สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ศึกษาเก็บข้อมูลวิจัย

สำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคนบนเปลือกไม้จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ดังแสดงในภาพ 3 และตาราง 6 โดยทำการลอกเปลือกไม้ที่มีแทลลัสไลเคนเกาะอยู่ ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 เซ็นติเมตร ห่อด้วยกระดาษทิชชู ใส่ในถุงกระดาษ บันทึกรายละเอียดต่าง ๆ ได้แก่ พรรณไม้ ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล และสถานที่เก็บ จากนั้นนำตัวอย่างแทลลัสไลเคนมาตากที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จัดเก็บใส่ซองกระดาษและบันทึกรหัสในแต่ละตัวอย่าง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. Bell-Flo™ Spinner Flasks
2. Orbital Incubator shaker
3. stainless steel blades
4. TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F_{254} บริษัท Merck, Germany
5. กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ (compound microscope) Carl Zeiss รุ่น standard 20 บริษัท Carl Zeiss Co.,Ltd. Germany

6. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ-11 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
7. กล้องถ่ายรูป Canon PowerShot A640 , PowerShot G10 และ Nikon Coolpix P5100
8. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator)
9. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PT210 บริษัท Sartorius, Germany
10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG104 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
11. เครื่องกวนชนิดใช้แม่เหล็ก (Magnetic stirrer) และเตาไฟฟ้า (Hot plate) ของ Framo-Geratetechik รุ่น M 21/1
12. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-100 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japa
13. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก
14. ตู้ถ่ายเชื้อ
15. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
16. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
17. ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven)
18. พาราฟิล์ม บริษัท Lab M
19. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 0.5 McFarland Standard
2. Agar powder
3. Czapek' Dox Agar
4. Dichloromethane

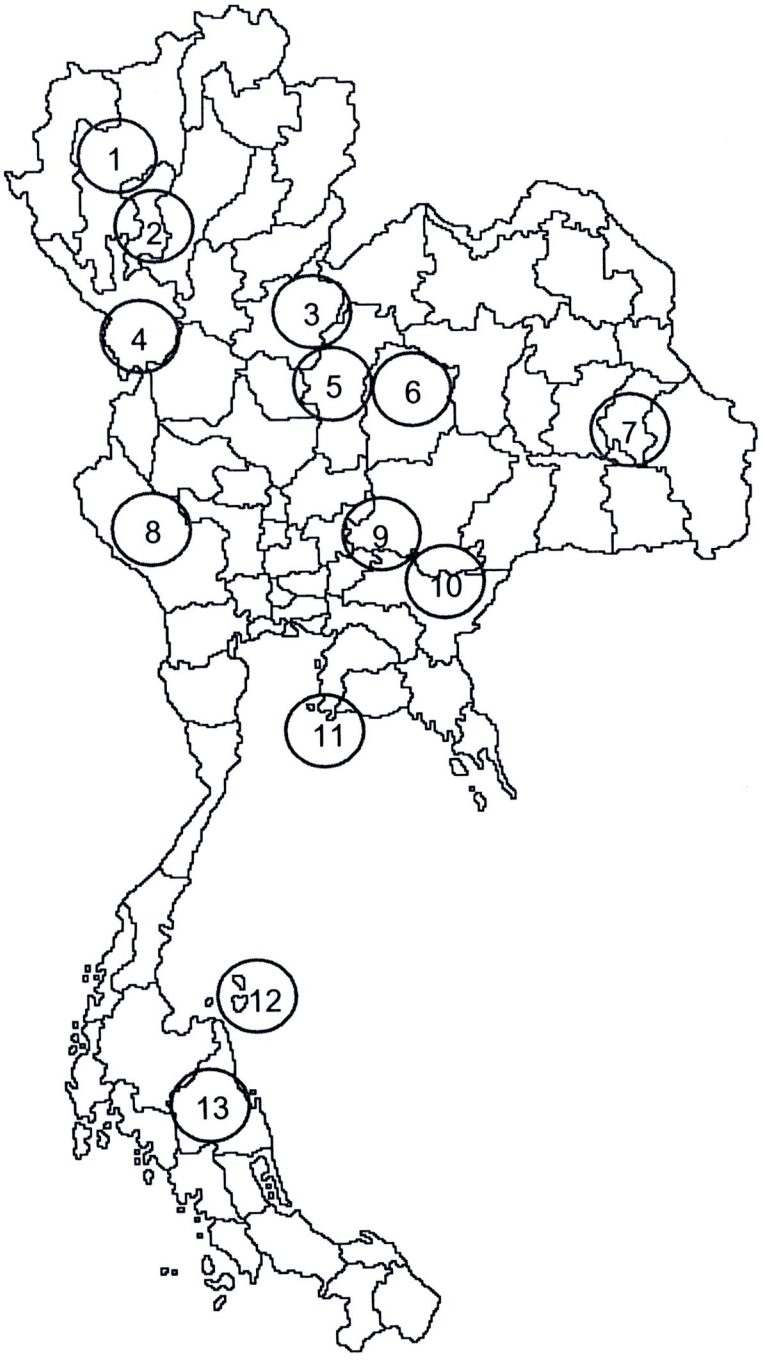
5. Ethanol
6. Ethyl acetate
7. Lilly & Barnett's Agar
8. Malt extract
9. Methanol
10. Mueller-Hinton Agar
11. Sabouraud 4% Glucose
12. Yeast extract

