บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผลการศึกษา

อภิปรายผลการศึกษา

งานวิจัยที่ผ่านมามีการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนเลี้ยงในห้องปฏิบัติการแต่ยังมีการศึกษาในเรื่องนี้ไม่มาก Ahmadjian (1993); Crittenden (1995); Yamamoto (1995) ศึกษาส่วนประกอบทางกายวิภาค และสรีรวิทยาของไลเคน รวมทั้งศึกษาวิธีที่จะสังเคราะห์ไลเคนขึ้นมาใหม่ (resynthesis) จากราและสาหร่ายแต่ละชนิด และยังเป็นนักวิจัยกลุ่มแรก ๆ ที่ประสบความสำเร็จในการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคน แทลลัสไลเคนในสภาพธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดอาศัยหรือปะปนอยู่ เช่น ราเส้นใย (Petrini, 1990) แบคทีเรีย ยีสต์ และแมลง ดังนั้นการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนจึงไม่ควรแยกจากส่วนของแทลลัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ซึ่งมีความเสี่ยงสูงที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นจะเจริญออกมาก่อนราที่ก่อให้เกิดไลเคนเจริญ เนื่องจากราที่ก่อให้เกิดไลเคนเจริญค่อนข้างช้า ดังนั้นในการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนมักนิยมแยกจากแอสโคสปอร์ หากไม่ประสบความสำเร็จจึงจะใช้วิธีแยกจากแทลลัส (Ahmadjian, 1993) โดยปัจจัยสำคัญในการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนหลายชนิดในเขตร้อนเกี่ยวข้องกับการงอกของแอสโคสปอร์ ที่ค่อนข้างงอกยาก (Ostrofsky and Denison, 1980) ซึ่งสปอร์ของไลเคนชนิดครัสโตสจะมีอัตราการงอกที่สูงกว่าไลเคนชนิดโฟลิโอสและฟรุติโคส (Kofler, 1970) จากการเก็บตัวอย่างแทลลัสไลเคน 747 ตัวอย่าง จากแหล่งต่าง ๆ ใน 15 จังหวัด ของประเทศไทย สามารถแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนด้วยวิธีการปลดปล่อยแอสโคสปอร์และนำมาเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ 116 ไอโซเลต

การสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในห้องปฏิบัติการขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อและปัจจัยทางกายภาพเช่น อุณหภูมิ,

ออกซิเจน, ความแห้ง และ รังสีอัลตราไวโอเลต (Hamada, 1995, 1996; Stocker-Wörgötter & Elix, 2002; Yamamoto, 1996; Yamamoto, Kinoshita & Fujita, 1998) จากงานวิจัยของ Hamada (1995) ได้ศึกษาการเจริญของราที่ก่อให้เกิดไลเคน *Ramalina siliquosa* และสารทุติยภูมิที่ราสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt-Yeast Extract Agar ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสต่างกันคือ 4, 10, 20 และ 30% ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 เดือน พบว่า Salazinic acid จะพบใน *R. siliquosa* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสอยู่ 10 หรือ 20% เท่านั้นและอัตราการเจริญของราดังกล่าวจะสูงกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป จากรายงานของ Yamamoto (1996) สามารถแยกและหาโครงสร้างของสารสีที่ได้จากการเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน *Cladonia cristatella* ในอาหารเหลว Malt-Yeast Extract Broth (MYB) ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ได้สารชนิดใหม่ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ naphthazarin คือ cristazarin (3-ethyl-2-hydroxy-7-methoxynaphthazarin) และ 6-methylcristazarin ในขณะเดียวกันยังพบสาร depside และ barbartic acid ในการเลี้ยงรา *Cladonia cristatella* และ *Acarospora fuscata* ในอาหารเหลว MYB

เมื่อศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion จากน้ำเลี้ยง (broth) ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนจำนวน 116 ตัวอย่าง พบว่าสารจากราที่ก่อให้เกิดไลเคนส่วนมากสามารถแสดงผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ATTC 11778 , *Norcardia asteroides* DMST 2872 แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATTC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 และยีสต์ *Candida albicans* TISTR 5554 (Sanglarpcharonekit & Sangvichien, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Sangvichien (2005) ที่ทำการศึกษาราที่ก่อให้เกิดไลเคนในเขตร้อน และพบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนสามารถสร้างสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ และงานวิจัยนี้ยังพบอีกว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนบางสายพันธุ์สร้างสารที่แตกต่างออกไปจากไลเคนในธรรมชาติ

ราที่ก่อให้เกิดไลเคนเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด และเจริญได้ดีมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt-Yeast Extract (Crittenden et al., 1995; Sangvichien, 2005) ส่วนในรายงานของ Molina and Crespo (2000) แยกและเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน 5 สาย

พันธุ์คือ *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta*, *Diplotomma epipolium*, *Diplotomma rivasmartinezii* และ *Parmelia saxatilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 4% glucose LBM (Lilly & Barnett's) ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส ในที่มืด พบว่าราเหล่านี้เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4% glucose LBM ดังนั้นเมื่อทดลองเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ Czapek' Dox, Lilly & Barnett's, Malt-Yeast Extract และ Sabouraud 4% Glucose และนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบสารโดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 โดยปริมาตร พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt-Yeast Extract Agar และ Sabouraud 4% Glucose Agar ราที่ก่อให้เกิดไลเคนสร้างสารทุติยภูมิได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Hamada (1996) และ Hamada et al (1996) ที่พบว่า การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้ออินทรีย์ (organic medium) ที่มีการเพิ่มน้ำตาลซูโครสลงไปเป็นสิ่งจำเป็นในการเพิ่มการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคน Stocker-Wörgötter and Elix (2002) รายงานว่า ราที่ก่อให้เกิดไลเคน *Lobaria spathulata* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud 4% Sucrose Agar ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะสร้างสาร thelephoric acid หลังจากเลี้ยงเป็นเวลานาน 1 ปี

จากรายงานของ Sangvichien (2005) ระยะเวลาในการเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในเขตร้อนมีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิของราและราที่ก่อให้เกิดไลเคนมีการสร้างสารทุติยภูมิเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 9 ของการเลี้ยง เมื่อเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนทั้ง 8 ไอโซเลต ได้แก่ *A. consobriana* (HRK 9), *A. myriocarpella* (HRK 134), *G. albissima* (KJB 12), *T. eluteriae* (KY 408), *Ocellularia* sp. (KY 491), *P. montagnii* (KY 406), *P. kurzii* (SMS 11) และ *Pyrenula* sp. (KJB 17)บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt-Yeast Extract Agar ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 27 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนทุก 3 สัปดาห์มาสกัดและทดสอบด้วย TLC พบว่า *A. consobriana* (HRK 9), *G. albissima* (KJB 12), *T. eluteriae* (KY 408), *Ocellularia* sp. (KY 491), *P. montagnii* (KY 406) และ *Pyrenula* sp. (KJB 17) เริ่มสร้างสารตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนทุกไอโซเลตจะอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 9 - 15 ของการเลี้ยง หลังจากนั้นพบว่ามีสารบางจุดหายไปซึ่งสารที่สร้างขึ้นมาแล้วหายไปหรือมี

การเปลี่ยนสีอาจเป็นสารตัวกลาง (intermediates) ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ดังนั้นความสามารถในการสร้างสารของราที่ก่อให้เกิดไลเคนมีความแตกต่างกันไปตามอายุในการเจริญและชนิดของราที่ก่อให้เกิดไลเคนนั้นๆ

สารไลเคน (lichen substances) เช่น Atranorin, Parietin และ Usnic acid จะดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตและช่วยป้องกันสาหร่ายในไลเคนจากความเข้มแสงที่รุนแรง (Nybakken, 2004) จากการทดลองเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในที่มืด ที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เมื่อทดสอบด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ราที่ก่อให้เกิดไลเคน 6 จาก 8 ชนิดในการทดลองนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้โดยไม่ได้รับผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเลต ในขณะที่ *T. eluteriae* จะสร้างจุดสารได้มากขึ้นจาก 8 เพิ่มเป็น 13 จุดเมื่อมีการให้รังสีอัลตราไวโอเลต ส่วน *Ocellularia* sp. สร้างจุดสารได้น้อยลงจาก 11 ลดเหลือ 6 จุด ซึ่งผลการทดลองนี้แตกต่างไปจากงานของ Backor (2005) ซึ่งทดลองกับราที่ก่อให้เกิดไลเคน *Cladonia cristatella* โดยใช้ทั้งรังสีอัลตราไวโอเลตคลื่นสั้น 254 นาโนเมตรและรังสีอัลตราไวโอเลตคลื่นยาว 350 นาโนเมตร ให้แสงอัลตราไวโอเลตทุก 2 ชั่วโมง โดยมีระยะทางจากหลอดกำเนิดแสงถึงตัวอย่าง 20 เซนติเมตร พบว่ารังสีอัลตราไวโอเลตทั้งคลื่นสั้นและยาวจะลดการสร้างสาร formazan ใน *C. cristatella* ซึ่งผลที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการให้แสงอัลตราไวโอเลตที่ต่างกัน และแสงอัลตราไวโอเลตอาจผ่านจานเลี้ยงเชื้อที่เป็นพลาสติกได้แต่อาจเกิดการหักเหหรือลดความเข้มข้นลง อาจแก้ไขโดยเพิ่มระยะเวลาในการให้แสงอัลตราไวโอเลตเพิ่มมากขึ้นหรือลดระยะทางจากหลอดกำเนิดแสงถึงตัวอย่าง หรือเพิ่มความเข้มแสงมากขึ้นและอาจต้องใช้วิธีการให้แสงในตู้ปลอดเชื้อเพื่อให้แสงอัลตราไวโอเลตได้สัมผัสกับเส้นใยราได้โดยตรง

เมื่อเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt-Yeast Extract (MYA) ที่ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็น 4, 7 และ 10 ตามลำดับ ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคน 3 ชนิดได้แก่ *G. albissima*, *Pyrenula* sp. และ *T. eluteriae* สารที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็น 4, 7 และ 10 มีจำนวนจุดสารที่เท่ากันทั้งหมด ซึ่งการทดลองนี้ให้ผลที่แตกต่างไปจากงานของ Backor (2005) ที่เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน *C. cristatella* ใน Malt-Yeast

Extract Agar ที่ได้มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ไว้ที่ 5 (pH 5) ใช้เวลาในการเลี้ยง 5 สัปดาห์ แล้วย้ายชิ้นรามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Bold's Basal Medium (BBM) ซึ่งได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ไว้ที่ 1.5, 3 และ 5 ตามลำดับ เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสาร formazan พบว่า การสร้างสาร formazan จะลดลงอย่างมากที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 1.5 ในขณะที่รายงานของ Yoshimura et al. (1987) ได้ทำการแยกและเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนและสาหร่าย *Trebouxia excentrica* จากแทลลัสไลเคน *Cladonia vulcani* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt-Yeast Extract ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างไว้ที่ 2, 4, 5.5, 7 และ 9 เก็บตัวอย่างและชั่งน้ำหนักทุก 4 สัปดาห์ พบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนและสาหร่าย *Trebouxia excentrica* จะเจริญได้ดีที่สุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างไว้ที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับ *C. vulcani* ในธรรมชาติที่เจริญอยู่บนดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 5.5

Yamamoto et al. (1998) ศึกษาการเจริญและการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคน 150 ชนิด ในอาหารเหลว Malt-Yeast Extract Broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 300 มิลลิลิตร ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 4 สัปดาห์ พบว่า มีราที่ก่อให้เกิดไลเคนเพียงแค่ 30 ชนิดเท่านั้นที่เจริญได้ดี ส่วนมากจะมีลักษณะเป็นก้อนเนื้อสีชาจนถึงดำ ราที่ก่อให้เกิดไลเคนเมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมักสร้างสี (pigments) ออกมามากต่างไปจากธรรมชาติ เนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป สีที่สร้างออกมานี้เป็นส่วนผสมของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) กับสารประกอบอื่นซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์และเป็นพิษกับเซลล์ (Cytoxic) จากรายงานที่ได้กล่าวมานี้เป็นไปได้ว่าในสภาวะที่มีการเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้ออาจไม่ใช่สภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมของราที่ก่อให้เกิดไลเคน จึงได้ทำการเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน 8 ชนิดได้แก่ *A. consobriana* (HRK 9), *A. myriocarpella* (HRK 134), *G. albissima* (KJB 12), *T. eluteriae* (KY 408), *Ocellularia* sp. (KY 491), *P. montagnii* (KY 406), *P. kurzii* (SMS 11) และ *Pyrenula* sp. (KJB 17)ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt-Yeast Extract Broth ที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์โดยใช้สภาวะในการเลี้ยงที่ต่างกัน 3 แบบคือ (1) การเลี้ยงแบบตั้งนิ่งบนชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์โดยมีการเขย่าเป็นครั้งๆ (2) การเลี้ยงเชื้อโดยมีการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็นเวลา 15 นาทีทุก ๆ 3 ชั่วโมง และ (3) การเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคน *A. myriocarpella* (HRK 134), *G. albissima* (KJB 12), *T. eluteriae* (KY 408), *P. montagnii* (KY 406), *P. kurzii* (SMS 11) สร้างสารทุติยภูมิได้มากที่สุดในสภาวะการเลี้ยงแบบตั้งนิ่งซึ่งสอดคล้องกับงานของ Sangvichien (2005) ที่พบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแบบตั้งนิ่งบนชิ้นฟองน้ำ สังเคราะห์และสารที่พบในราที่ก่อให้เกิดไลเคนเมื่อเทียบกับในแทลลัสไลเคนมีทั้งที่เหมือนและต่างกัน

ราที่ก่อให้เกิดไลเคน *G. albissima* (KJB 12) เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจน (1) การเลี้ยงในขวด DURAN® ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt-Yeast Extract Broth (MYB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้ปั๊มอากาศเป็นตัวให้ออกซิเจน เลี้ยงในสภาวะตั้งนิ่งที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าหลังจากถ่ายเชื้อได้ 3 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มแห้งและลดปริมาตรลงอย่างรวดเร็วและแห้งลงจนเกือบหมดภายในเวลา 5 วัน จึงไม่สามารถสกัดสารจากราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ เนื่องจากระบบการควบคุมอากาศเข้าออกยังไม่เหมาะสม ควรต้องมีการใช้ flow meter ในการควบคุมอากาศที่เข้าสู่ขวดเลี้ยง (2) การเลี้ยงใน Air-lift bioreactor ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt-Yeast Extract Broth (MYB) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บรรจุลง Air-lift bioreactor ขนาด 1000 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น (contaminate) เกิดขึ้นภายใน 10 วันหลังจากถ่ายเชื้อ เมื่อลองทำซ้ำอีกหลายครั้งก็ได้ผลเช่นเดิม สาเหตุที่มีการปนเปื้อน อาจเกิดจากตัวกรอง (filter) ของถังหมักไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จุดเชื่อมต่อต่างๆและฝาปิดอาจไม่เหมาะกับรูปแบบการเลี้ยงนี้

ขั้นตอนหลังจากตรวจสอบสารทุติยภูมิเบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี คือการนำสารสกัดจากราที่ก่อให้เกิดไลเคนไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วย Nuclear Magnetic Resonance (NMR) จากผล NMR พบว่า ราที่ก่อให้เกิดไลเคน *T. eluteriae* (KY408) แยกได้สารบริสุทธิ์ 5 สาร มีค่า Rf ดังนี้ 0.40, 0.62, 0.67, 0.72 และ 0.97 และคาดว่าจุดสารที่ค่า Rf ที่ 0.67 จะเป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่มของสารประกอบ

Quinone ส่วนสารสกัดจากราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่เหลืออยู่ในระหว่างการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี

สรุปผลการศึกษา

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์จากน้ำเลี้ยง (culture broth)ของราที่ก่อให้เกิดไลเคน 116 ตัวอย่าง พบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ *Candida albicans*

คัดเลือกราที่ให้ผลในการต้านจุลินทรีย์ได้ดี 8 ชนิดได้แก่ *A. consobriana* (HRK 9), *A. myriocarpella* (HRK 134), *G. albissima* (KJB 12), *T. eluteriae* (KY 408), *Ocellularia* sp. (KY 491), *P. montagnii* (KY 406), *P. kurzii* (SMS 11) และ *Pyrenula* sp. (KJB 17) มาศึกษาต่อโดยมีความแตกต่างกันตามสภาวะแวดล้อมดังนี้

1. เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ Czapek' Dox, Lilly & Barnett's , Malt-Yeast Extract และ Sabouraud 4% Glucose นาน 9 สัปดาห์ แล้วนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบสารด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 โดยปริมาตร พบว่า *A. consobriana*, *A. myriocarpella* และ *G. albissima* สร้างสารทุติยภูมิได้มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt-Yeast Extract Agar (MYA) ในขณะที่ *Ocellularia* sp., *P. kurzii* และ *Pyrenula* sp. สร้างสารทุติยภูมิได้มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sabouraud 4% Glucose Agar (SBA) ส่วน *T. eluteriae* และ *P. montagnii* สร้างสารทุติยภูมิได้มากทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MYA และ SBA

2. เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MYA ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 27 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนทุก 3 สัปดาห์มาสกัดและทดสอบด้วย TLC พบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนจะเริ่มสร้างสารทุติยภูมิได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 และช่วงเวลาที่สร้างสารได้มากที่สุดอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 9 – 15 ของการเลี้ยง

3. ผลของรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อการสร้างสารทุติยภูมิ เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในที่มืด ทดสอบด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร พบว่า รา 6 จาก 8 ชนิดในการทดลองนี้สามารถสร้างสารได้โดยไม่ได้รับผลกระทบจาก

รังสี ส่วน *T. eluteriae* สร้างจุดสารได้มากขึ้นจาก 8 เพิ่มเป็น 13 จุดเมื่อมีการให้รังสีในขณะที่ *Ocellularia* sp. สร้างจุดสารได้น้อยลงจาก 11 ลดเหลือ 6 จุด

4. เมื่อเลี้ยงรา *G. albissima*, *Pyrenula sp.* และ *T. eluteriae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt-Yeast Extract (MYA) ที่ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็น 4, 7 และ 10 ตามลำดับ พบว่าสารที่ราที่ก่อให้เกิดไลเคนทั้ง 3 ชนิด สร้างขึ้นมามีจำนวนจุดสารที่เท่ากันทั้งหมด

5. เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt-Yeast Extract Broth ที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 9 สัปดาห์โดยใช้สภาวะในการเลี้ยงที่ต่างกัน 3 แบบได้แก่ (1) การเลี้ยงแบบตั้งนิ่งบนชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ (2) การเลี้ยงเชื้อโดยมีการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 นาทีทุกๆ 3 ชั่วโมง และ (3) การเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนสร้างสารทุติยภูมิได้มากที่สุดในสภาวะการเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง

6. เลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt-Yeast Extract Broth (MYB) ในสภาวะที่มีการให้อากาศ (1) ในขวด DURAN® ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะตั้งนิ่ง หลังจากถ่ายเชื้อได้ 3 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มแห้งและลดปริมาตรลงอย่างรวดเร็วและแห้งลงจนเกือบหมดภายในเวลา 5 วัน จึงไม่สามารถสกัดสารไปทดสอบได้ (2) การเลี้ยงใน Air-lift bioreactor ขนาด 1000 มิลลิลิตร พบว่ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น (contaminate) เกิดขึ้น เมื่อลองทำซ้ำอีกหลายครั้งก็ได้ผลเช่นเดิม สาเหตุที่มีการปนเปื้อน อาจเกิดจากตัวกรอง (filter)ของถังหมักไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จุดเชื่อมต่อต่างๆและฝาปิดอาจไม่เหมาะกับรูปแบบการเลี้ยงนี้

7. สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนแต่ละชนิดมีดังนี้ (1) *A. consobriana* สร้างสารได้มากที่สุดในสภาวะที่มีการกวนอาหาร (2) *A. myriocarpella* สร้างสารได้มากทั้งในอาหารชนิด MYA และในการเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง (3) *G. albissima* สร้างสารได้มากใน MYA ทั้งในการเลี้ยงแบบตั้งนิ่งและเขย่า (4) *Pyrenula* sp. สร้างสารได้มากในอาหาร Cza, SAB และในสภาวะที่มีการกวนอาหาร (5) *P. montagnii* และ *T. eluteriae* สร้างสารได้มากทั้งในการเลี้ยงแบบตั้งนิ่งและเขย่า (6) *Ocellularia* sp. สร้างสารได้มากในการเลี้ยงแบบเขย่าและกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ

(7) *P. kurzii* สร้างสารได้มากที่สุดในการเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง (8) ราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุล *Pyrenula* ในการทดลองนี้ นั่นคือ *Pyrenula* sp. และ *P. kurzii* สร้างสารได้มากที่สุดในอาหาร SBA

8. ราที่ก่อให้เกิดไลเคน 8 ชนิดในการทดลองนี้สร้างสารทุติยภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้มากกว่าในอาหารแข็ง

ภาคผนวก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Czapek's Dox agar (Cza)

K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H2O$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Sucrose	30	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร

อาหารสูตรนี้เหมาะสำหรับการเจริญของเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus* และ *Penicillium*

2. Lilly & Barnett's agar (Lilly and Barnett 1951)

Glucose	10	กรัม
Asparagine	2	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7\ H_2O$	0.5	กรัม
$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	0.2	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7\ H_2O$	0.2	มิลลิกรัม
$MnSO_4.4\ H_2O$	0.1	มิลลิกรัม
Thaiamine	0.1	มิลลิกรัม
Biotin	5	ไมโครกรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้ละลายจนหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Malt-Yeast Extract Agar (MYA) (Ahmadjian, 1961)

สารสกัดจากมอลท์ (malt extract)	20.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้ละลายจนหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Mueller-Hinton Agar

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	2.0	กรัม
เคซีน (Acid Hydrolysate of Cascin)	17.5	กรัม
แป้ง (starch)	1.5	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้ละลายจนหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Nutrient Agar

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม

น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้ละลายจนหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่งปอกเปลือกแล้ว	200	กรัม
Dextrose (หรือ sucrose)	20	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยตัดมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. ต้มกับน้ำ 500 มล. จนสุก กรองเอาน้ำมันฝรั่งด้วยผ้าขาวบาง เติม Dextrose ลงไปในน้ำมันฝรั่ง คนให้ Dextrose ละลายจากนั้นหลอมละลายวุ้นโดยต้มในน้ำที่เหลือ นำสารละลายทั้งสองรวมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล. อาหารชนิดนี้เหมาะกับการเลี้ยงเชื้อราต่าง ๆเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรคพืช

7. Sabouraud 4% Glucose agar

Polypeptone (casaminoacids)	10	กรัม
Glucose	40	กรัม
วุ้น	18	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้ละลายจนหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Water Agar

วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้ละลายจนหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. 0.5 McFarland Standard

$BaCl_3.2H_2O$	1.175	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย $BaCl_3.2H_2O$ 1.175 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลาย $BaCl_3.2H_2O$ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย 1% H_2SO_4 ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร จะได้สารแขวนลอยที่มีลักษณะขุ่น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน