (a) การเก็บรักษาเชื้อรา และการผลิต Zoospore (b) รูปแบบการสร้าง Zoospore ของเชื้อรา เพื่อจำแนกระดับสกุล



ภาพที่ 5 การศึกษา Sexual reproduction

3.2 ลักษณะทางอณูชีววิทยา (Molecular characteristic)

- การเตรียม DNA เพื่อเปรียบเทียบผลจากการจำแนกผลทางสัณฐานวิทยาในการทำการเปรียบเทียบผลจากการจำแนกผลทางสัณฐานวิทยามีวิธีการดังต่อไปนี้

1. ทำการสกัด Genomic DNA ของเชื้อรา ที่เลือกมาจากตัวแทนของเชื้อราแต่ละชนิด จำนวน 28 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) และเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank จำนวน 5 สายพันธุ์ มาใช้เป็น DNA อ้างอิง (ตารางที่ 2) ตามวิธีของ Phadee *et al.* (2004)

2. จากนั้นจะทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR และศึกษาลำดับ DNA ของเชื้อราที่สกัด DNA ไว้ เพื่อศึกษา ในส่วนของ Internal Transcribed Spacers (ITS1, 5-85 และ ITS2) ตามวิธีของ Phadee *et al.* (2004) หลังจากทำ PCR แล้วทำการหาลำดับ DNA โดยการทำ Sequence วิเคราะห์โดยใช้ Genetyx-Win version 3.1 เพื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แล้วสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ ClustalX v. 1.8 and PAUP 4.0b1 programme

4. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาบางประการของเชื้อรา

เลือกตัวแทนเชื้อราที่พบมากจากเชื้อรา 4 สกุล ได้แก่ *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia* และ *Leptolegnia* มาสกุลละ 5, 5, 5 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ มาทำการทดลองเพื่อศึกษาลักษณะทางชีววิทยา ดังนี้

4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40°C ตามลำดับ ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ สังเกตการณ์เจริญเติบโตของโคโลนี และทำการวัดขนาดทุกวัน จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1 เชื้อราที่นำมาหาลำดับ DNA และการสร้าง Phylogenetic tree ในการศึกษา

pecies	Strain	Host	Year	Location
. *Achlya* sp.	RMF 06003	ปลาบึก[1]	2006	กรุงเทพฯ
. *Achlya* sp.	RMF 07005	น้ำ	2007	นครปฐม
. *Achlya ambisexualis*	RMF 07009	ปลากระดี่นางฟ้า[2]	2007	ราชบุรี
. *Achlya bisexualis*	RMF 06026	กระดี่มุก[3]	2006	ราชบุรี
. *Achlya bisexualis*	RMF 06038	ปลาหางนกยูง[4]	2006	กาฬสินธุ์
. *Achlya diffusa*	RMF 06052	น้ำ	2006	นครราชสีมา
. *Aphanomyces* sp.	RMF 06016	น้ำ	2006	นครปฐม
. *Aphanomyces* sp.	RMF 07022	ไข่ปลาคาร์ป[5]	2007	มหาสารคาม
. *Aphanomyces laevis*	RMF 07019	น้ำ	2007	ขอนแก่น
). *Aphanomyces stellatus*	RMF 06079	ปลาทองริวกิ้น[6]	2006	อุบลราชธานี
l. *Dictyuchus* sp.	RMF 07024	น้ำ	2007	มหาสารคาม
2. *Leptolegnia* sp.	RMF 06032	ปลาหมอสี[7]	2006	ราชบุรี
3. *Leptolegnia* sp.	RMF 06063	น้ำ	2006	มหาสารคาม
4. *Leptolegnia* sp.	RMF 07018	ปลาเสือพ่นน้ำ[8]	2007	ขอนแก่น
5. *Saprolegnia anispora*	RMF 06002	ปลากะโห้[9]	2006	กรุงเทพฯ
6. *Saprolegnia anispora*	RMF 06011	น้ำ	2006	กรุงเทพฯ
7. *Saprolegnia anispora*	RMF 06019	น้ำ	2006	ปทุมธานี
8. *Saprolegnia anispora*	RMF 06027	ปลาตะเพียนทอง[10]	2006	ราชบุรี
9. *Saprolegnia anispora*	RMF 06028	ปลาบอลลูน[11]	2006	ราชบุรี
0. *Saprolegnia anispora*	RMF 06048	น้ำ	2006	ขอนแก่น
1. *Saprolegnia anispora*	RMF 06074	น้ำ	2006	หนองคาย
2. *Saprolegnia anispora*	RMF 07001	ปลาเสือดาว[12]	2007	กรุงเทพฯ
3. *Saprolegnia anispora*	RMF 07007	ปลาแป้น[13]	2007	ราชบุรี
4. *Saprolegnia anispora*	RMF 07021	ปลากราย[14]	2007	มหาสารคาม
5. *Saprolegnia diclina*	RMF 06030	ปลาเสือดาว	2006	ราชบุรี
6. *Saprolegnia eccentrica*	RMF 06013	บอลลูนแดง	2006	นครปฐม
7. *Saprolegnia ferax*	RMF 06039	ปลาบอลลูน	2006	กาฬสินธุ์
8. *Saprolegnia paradiclina*	RMF 06066	น้ำ	2006	ยโสธร

ชื่อวิทยาศาสตร์ของปลาที่แยกเชื้อรา: 1. *Pangasius gigas* 2. *Trichogaster microlepis*3. *Trichogaster leeri* 4. *Poecilia reticulate* 5. *Cyprinus carpio* 6. *Carasius auratuss* 7. *Amphilophus citrinellus* 8. *Toxotes jaculator* 9. *Catlocarpio siamensis* 10. *Barbus altus* 11. *Barbus conchonius* 12. *Scatophagus argus* 13. *Leiognathus equulus* 14. *Notopterus chitala*

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราในวงศ์ Oomycetes ที่นำมาใช้ในเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงสำหรับสร้าง Phylogenetic tree

	Species	Strain	Source	Location	Accession No.
1.	*Achlya prolifera*	NJM 9315	Shortnose gar	Japan	AY647196
2.	*Saprolegnia diclina*	ATCC 90215	Coho salmon	Japan	AY455775
3.	*Saprolegnia hypogyna*	ATCC 52721	Water	England	AY647189
4.	*Pythium splendens*	117	-	China	AY269993
5.	*Phytophthera sojae*	-	Plant	China	AY277278

4.2 การศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง GY ซึ่งมีความเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt ตามลำดับ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20°C ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ สังเกตการเจริญของโคโลนี และวัดขนาดของใยราทุกวัน จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

4.3 การศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อการเจริญของเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาการเลี้ยงเชื้อเหลว GY ซึ่งปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ โดยใช้ NaOH และ HCI เป็นสารละลายในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20°C ทำการทดลองชนิดละ 3 ซ้ำ สังเกตการณ์เจริญเติบโตของโคโลนี และวัดขนาดทุกวัน จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

5. การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา (Pathogenicity test)

5.1 การเตรียมปลาทดลอง

ทำการเลือกชนิดปลาเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรค โดยเลือกปลาที่ไวต่อเชื้อมากที่สุด (พบติดเชื้อราในธรรมชาติมากที่สุด) ได้แก่ ปลาบอลลูน *(Xiphophorus hellari)* ทำการทดสอบ

ความสามารถในการก่อโรคโดยวิธีการแช่ (Bath challenge) และปลาทอง (*Carasius auratus*) ทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรคโดยวิธีการฉีด (Injection challenge)

- นำปลาบอลลูนขนาดน้ำหนัก 0.8-1.0 กรัม ความยาว 30-36 มิลลิเมตร มาเลี้ยงรวมกันในตู้กระจกเพื่อปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง และให้อากาศตลอดเวลา

- นำปลาทองขนาดน้ำหนัก 8-10 กรัม ความยาว 45-60 มิลลิเมตร มาเลี้ยงรวมกันในตู้กระจกเพื่อปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง และให้อากาศตลอดเวลา

5.2 การเตรียม Zoospore เพื่อทำการทดสอบกับปลา

โดยทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราทั้ง 4 สกุล *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia* และ *Leptolegnia* ที่พบมากที่สุด โดยเลือกมาสกุลละ 5, 5, 5 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ ทำการเตรียม Zoospores ของเชื้อราแต่ละชนิดตามวิธีของ Hussein and Hatai (1999) จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย Zoospore โดยการกรองแยกน้ำด้วย Millipore filter papers ขนาด 0.45 μm แล้วนับจำนวน Zoospore ด้วย Haemocytometer

5.3 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราต่อปลาบอลลูนโดยวิธีการแช่

นำปลาบอลลูนมาทำการทดลองโดยแบ่งปลาทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มปลาปกติ (Intact) และกลุ่มที่ถูกทำให้เกิดบาดแผลด้วยการดึงเกล็ดด้านซ้ายใต้ครีบหลังบริเวณเส้นข้างตัว 3-4 เกล็ด (Injured) แล้วนำไปแช่ลงในน้ำที่มี Zoospore ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ประมาณ 10^2, 10^3, 10^4 และ 10^5 เซลล์ต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อรา ทำการทดลองกลุ่มละ 2 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว (Intact 5 ตัว และ Injured 5 ตัว) ที่อุณหภูมิ 25°C เพื่อทำให้ปลาเกิดความเครียด จากนั้นสังเกตอาการของปลาที่จนกระทั่งปลาป่วยแล้วนำปลาที่ป่วยมาทำการแยกเชื้อรา เพื่อตรวจสอบว่า เชื้อราที่แยกได้เป็นชนิดเดียวกับที่ทำการทดสอบหรือไม่ เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์

5.4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราต่อปลาทองโดยวิธีการฉีด

นำปลาทองมาทำการทดลองโดยฉีด Zoospore ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ประมาณ 10^2, 10^3, 10^4 และ 10^5 เซลล์ต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมฉีดน้ำที่ไม่มีเชื้อรา ทำการทดลองกลุ่มละ 2 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว โดยก่อนฉีดจะพักปลาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C หลังจากฉีดปลาแล้วนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15°C เพื่อทำให้ปลาเกิดความเครียด จากนั้นสังเกตอาการของปลาที่จนกระทั่งปลาป่วยแล้วนำปลาที่ป่วยมาทำการแยกเชื้อรา เพื่อตรวจสอบว่า เชื้อราที่แยกได้เป็นชนิดเดียวกับที่ทำการทดสอบหรือไม่ เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์

6. การศึกษาประสิทธิภาพของยาสารเคมี และสมุนไพรบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อรา

6.1 ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Fungistatic effect) ของสารเคมี จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ มาลาไคท์กรีน, ฟอร์มาลิน, ด่างทับทิม, เบนซัลโคเนียมคลอไรด์, กลูตารัลดีไฮด์, พาราฟอร์มัลดีไฮด์, โพวิโดนไอโอดีน, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, โซเดียมคลอไรด์, โซเดียมไฮโปคลอไรท์, Ceneole และ Pronopol (pyceze) ยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ คลอแรมฟีนิคอล, ออกโซลินิคแอซิด และออกซิเตตราไซคลิน และสมุนไพรไทย 7 ชนิดได้แก่ กระเทียม, ข่า, บอระเพ็ด, ฟ้าทะลายโจร, เสลดพังพอนตัวผู้, ใบฝรั่ง และพริกแดง เป็นต้น

6.2 การเตรียมสารเคมี ยาปฏิชีวนะ และสมุนไพร

6.2.1 การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทดสอบ นำสารเคมีทั้ง 12 ชนิด ได้แก่ มาลาไคท์กรีน, ฟอร์มาลิน, ด่างทับทิม, เบนซัลโคเนียมคลอไรด์, กลูตารัลดีไฮด์, พาราฟอร์มัลดีไฮด์, โพวิโดนไอโอดีน, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, โซเดียมคลอไรด์, โซเดียมไฮโปคลอไรท์, Ceneole และ Pronopol (pyceze) มาเตรียม Stock Solution โดยทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 500, 5,000, 500, 500, 1,000, 500, 500, 500, 1,000, 500, 500 ppm และ 7% จากนั้นนำ Stock Solution ที่เตรียมไว้มาเจือจางในน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบบ 2- Fold dilution ตามวิธีของ NCCLS (1991)

6.2.2 การเตรียมยาปฏิชีวนะ

การเตรียมยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ นำยาปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิดได้แก่ คลอแรมฟีนิคอล, ออกโซลินิคแอซิด และออกซิเตตราไซคลิน มาเตรียม Stock Solution โดยทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 5,000 ppm จากนั้นนำ Stock Solution ที่เตรียมไว้มาเจือจางในน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบบ 2- Fold dilution ตามวิธีของ NCCLS (1991) ให้มีความเข้มข้น 5,000, 2,500, 1,250, 650, 312.5, 156.25, 78.1, 39.1, 19.5 และ 9.8 ppm โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

6.2.3 การเตรียมสมุนไพร

การสกัดสมุนไพรทั้ง 7 ชนิดได้แก่ กระเทียม, ข่า, บอระเพ็ด, ฟ้าทะลายโจร, เสลดพังพอนตัวผู้, ใบฝรั่ง และพริกแดง ดัดแปลงจาก สุภาพร และรัตนา (2547) รวบรวมส่วนของสมุนไพรมาคัดแยกสิ่งแปลกปลอมออก นำส่วนที่จะใช้ ได้แก่ เหง้า หัว ลำต้นเหนือดิน และ ใบ มาล้างทำความสะอาด (หัวและเหง้าหั่นเป็นชิ้นบางๆ) อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วบดให้เป็นผง จากนั้น ชั่งผงสมุนไพรตัวอย่างละ 25 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% เป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วน 750 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น เขย่าที่อัตรา 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำ

สารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสารเหนียวเข้ม

การเตรียมสมุนไพรที่ใช้ทดสอบ นำสารสกัดสมุนไพรทั้ง 7 ชนิดได้แก่ กระเทียม, ข่า, บอระเพ็ด, ฟ้าทะลายโจร, เสลดพังพอนตัวผู้, ใบฝรั่ง และพริกแดง มาเตรียม Stock Solution โดยทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 5,000 ppm จากนั้นนำ Stock Solution ที่เตรียมไว้มาเจือจางในน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบบ 2- Fold dilution ตามวิธีของ NCCLS (1991) ให้มีความเข้มข้น 5,000, 2,500, 1,250, 650, 312.5, 156.25, 78.1, 39.1, 19.5 และ 9.8 ppm โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

6.3 ทำการทดสอบเชื้อราในรูปของใยรา โดยเตรียมใยราของเชื้อราที่เลือกไว้จากตัวแทนเชื้อราทั้ง 4 สกุล *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia* และ *Leptolegnia* ที่พบมากที่สุด โดยเลือกมาสกุลละ 5, 5, 5 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ มาลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่อาหารเหลว GY ที่ผสมสารเคมี ยา และสมุนไพรที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำการทดสอบโดยใช้ใยราที่ตัดจากอาหารแข็ง ด้วย Cork borer No. 2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 มิลลิเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีใยรามาแช่ในสารเคมี ยาปฏิชีวนะ และสมุนไพร ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ตารางที่ 12-13) แช่เป็นเวลา 30, 60 นาที 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วย้ายเชื้อราที่แช่ในสารต่างๆ ดังกล่าวมาเลี้ยงบน GY agar ที่อุณหภูมิ 25°C เพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อราหลังจากสัมผัสสารเคมีต่างๆ ดังกล่าว โดยการวัดความยาวของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันจนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อหรือจนกระทั่ง 2 สัปดาห์ เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารเคมีที่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อราในรูปเส้นใยได้