ตาราง 6

แหล่งที่มา จำนวนตัวอย่างไลเคนที่เก็บ และจำนวนที่แยกได้

แหล่งที่เก็บ	รหัส	สถานที่เก็บ	จำนวนทัลลัส	จำนวนไอโซเลต
1	CM 100 – 179	จ.เชียงใหม่	79	12
2	CP 1 – 18	จ.ชัยภูมิ	18	4
3	DKT 1 – 23	อช. ดอยขุนตาน จ.ลำพูน	23	8
4	HRK 1 – 191	อช. ภูหินร่องกล้า จ.พิษณุโลก	191	12
5	KJB 1 – 12	อช. น้ำตกไทรโยค จ.กาญจนบุรี	12	6
6	KL 1 – 3	อช. เขาหลวง จ.นครศรีธรรมราช	3	2
7	KSM 1 – 11	เกาะสมุย จ.สุราษฎร์ธานี	11	4
8	KY 240 – 531	อช. เขาใหญ่ จ.นครราชสีมา	291	35
9	PB 1 – 30	จ.เพชรบูรณ์	30	7
10	TK 1 – 7	จ.ตาก	7	3
11	TL 1- 20	อช. ทับลาน จ.ปราจีนบุรี	20	10
12	SMS 1 – 53	เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี	53	7
13	YS 1 – 9	จ.ยโสธร	9	6
รวม			747	116

หมายเหตุ: อช. = อุทยานแห่งชาติ



ภาพ 3 บริเวณแหล่งที่ใช้ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคนในจังหวัดต่าง ๆ

ที่มา. จากผู้วิจัย; 1. จ.เชียงใหม่ 2. จ. ลำพูน 3. จ. พิษณุโลก 4. จ.ตาก 5. จ.เพชรบูรณ์ 6. จ.ชัยภูมิ 7. จ.ยโสธร 8. จ.กาญจนบุรี 9. จ.นครราชสีมา 10. จ.ปราจีนบุรี 11. จ.ชลบุรี 12. จ.สุราษฎร์ธานี 13. จ.นครศรีธรรมราช

ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

การจัดจำแนกชนิดไลเคน

การจัดจำแนกไลเคนตามหลักอนุกรมวิธานนิยามใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสารเคมีเป็นหลักในการจัดจำแนกชนิดของไลเคน โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะหลักได้แก่ (Aptroot, 1991; Harris, 1984; Vongshewarat, 2000)

ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

การจัดจำแนกจะสังเกตจากลักษณะที่ปรากฏให้เห็นภายนอก เช่น ชนิดของรูปแบบการเจริญของไลเคน ลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สีสันและการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตของแทลลัส

สัณฐานวิทยาภายใน

โดยใช้วิธีการตัดตามขวาง (cross section) แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตลักษณะภายในของแทลลัส โครงสร้างสืบพันธุ์ และลักษณะแอสโคสปอร์ เช่น ชนิด สี ขนาด รูปร่าง จำนวนผนังกั้น และการเรียงตัวของผนังกั้นภายในแอสโคสปอร์ ซึ่งแอสโคสปอร์เป็นส่วนสำคัญในการจัดจำแนกชนิดของไลเคน

การทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี

การทดสอบสารเคมีในไลเคนเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนก โดยใช้วิธีการทดสอบสี (spot test หรือ color test) ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบในเบื้องต้น โดยการทดสอบปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีของแทลลัสไลเคนและโครงสร้างสืบพันธุ์ กับสารละลายชนิดต่าง ๆ เช่น 10% Potassium hydroxide (KOH), Sodium hypochlorite และ Paraphenyldiamine ถ้าผลเป็นบวกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี เป็นสีแดงหรือน้ำตาลเหลืองขึ้น แต่ถ้าเป็นผลลบจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ และการทดสอบด้วย Thin layer

chromatography (TLC) ซึ่งนิยมทดสอบกับระบบตัวทำละลายระบบต่าง ๆ เช่น toluene / dioxane / acetic acid (180 : 45 : 5) , toluene / acetic acid (170 : 30), toluene / ethyl acetate / formic acid (139 : 83 : 8) (Elix & Stocker-Wörgötter, 2008; Hale, 1979) และ dichloromethane / methanol (10 : 0.2)

การแยกเชื้อบริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน

แยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนจากตัวอย่างที่เก็บได้ โดยวิธี Ascospore discharge technique ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Yoshimura และคณะ (2002) โดยเริ่มจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Water Agar (WA) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ป้ายปิโตรเลียมเจลลี่ (petroleum jelly) ที่ฝาด้านบนชิดไปทางขอบด้านใดด้านหนึ่งของจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก นำตัวอย่างแทลลัสไลเคนมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร จำนวน 1-2 ชิ้น โดยเลือกตัดให้ครอบคลุมบริเวณที่มีโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ได้แก่ส่วนของ ascocarp จากนั้นนำชิ้นส่วนมาติดบนปิโตรเลียมเจลลี่ โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอยู่ด้านบน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สปอร์จะถูกปล่อยออกมาติดอยู่บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ตรวจหาสปอร์ที่ติดอยู่บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยใช้มีดผ่าตัด ตัดเฉพาะบริเวณที่มีสปอร์ ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Malt-Yeast Extract Agar (MYA) ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สปอร์มีการงอกเป็นเส้นใยและพัฒนาเป็นโคโลนี (Colony) ประมาณ 9 สัปดาห์

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของสารสกัดจากราที่ก่อให้เกิดไลเคน

เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้ โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์กเบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะลงบนโคโลนีของราที่ก่อให้เกิดไลเคน นำชิ้นโคโลนีราที่ก่อให้เกิดไลเคนจำนวน 1 ชิ้น วางลงบนชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ (polystyrene) ซึ่งลอยอยู่บนผิวของอาหารเหลว Malt-Yeast Extract Broth (MYB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะตั้งนิ่งที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์ นำราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่เลี้ยงไว้ในขวดรูปชมพู่ มากรองเพื่อแยกส่วนของน้ำเลี้ยง เก็บใส่ขวดแล้วนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying or Lyophilization) นำสารที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพด้วยวิธี Disc Diffusion Method โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบดังนี้

1. *Bacillus cereus* ATTC 11778
2. *Norcardia asteroids* DMST 2872
3. *Escherichia coli* ATTC 25922
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853
5. *Candida albicans* TISTR 5554

ราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ใช้ในการทดลอง

เลือกราที่ก่อให้เกิดไลเคน 8 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีเป็นตัวแทนในการทดลองนี้

1. *Arthopyrenia consobriana* (HRK 9)
2. *Arthonia myriocarpella* (HRK 134)
3. *Graphina albissima* (KJB 12)
4. *Ocellularia* sp. (KY 491)
5. *Phaeographina montagnii* (KY 406)
6. *Pyrenula kurzii* (SMS 11)
7. *Pyrenula* sp. (KJB 17)
8. *Trypethelium eluteriae* (KY 408)

การทดลองเพื่อศึกษาสารทุติยภูมิจากราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ

ขั้นตอนที่ 1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคน

ขั้นตอนที่ 1.1 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน การเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ Czapek' Dox (Cza), Lilly & Barnett's (LBA), Malt-Yeast Extract (MYA) และ Sabouraud 4% Glucose (SBA) ย้ายราที่ก่อให้เกิด ไลเคน โดยใช้ที่ตัดจุกคอร์กเบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะลงบนโคโลนีของราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้มีดผ่าตัดย้ายชิ้นโคโลนีมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้ง 4 ชนิด โดยวางลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ 1 ชิ้นต่อ 1 จาน (5 จานต่อ 1 ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ) เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 9 สัปดาห์

ขั้นตอนที่ 1.2 การสกัดสารทุติยภูมิ ใช้มีดผ่าตัดแยกส่วนของเส้นใยออกจากอาหารแข็ง ตัดตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แยกสกัดทั้งสองส่วนด้วยการแช่ในตัวทำละลายเมทานอล โดยใช้ปริมาตรเมทานอลต่อปริมาณตัวอย่างที่นำมาสกัดในอัตราส่วน 1:1 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (สกัดซ้ำจนไม่มีสารออกมา ทดสอบโดยการทำ Thin layer Chromatography : TLC) ระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายคราบสารสกัดด้วยสารละลายเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ในหลอดไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนที่ 2 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคน

ขั้นตอนที่ 2.1 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กตามวิธีในขั้นตอนที่ 1.1 นำราที่ก่อให้เกิดไลเคนมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt-Yeast Extract (MYA) 1 ชิ้นต่อ 1 จาน เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 27 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสัปดาห์ที่ 3, 6, 9, 15, 21 และ 27

ขั้นตอนที่ 2.2 การสกัดสารทุติยภูมิ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1.2

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาถึงผลของรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคน

ขั้นตอนที่ 3.1 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กตามวิธีในขั้นตอนที่ 1.1 นำราที่ก่อให้เกิดไลเคนมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt-Yeast Extract (MYA) 1 ชิ้นต่อ 1 จาน (ทำ 5 ซ้ำ) เลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 9 สัปดาห์ แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนคือ

1. การทดสอบด้วยรังสีอัลต้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยให้แสง 1 ครั้งต่อวันนาน 10 นาที
2. การทดสอบด้วยรังสีอัลต้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดยให้แสง1 ครั้งต่อวันนาน 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 3.2 การสกัดสารทุติยภูมิ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1.2

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาถึงสภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการเจริญของราที่ก่อให้เกิดไลเคน

ขั้นตอนที่ 4.1 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กตามวิธีในขั้นตอนที่ 1.1 นำราที่ก่อให้เกิดไลเคนมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt-Yeast Extract (MYA) ซึ่งได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ไว้ที่ 4, 7 และ 10 ตามลำดับ เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์

ขั้นตอนที่ 4.2 การสกัดสารทุติยภูมิ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1.2

ขั้นตอนที่ 5 การศึกษาผลของการเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสภาวะเขย่า

ขั้นตอนที่ 5.1 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กตามวิธีในขั้นตอนที่ 1.1 ย้ายชิ้นโคโลนีราที่ก่อให้เกิดไลเคนจำนวน 1 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว Malt-Yeast

Extract (MYB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์

ขั้นตอนที่ 5.2 การสกัดสารทุติยภูมิ นำราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่เลี้ยงไว้ในขวดรูปชมพู่ตามขั้นตอนที่ 5.1 มากรองแยกด้วยผ้าขาวบางหนา 4 ทบ ให้ได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยง ส่วนของเส้นใยใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1.2 ส่วนของน้ำเลี้ยงนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต สกัดซ้ำอย่างละ 3 ครั้ง (จนไม่มีสารออกมา ทดสอบโดยการทำ TLC) ระเหยเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง ละลายคราบสารสกัดด้วยสารละลายเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ในหลอดไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนที่ 6 การศึกษาผลของการเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสภาวะตั้งนิ่ง

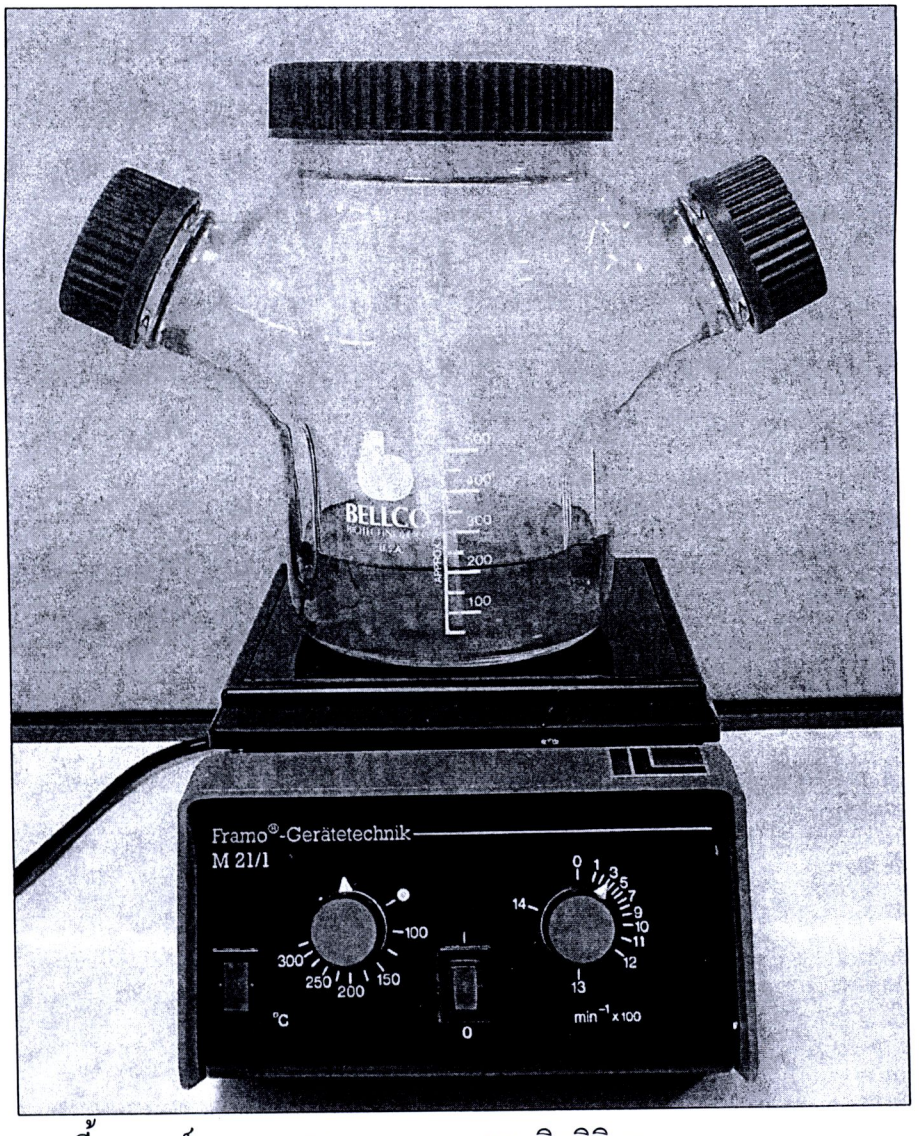
ขั้นตอนที่ 6.1 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กตามตามวิธีในขั้นตอนที่ 1.1 นำชิ้นโคโลนีราที่ก่อให้เกิดไลเคนจำนวน 1 ชิ้น วางลงบนชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ (polystyrene) ซึ่งลอยอยู่บนผิวของอาหารเหลวชนิด Malt-Yeast Extract (MYB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะตั้งนิ่งที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์

ขั้นตอนที่ 6.2 การสกัดสารทุติยภูมิ นำราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่เลี้ยงไว้ในขวดรูปชมพู่ตามขั้นตอนที่ 6.1 มากรองแยกด้วยผ้าขาวบาง แยกได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยง ส่วนของเส้นใยรานั้นนำมาแยกราที่ติดอยู่บนฟองน้ำออกมาโดยใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนที่เป็นเส้นใยโดยไม่ให้ฟองน้ำติดมาด้วย นำเส้นใยราที่แยกได้นี้ไปสกัดสารเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1.2 ส่วนของน้ำเลี้ยงราใช้วิธีการสกัดตามขั้นตอนที่ 5.2

ขั้นตอนที่ 7 การศึกษาผลของการเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสภาวะที่มีการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ขั้นตอนที่ 7.1 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กตามวิธีในขั้นตอนที่ 1.1 ย้ายชิ้นโคโลนีราที่ก่อให้เกิดไลเคนจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว Malt-Yeast Extract (MYB) ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในขวดเลี้ยงเซลล์ (Bell-Flo™ Spinner Flasks) ขนาด 1000 มิลลิลิตร เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่อุณภูมิห้องโดยมีการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 นาทีทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 9 สัปดาห์

ขั้นตอนที่ 7.2 การสกัดสารทุติยภูมิ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 5.2



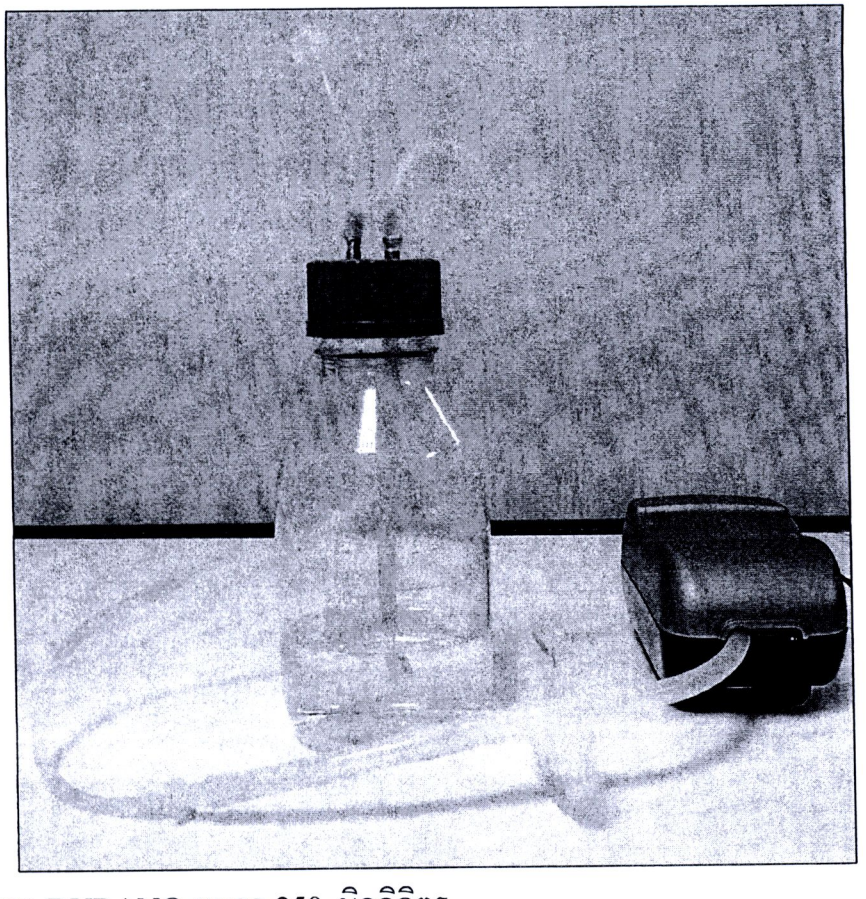
ภาพ 4 ขวดเลี้ยงเซลล์ Spinner Flasks ขนาด 500 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 8 การศึกษาผลของการเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจน

ขั้นตอนที่ 8.1 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในขวด Duran

การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กตามตามวิธีในขั้นตอนที่ 1.1 นำชิ้นโคโลนีราที่ก่อให้เกิดไลเคนจำนวน 1 ชิ้น วางลงบนชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ (polystyrene) ซึ่งลอยอยู่บนผิวของอาหารเหลว Malt-Yeast Extract Broth(MYB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวด Duran (DURAN® laboratory bottle with DIN thread, GL45) ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ปั๊มอากาศเป็นตัวให้ออกซิเจนโดยการต่อสายยางเข้าสู่ตัวขวด โดยมี membrane filter ขนาด 0.20 μm เป็นตัวกรองอากาศ เลี้ยงในสภาวะตั้งนิ่งที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 9 สัปดาห์

การสกัดสารทุติยภูมิ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 5.2

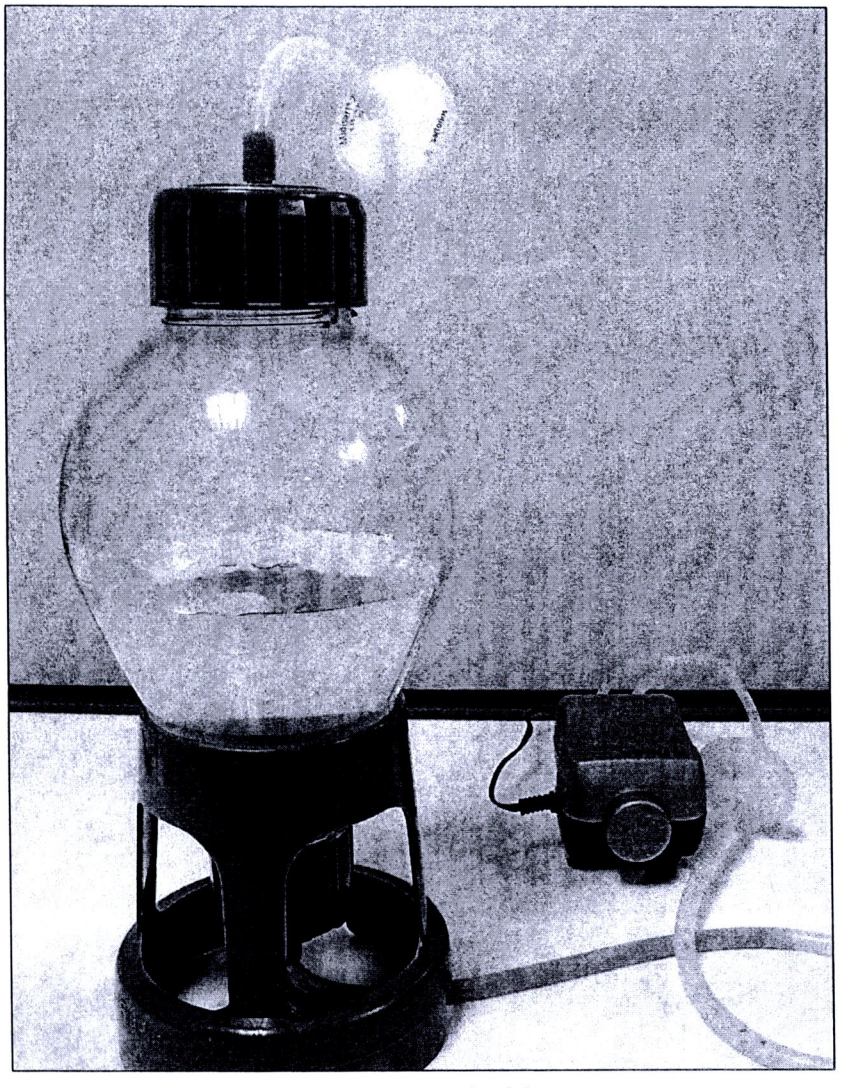


ภาพ 5 ขวด DURAN® ขนาด 250 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 8.2 การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนใน Air-lift bioreactor

การเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กเบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะลงบนโคโลนีของราที่ก่อให้เกิดไลเคน นำชิ้นโคโลนีราที่ก่อให้เกิดไลเคน จำนวน 5 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลว Malt-Yeast Extract Broth (MYB) ปริมาตร 500 มิลลิลิตรในถังหมัก Air-lift bioreactor (BioPia, BR-Bio20) ขนาด 1000 มิลลิลิตร ใช้ปั๊มอากาศเป็นตัวให้ออกซิเจนโดยการต่อสายยางเข้าสู่ถังหมักทางด้านล่าง โดยมี membrane filter ขนาด 0.20 μm เป็นตัวกรองอากาศ เลี้ยงที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์

การสกัดสารทุติยภูมิ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 5.2



ภาพ 6 ถังหมัก Air-lift bioreactor ขนาด 1000 มิลลิลิตร

การตรวจสอบสารทุติยภูมิเบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

(Thin layer Chromatography - - TLC)

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อที่ 1.2 , 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 6.2 และ 7.2 มาทดสอบสารด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยหยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปแยกองค์ประกอบด้วยระบบตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายสารทุติยภูมิ ตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC โดยการส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร จากนั้นทำการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร คำนวณหาค่า retention factor (Rf) และจัดทำข้อมูลของรูปแบบของสารทุติยภูมิที่แยกได้จากตัวแทนราที่ก่อให้เกิดไลเคนแต่ละกลุ่ม จากนั้นเก็บรักษาแผ่น TLC ในกล่องพลาสติก เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป