

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อควบคุมเชื้อราโรคพืช

UTILIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM BLUE-GREEN
ALGAE TO CONTROL PHYTOPATHOGENIC FUNGI



นางสาวพัชรี ผดุงวงศ์

MISS PATCHAREE PADUNGWONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

เลขหมู่.....สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขทะเบียน.....28853

พ.ศ. 2540

วัน, เดือน, ปี.....๒7 พ.ย. 2540

ISBN 974-621-908-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**UTILIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM BLUE-GREEN ALGAE
TO CONTROL PHYTOPATHOGENIC FUNGI**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE
MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

1997

ISBN 974-621-908-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแถม น้ำเงินเพื่อควบคุมเชื้อราโรครีซ
นักศึกษา	นางสาวพัชรี ผดุงวงศ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. อาภารัตน์ มหาจันทร์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. เตือนใจ บุญ-หลง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ
ระดับการศึกษา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ	2540

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้นำสาหร่ายสีเขียวแถมน้ำเงินจำนวน 11 สกุล 165 สายพันธุ์ มาแยกและคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแถมน้ำเงิน ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อราโรครีซ 6 ชนิด โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาทดสอบกับเชื้อราด้วยวิธี paper disc พบว่าสาหร่ายที่ยับยั้งเชื้อรา มี 8 สกุล โดยสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *Macrophomina phaseolina* สาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียว เชื้อรา *Colletotrichum truncatum*, *Bipolaris maydis* และ *Fusarium oxysporum* ได้ดีที่สุด เมื่อนำสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร BGA ดัดแปลงที่เหมาะสม โดยการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้น 7 บ่มที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร ให้อาหารผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิของแสง 60 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ พบว่าสาหร่ายมีมวลชีวภาพ 3 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักสด 1 กรัมเซลล์ต่อลิตร ให้สารสกัด 28.67 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับสารมาตรฐานของ cycloheximide พบว่าสารสกัด 100 มิลลิกรัม มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 1.8 มิลลิกรัม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ไม่เสถียรเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 70 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที และมีความเสถียรที่พีเอช 6 ถึง 7

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และจากการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินแลเตอร์โครมาโทกราฟี พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนคือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 7:3:1 ตำแหน่งของสารอยู่ที่ค่า R_f 0.55 และ 0.65 และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับ ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch's test, anthron test, unsaturation test รวมทั้งการทดสอบด้วยเอนไซม์โปรติเอส จึงสันนิษฐานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีลักษณะเป็นโมเลกุลใหญ่ที่มีโครงสร้างสลับซับซ้อน

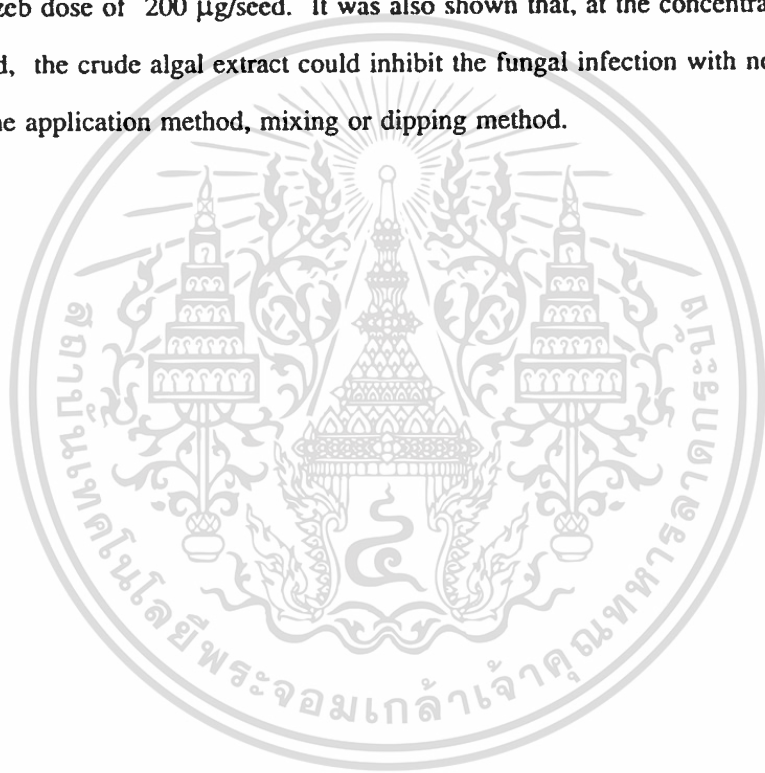
การศึกษารูปแบบการใช้สารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ซึ่งทำการทดลองในงานเพาะเชื้อ พบว่าสารสกัดละลายในเมทานอลผสมสารลดแรงตึงผิว เป็นรูปแบบที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ติดเชืบบนถั่วเขียว และความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ในระดับเดียวกับการใช้สารเคมี mancozeb ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และเมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ติดเชืบบนถั่วเขียว โดยทำการทดลองในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า ด้วยวิธีผสมสารละลายเชื้อราลงในดินโดยตรง (mixing method) และ วิธีเคลือบสารละลายเชื้อราลงบนเมล็ด (dipping method) พบว่าค่าการติดเชื้อราของถั่วเขียวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Thesis Title	Utilization of bioactive compounds from blue-green algae to control phytopathogenic fungi
Student	Miss Patcharee Padungwong
Thesis Advisor	Dr. Aparat Mahakhant
Thesis Co-advisor	Dr. Tuanchai Boon-long Assistant Professor Oratai Sukcharoen
Level of study	Master of Science Biotechnology
Department	Applied Biology Faculty of Science King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Year	1997

Abstract

Each 20 μ l of 1,000 μ g/disc of extracts from 11 genera 165 isolates of nitrogen fixing blue-green algae (BGA) was applied on paper disc to screen for the antifungal activities against 6 isolates of plant pathogenic fungi. The activities were shown in 8 isolates. *Calothrix* sp. TISTR 8906 was chosen for further study due to its highest inhibition activity against *Macrophomina phaseolina*, the mung bean pathogen causing mung bean charcoal rot disease, *Colletotrichum truncatum*, *Bipolaris maydis* and *Fusarium oxysporum*. *Calothrix* sp. TISTR 8906 incubated at $29 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18 days in a 10-L carboy containing modified BGA medium by the addition of NaNO_3 1.5 g/l, an increase of K_2HPO_4 to 1.5 g/l. The reduction of NaCl concentration to 0.03 g/l, with the initial pH of 7.0. The cultures were sparged with 5% CO_2 in air at flow rate of ca. 1,000 ml/min under the light intensity of $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$. The biomass obtained was 3 g/l, and 1 g of fresh cells/l (medium) gave 28.67 mg/l (medium) of the extract. The specific activity of crude extract 100 mg was equivalent to 1.8 mg-cycloheximide. The bioactive compounds was stable when treated at 50°C for 2 h, stable at pH 6-7 at 4°C for 24 h and unstable at 70 and 100°C for 90 min. Purification of bioactive compounds by silica gel thin layer chromatography showed the bioactive compounds by two spot with R_f value of 0.55 and 0.65 with chloroform : methanol : H_2O (7:3:1)

as the solvent system. The negative result from ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch's test, anthrone test, unsaturation test and protease inhibition indicated that these bioactive compounds should be a big molecule with a complicate chemical structure. The effect of algal extract on the infection of *M. phaseolina* on mung bean seeds (in petridish) by crude algal extract from *Calothrix* sp. TISTR 8906, formulated with surfactant at the concentration of 250 µg/seed and over, could inhibit the growth of *M. phaseolina*. Moreover, at the concentration of 500 µg/seed, the algal extract showed the same efficiency on inhibition of *M. phaseolina* as that of the fungicide, mancozeb dose of 200 µg/seed. It was also shown that, at the concentration of 250 µg/seed, the crude algal extract could inhibit the fungal infection with no significant from the application method, mixing or dipping method.



IV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. อาภารัตน์ มหาจันทร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ดร. เตือนใจ บุญ-หลง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ กรรมการที่ปรึกษา ซึ่งกรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือต่องานนี้ด้วยดี และ รองศาสตราจารย์ ดร. คุณณี ธนะบริพัฒน์ กรรมการบัณฑิตศึกษา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำแก้ไขเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. อมรา สนิมทอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นवलพรรณ ณ ระนอง อีกทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและแนะนำในการศึกษาตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์และฝ่ายวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณกองโรคพิษและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่เอื้อเฟื้อเชื้อราโรคพิษ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณสถานีทดลองพืชไร่ อ. ศรีสำโรง จ. สุโขทัย ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้องๆ ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ได้ช่วยเหลือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

พัชรี ผดุงวงศ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	X
บทที่	

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	2
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	5
1.3 สมมุติฐานการวิจัย.....	5
1.4 แนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย.....	6
1.5 ขอบเขตการวิจัย.....	8
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8

2. วรรณกรรมและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน.....	9
2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับถั่วเขียว.....	24
2.3 โรคเน่าดำในถั่วเขียว.....	27
2.4 การป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืชด้วย สารป้องกันและกำจัดเชื้อรา.....	33

3. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช.....	42
3.2 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่าย สีเขียวแกมน้ำเงิน ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ติดเชื้อ	

VI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่

บนถั่วเขียวโดยทำการทดลองในงานเพาะเชื้อ และในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า.....	53
3.3 ขั้นตอนการทดสอบทางเคมี.....	62
4. ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 คุณสมบัติของสารที่สกัดได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน.....	67
4.2 การศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ที่ระยะเวลาต่างๆ ในขวดรูปชมพู่.....	74
4.3 การศึกษาอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906.....	76
4.4 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในสภาพการตรึงไนโตรเจนกับในสภาพอาหารเลี้ยงสาหร่าย ที่เหมาะสม.....	85
4.5 ความเข้มข้นที่น้อยสุดของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i>	91
4.6 การทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> ในงานเพาะเชื้อ.....	93
4.7 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> ในงานเพาะเชื้อ.....	96
4.8 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> และ ความเข้มข้นสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการติดเชื้อราของถั่วเขียว.....	99
4.9 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> สาเหตุโรคเน่าดำของ ถั่วเขียวในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า.....	100
4.10 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของ	

บทที่

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906.....	105
4.11 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906.....	108
4.12 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906.....	111
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	113
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	115
บรรณานุกรม.....	116
ภาคผนวก.....	125
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	126
ภาคผนวก ข. น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบ.....	130
ภาคผนวก ค. วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล.....	131
ประวัติผู้เขียน.....	136

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. แสดงปริมาณและมูลค่าสารกำจัดเชื้อราที่นำเข้าไปในปริมาณมาก.....	3
2. ถั่วเขียวและผลิตภัณฑ์ถั่วเขียวแปรรูป.....	26
3. สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช.....	34
4. สารปฏิชีวนะที่ใช้ป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช.....	36
5. จุลินทรีย์ที่ใช้ป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช.....	37
6. ข้อดีและข้อเสียของการป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืชโดยวิธีต่างๆ.....	38
7. แสดงการยับยั้งเชื้อราโรคพืช โดยสารสกัดจากสำหรับ สีเขียวแก่น้ำเงิน ในสกุลต่างๆ.....	69
8. แสดงความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้ง เชื้อราโรคพืช.....	70
9. แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 เมื่อ เลี้ยงในอาหาร BGA, BGA+N, BG-11 และ Allen's.....	80
10. แสดงการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA ที่ความเข้มข้น ของโซเดียมไนเตรด ในระดับต่างๆ.....	81
11. แสดงการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้น ของไดโพลเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ต่างๆกัน.....	82
12. แสดงการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้น ของโซเดียมกลูโคไรด์ ต่างๆกัน.....	83
13. แสดงการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับพีเอช เริ่มต้นต่างๆกัน.....	84

IX

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

*

หน้า

ตารางที่

14. แสดงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906.....	88
15. แสดงความเข้มข้นที่น้อยสุดของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อรา <i>M. phaseolina</i>	92
16. แสดงผลการทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> บนถั่วเขียว.....	94
17. แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> ของถั่วเขียว ในจานเพาะเชื้อ.....	97
18. แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อ <i>M. phaseolina</i> และ ความเข้มข้นของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการติดเชื้อของถั่วเขียวในจานเพาะเชื้อ.....	102
19. แสดงการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> สาเหตุโรคเน่าดำ ของถั่วเขียวในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า.....	103
20. แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลิตโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906.....	112
21. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ สำหรับการเขียนกราฟมาตรฐาน ของ cycloheximide ตาม method of least squares.....	134

สารบัญญภาพ

	หน้า
1. แสดงแนวคิดในการวิจัย.....	7
2. แสดงลักษณะ sclerotium ของเชื้อรา <i>M. phaseolina</i>	31
3. แสดงลักษณะลำต้นถั่วเขียวที่เป็นโรคเน่าดำ (charcoal rot).....	32
4. แสดงขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน.....	43
5. แสดงสภาวะการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน บนเครื่องเขย่า.....	44
6. แสดงรูปแบบการทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อราโรคพืช โดยวิธี swab inoculation และ paper disc plate.....	46
7. แสดงลักษณะสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906.....	47
8. แสดงสภาวะการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ในถัง carboy.....	51
9. แสดงรูปแบบการเตรียมพืชเพื่อทดสอบรูปแบบ การใช้สารสกัด จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน.....	54
10. แสดงรูปแบบการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย สีเขียวแกมน้ำเงิน ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> ในจานเพาะเชื้อ.....	55
11. แสดงรูปแบบการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อราและความเข้มข้น ของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ต่อการติดเชื้อรา ของถั่วเขียวบนจานเพาะเชื้อ.....	56
12. แสดงรูปแบบการทดสอบการใช้สารสกัดจากสาหร่าย สีเขียวแกมน้ำเงิน ต่อการยับยั้งเชื้อรา บนถั่วเขียว ในถุงพลาสติก สำหรับเพาะกล้า.....	59
13. แสดงขั้นตอนกระบวนการทดสอบการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อควบคุมเชื้อราโรคพืช.....	60

14. แสดงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> บนอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น.....	71
15. แสดงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น.....	72
16. แสดงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Bipolaris mydis</i> บนอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น.....	73
17. แสดงช่วงเวลาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ในอาหาร BGA+N ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร.....	75
18. แสดงช่วงเวลาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ในอาหาร BGA ดัดแปลง ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร.....	89
19. แสดงช่วงเวลาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ในอาหาร BGA ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร.....	90
20. แสดงผลการทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ด้วยผงแป้ง สารลดแรงตึงผิว และสารสกัดละลายในเมทานอลอย่างเดี่ยว ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> สาเหตุโรคเน่าดำ ของถั่วเขียวในงานเพาะเชื้อ.....	95
21. แสดงการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ที่ความเข้มข้น 100 200 250 300 350 400 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>M. phaseolina</i> สาเหตุโรคเน่าดำ ในถั่วเขียว.....	98

22. แสดงผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ต่อการเกิดโรคเน่าดำ ของถั่วเขียว ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า.....	104
23. แสดงความเสถียรของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ที่พีเอช 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	106
24. แสดงความเสถียรของสารสกัดจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 ที่อุณหภูมิ 50 70 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....	107
25. แสดงแบบแผนการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 โดยวิธีซิลิกาเจลทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	109
26. แสดงตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906 โดยวิธีโอโตไบโอกราฟี.....	110
27. แสดงกราฟมาตรฐานของสาร cycloheximide.....	135

บทที่ 1

บทนำ

ถั่วเขียวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีชื่อสามัญว่า mung bean มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna radiata* L. อยู่ในวงศ์ Leguminosae พบได้ทั่วไปในประเทศจีน อินเดีย ปากีสถาน และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งมีอากาศร้อน (Litzenberger, 1974) เป็นพืชที่มีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีปริมาณแป้งที่สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ จึงเหมาะสำหรับนำไปทำแป้งผงในอุตสาหกรรมอาหาร หรือใช้ทำขนม เช่น ข้าวหริ่ม วุ้นเส้น นอกจากนี้ยังนำไปประกอบอาหารเพื่อแทนอาหารโปรตีนสรรพคุณทางด้านสมุนไพร ในตำราจีนได้กล่าวถึงสรรพคุณของถั่วเขียวไว้ว่า สามารถแก้ร้อนใน กระหายน้ำ ขับปัสสาวะ รักษาฝี เปลือก (สีเขียว) แก้ร้อนในกระหายน้ำ ทำให้ตาสว่าง รักษาตาอักเสบ และกากถั่วเขียวที่คั้นแล้วพอกบริเวณที่ผื่นคันจะทำให้หายเร็วขึ้น

ในปัจจุบันนี้ระบบการทำเกษตรกรรมธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำนาธรรมชาติ ได้นำเอาถั่วเขียวมาเป็นพืชหลักในการหว่านพร้อมกับข้าว เพื่อเป็นการเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้กับดินข้าวเมื่อถั่วสลายตัวกลายเป็นปุ๋ย จะเห็นได้ว่าประโยชน์ของถั่วเขียวมีมากมาย ดังนั้นประเทศไทยจึงมีความต้องการถั่วเขียวเป็นอย่างยิ่ง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรในฐานะหน่วยงานวิชาการที่รับผิดชอบในการกำหนดนโยบายและการวางแผนการพัฒนา ได้เข้ามาทำหน้าที่กำหนดเป้าหมายการผลิต โดยได้แบ่งเป้าหมายการผลิตสินค้าเกษตร ปี 2539/2540 ให้เป็นพืชเศรษฐกิจที่ต้องเร่งเพิ่มผลผลิต เนื่องจากถั่วเขียวเป็นพืชที่มีความต้องการทั้งภายในและนอกประเทศ โดยมีปริมาณความต้องการภายในประเทศ 215.87 พันตัน และส่งออกนอกประเทศ 50 พันตัน ดังนั้นจึงมีเป้าหมายในการผลิตถั่วเขียวในแต่ละปีไม่ต่ำกว่า 265.87 พันตัน (จุฬารัตน์ 2539)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ถั่วเขียวเป็นพืชที่ประสบปัญหาเรื่องเมล็ดพันธุ์มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของถั่วเขียวซึ่งติดมากับเมล็ดพันธุ์ เพราะจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผลผลิตของถั่วเขียวลดน้อยลงทั้งปริมาณและคุณภาพ ซึ่งมีผลต่อความเสียหายต่อเศรษฐกิจของประเทศ (Rachil, 1974) โรคของถั่วเขียวจะมีความรุนแรงมากน้อย ขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ใช้ปลูก ความอุดมสมบูรณ์ของดิน สภาพดินฟ้าอากาศและระบบการปลูกพืช โดยประเทศไทยมีรายงานของโรคถั่วเขียวที่สำคัญ คือ โรคที่เกิดจากเชื้อรา ได้แก่ โรคเน่าดำ (charcoal rot) โรคราสนิม (rust) โรคใบจุด (leaf spot) โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้แก่ โรคใบจุดเนูน (bacterial pustule) โรคใบไหม้แห้ง (halo blight) และโรคที่เกิดจากไวรัส (yellow mosaic virus) ซึ่งวิธีป้องกันกำจัดโรคที่ได้ผลดีในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ คือ การกลูกลเมล็ดพันธุ์ด้วยสารเคมี จะได้ผลดีในระยะแรกของการใช้ในแปลงเพาะปลูกพืช แต่ในช่วงระยะ 10 ปีที่ผ่านมาได้เกิดปัญหาศัตรูพืชขึ้นอย่างมาก ทั้งในเรื่องความต้านทานโรคที่มีต่อสารเคมีที่ใช้ การเกิดศัตรูพืชใหม่ๆที่มีความต้านทานต่อสารเคมี และการเกิดผลกระทบตอสสิ่งแวดล้อม เช่น สารพิษตกค้างในดิน ซึ่งส่วนใหญ่พบสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต การฉีดหรือพ่นสาร เพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทำให้เกิดสารตกค้างในบรรยากาศ นอกจากนี้ยังพบว่าสารป้องกันศัตรูพืชสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางตรงและทางอ้อมซึ่งก่อให้เกิดพิษต่อเกษตรกรและผู้บริโภค

สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ในประเทศส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทั้งในรูปของสารเข้มข้นและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ในกลุ่มของสารกำจัดศัตรูพืช สารกำจัดเชื้อราเป็นกลุ่มที่มีปริมาณการนำเข้ามากเป็นอันดับสาม รองจากสารกำจัดวัชพืชและสารกำจัดแมลงซึ่งปริมาณและมูลค่าของสารกำจัดเชื้อรามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปี 2530-2536 โดยในปี 2530 มีปริมาณการนำเข้า 6,524 ตัน มูลค่า 288 ล้านบาท ปี 2532 นำเข้า 5,865 ตัน มูลค่า 367 ล้านบาท ปี 2534 นำเข้า 5,112 ตัน มูลค่า 371 ล้านบาท และในปี 2536 นำเข้า 5,651 ตัน มูลค่า 437 ล้านบาท โดยในปี 2536 การนำเข้าสารเคมีกำจัดเชื้อราแสดงในตารางที่ 1 พบว่าสารกำจัดเชื้อราในกลุ่มซัลเฟอร์ (sulfur) มีปริมาณการนำเข้ามากที่สุดรองลงมาได้แก่คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ (copper oxychloride) และ ไซเน็บ (zineb) ส่วนสารที่มูลค่าการนำเข้ามากที่สุดได้แก่คาเบนดาซิม (carbendazim) รองลงมาได้แก่

แมนโคเซบ (mancozeb) และ โปรพิเนบ (propineb) (ไพฑูรย์ 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยและพัฒนาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1

ลำดับที่	ชื่อสามัญ (common name)	ปริมาณ/กก. (quantity/kg)	มูลค่า/บาท (value/baht)	ปริมาณสารออกฤทธิ์/กก. (all quantity/kg)
1	sulfur	1032,089	20,739,814	825,851
2	copper oxychloride	875,000	29,896,994	707,870
3	zineb	729,000	21,303,985	581,700
4	mancozeb	611,602	43,429,807	455,826
5	captan	386,256	26,585,037	193,125
6	propineb	378,000	40,597,080	264,600
7	carbendazim	364,556	47,789,934	234,013
8	metalaxyl	80,950	27,868,651	25,897
9	ioseethyl-aluminum	57,600	19,884,007	46,080
10	benomyl	42,095	15,848,385	21,047

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณและมูลค่าสารกำจัดเชื้อราที่นำเข้าในปริมาณมาก 10 อันดับ

จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นทำให้นักวิจัยหลายท่านหันมาพัฒนาการควบคุมเชื้อราโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) เช่น การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรได้แก่ ว่านไพล ขมิ้นเครือ หัวไพล พยอม คีปลีเชือก พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้ ซึ่งมีข้อดีคือ สารสกัดจากพืชมีการสลายตัวเร็วในสภาพแวดล้อม และส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ค่อนข้างเฉพาะเจาะจง และมีพิษต่อสัตว์เลื้อยคลาน แต่สารสกัดจากพืชยังมีข้อจำกัดทางการผลิตระดับอุตสาหกรรมในแง่ที่ต้องใช้พื้นที่เพาะปลูกขนาดใหญ่ใช้เวลาในการเพาะปลูกนานเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังไม่สามารถควบคุมสภาพการผลิตที่เหมาะสมได้ เนื่องจากการเจริญเติบโตของพืชขึ้นอยู่กับองค์ประกอบด้านต่างๆ เช่น สภาพดินฟ้าอากาศ เป็นต้น

ในอดีตที่ผ่านมาได้มีการศึกษาพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า 8,000 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรีย โดยสามในสี่ส่วนของทั้งหมดมาจากสายพันธุ์ *Streptomyces* ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามได้มีผู้พยายามคิดค้นหาแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยพบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ก็เป็นแหล่งน่าสนใจในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีรายงานว่าสาหร่ายในสกุล *Anabaena* สามารถผลิตสารต่อต้านเชื้อรา (Frankmölle and Larsen, 1992 ; Moore and Patterson, 1986) และ *Lyngbya majuscula* ผลิตสาร lyngbyatoxins (a δ -lactone ซึ่งมี alkyl chain) ซึ่งสามารถต่อต้านเชื้อราได้เช่นกัน จึงนับว่าสาหร่ายเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่น่าสนใจในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อต่อต้านเชื้อราโรคพืช แม้ว่าสาหร่ายจะมีข้อเสียเปรียบในแง่ที่เจริญเติบโตช้ากว่าแบคทีเรียทั่วไป แต่การใช้สาหร่ายมีข้อได้เปรียบในแง่ของการผลิต คือ ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อยและระยะเวลาในการผลิตสั้นกว่าพืช สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมและเลือกรูปแบบที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงได้ เช่น การเลี้ยงในถังหมัก การเลี้ยงในอ่างหรือการตรึงเซลล์ (Chetsumon et al., 1994) ตลอดจนอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ราคาค่อนข้างต่ำและยังยากแก่การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นสารละลายของสารอนินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่ำ

จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่กลุ่มสาหร่ายขนาดเล็ก จะเป็นแหล่งสำคัญแหล่งใหม่ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อพัฒนาเป็นสารต่อต้านเชื้อราโรคพืชต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

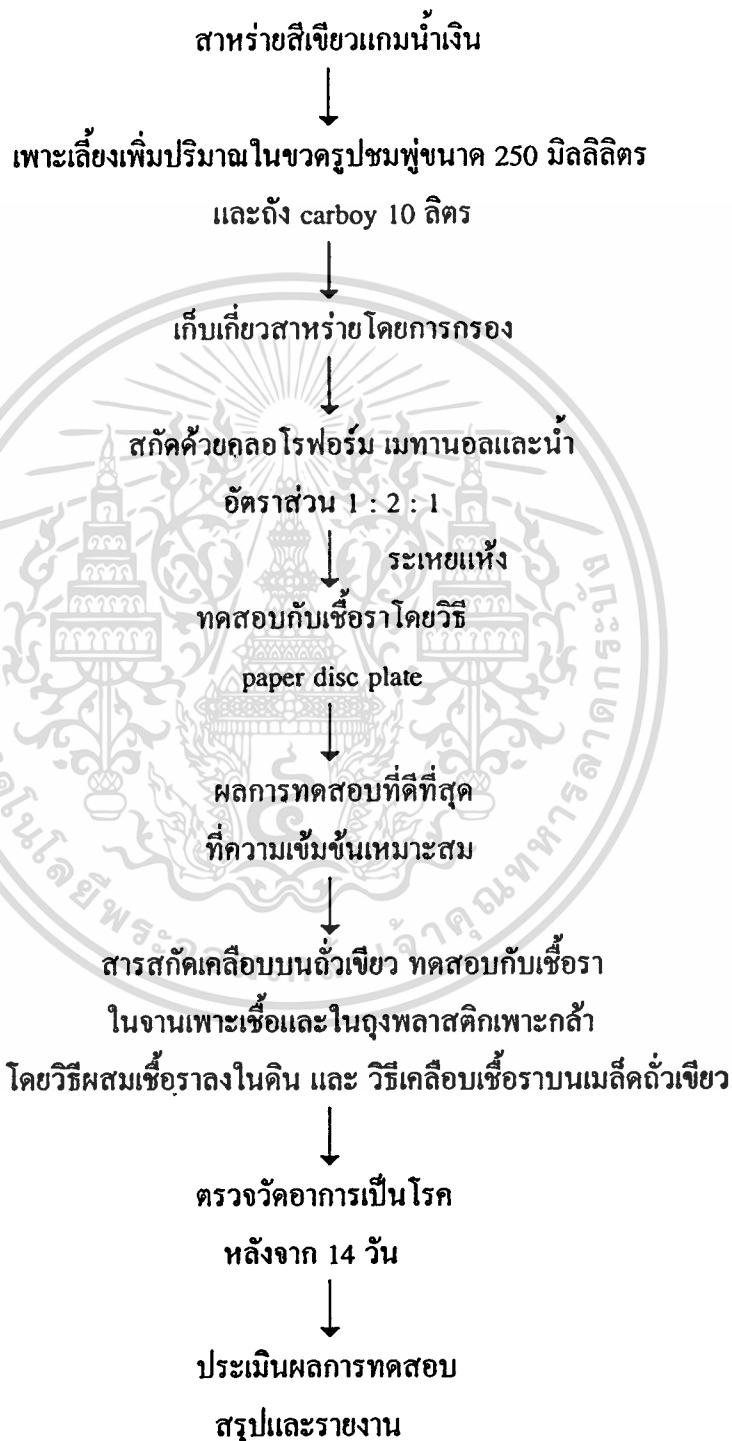
- 1.2.1 คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชได้
- 1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
- 1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อการเจริญของเชื้อราโรคพืชในระดับห้องปฏิบัติการ
- 1.2.4 ศึกษาความสามารถของสารสกัด ในการควบคุมโรคเน่าดำของถั่วเขียวในงานเพาะเชื้อและในถุงพลาสติกสำหรับเพาะต้นกล้า
- 1.2.5 ศึกษาการแยกสารสกัดที่ผลิตได้ออกจากสิ่งเจือปน
- 1.2.6 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

- 1.3.1 สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสูตรอาหารที่ไม่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน
- 1.3.2 ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราตามระดับความเข้มข้นของสาร โดยถ้าใช้ความเข้มข้นที่สูงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราจะสูงตามไปด้วย
- 1.3.3 ระดับความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อรา มีผลต่อการเกิดอาการของโรคในถั่วเขียว โดยถ้าใช้ความเข้มข้นที่สูง โอกาสการเกิดโรคก็จะสูงตามไปด้วย
- 1.3.4 เมล็ดถั่วเขียวที่มีการปลูกเชื้อราด้วยวิธีผสมในดิน โดยตรง (mixing method) จะตรวจพบอาการของโรคมากกว่าเมล็ดที่มีการปลูกเชื้อราด้วยวิธีเคลือบบนเมล็ด (dipping method)

1.4 แนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

การใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินควบคุมโรคเน่าดำ ในถั่วเขียว ทดลองโดยนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาสกัดด้วยเมทานอล หลังจากนั้นนำมาระเหย-
แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน นำสารสกัดที่ได้ทำการทดสอบความสามารถ
ในการยับยั้งและควบคุมการเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าดำ
ในถั่วเขียว โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัด
ที่ได้จากการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และมีเมทานอลเป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นนำ
ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดี มาทำการทดสอบกับถั่วเขียว โดยนำ
สารสกัดมาศึกษารูปแบบการใช้สารสกัดก่อนเคลือบบนถั่วเขียว ทั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
ก่อนนำไปทดสอบกับเชื้อราโดยปลูกถั่วในงานเพาะเชื้อและในถุงพลาสติกสำหรับเพาะต้น
กล้า ทดสอบกับเชื้อราด้วยวิธีผสมในดิน โดยตรง และวิธีเคลือบเชื้อราบนเมล็ด ตรวจวัดผล
การควบคุมเชื้อราในถั่วเขียวหลังจาก 14 วัน โดยสังเกตอาการการเกิดโรค สุดท้ายทำการ
ประเมินผลการทดลองและสรุปผล (ดังแสดงในภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงแนวคิดในการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ขอบเขตการวิจัย

1.5.1 ศึกษาเฉพาะประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อการเจริญของเชื้อราโรคพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น *Collectotrichum truncatum*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris maydis*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* และ *Pyricularia grisea* ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.5.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ความต้องการธาตุอาหาร ซึ่งได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โซเดียมคลอไรด์ และ ศึกษาความเป็นกรด-เบส ของอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

1.5.3 ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเน่าดำในถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 2 จะใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีศักยภาพสูง ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าดำ มาศึกษารูปแบบการใช้สารสกัดด้วยสารลดแรงตึงผิว และผงแป้ง ก่อนนำสารสกัดมาเคลือบ บนเมล็ดถั่วเขียว จากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อราโรคพืช โดยปลูกในจานเพาะเชื้อและถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า

1.5.4 วัดความสามารถในการควบคุมโรคในถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 2 ในระยะแรกคือ ระยะกล้า โดยใช้เวลาในการวัดผลเมื่ออายุ 14 วัน

1.5.5 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดบางประการ ได้แก่ ความเสถียรของสารสกัดที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆ

1.5.6 ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดบางประการ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมันโดยวิธีทดสอบทางเคมี รวมถึงการแยกสารออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ลดปัญหาการใช้สารเคมีในทางการเกษตร และลดมลภาวะทางการเกษตรในสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากสารพิษตกค้างอันเนื่องมาจากสารเคมี

1.6.2 เป็นแนวทางในการวิจัยในสาหร่ายชนิดอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรค เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาแนวความคิดไปใช้ในขอบข่ายงานที่กว้างขวางยิ่งขึ้น

บทที่ 2

วรรณกรรมและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทำให้สามารถแบ่งการศึกษาดังนี้
เป็นหัวข้อต่างๆดังนี้

- 2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
- 2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับถั่วเขียว
- 2.3 โรคเน่าดำในถั่วเขียว
- 2.4 การป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืชด้วยสารป้องกันและกำจัดเชื้อรา

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือ Cyanobacteria หรือ blue-green algae จัดอยู่ใน Division Cyanophyta อาจมีชื่อเรียกอีกอย่างอื่นว่า Division Myxophyta หรือ Cyanophycophyta หรือ Cyanochloronta (Kumer, 1988)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอต (procarvate) ที่มีขนาดเล็กสามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง แหล่งที่อยู่อาศัยของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพบได้ทั่วไปทุกสภาพ ทั้งในน้ำทั้งน้ำจืดและน้ำทะเล บนบก อากาศ ภูมิอากาศทั้งเขตร้อนและหนาว สภาพที่อยู่ในน้ำอาจอยู่แบบอิสระหรือเกาะติดกับวัตถุอื่นจมอยู่ในน้ำ บางชนิดอยู่ภายในพืชเป็นแบบเอนโดไฟต์ (endophyte) เช่นการเจริญในพืช *Blasia* และ *Antheceiros* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Liverworts สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สกุล *Anabaena* บางชนิดอาจอยู่ในเฟิร์นน้ำหรือในรากของ Cycads การอยู่ร่วมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นบางชนิด เช่น *Anabaena azollae* ในแหนแดง ทำให้เกิดการตรึงไนโตรเจน (N_2 -fixation) การตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นได้ทั่วไปทั้งในดิน น้ำจืด

เอกสารนี้เป็นและน้ำทะเล การตรึงไนโตรเจนให้แก่ดินทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีลักษณะและคุณสมบัติหลายประการที่แตกต่างจากแบคทีเรียและสาหร่ายชนิดอื่นๆ ดังนี้

2.1.1.1 เป็นเซลล์โพรคาริโอต (prokaryote cell) ไม่มีนิวเคลียส มีเฉพาะดีเอ็นเอ ที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ผนังมีซิทหุ้ม ลักษณะของซิทหุ้มเมื่อหักบริเวณซิทอาจมีสี ถัดจากผนังเซลล์จะเป็นพลาสมาเมมเบรนซึ่งห่อหุ้มไซโตพลาสซึม บริเวณไซโตพลาสซึมนอกจากจะมีดีเอ็นเอ ยังพบรงควัตถุมิติกระจายทั่วไป นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างซึ่งเป็นกรานูล (granule) มีหน้าที่ดังนี้

- polyphosphate granule ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมฟอสเฟต มีขนาดใหญ่อยู่ใกล้กับ centrioplasm กรานูลชนิดนี้จะไม่พบในสาหร่ายที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมฟอสเฟต อย่างไรก็ตาม กรานูลนี้จะถูกพบได้อีกหากมีการเติมฟอสเฟตในอาหาร
- cyanophycin granule เป็นกรานูลที่สะท้อนแสงได้ พบใน vegetative cell และ akinetes (spore) ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมไนโตรเจน
- carboxysomes มีลักษณะเป็นหกเหลี่ยม (polyhedral) ซึ่งห่อหุ้มด้วยเยื่อบาง ภายในบรรจุเอนไซม์ RBP-carboxylase (ribulose 1,5-biphosphate carboxysomes) โดย carboxysomes ทำหน้าที่ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 -fixation)
- glycogen granule พบอยู่ระหว่าง photosynthetic lamella ในรูปของผลึก แท่ง หรือแผ่น มีหน้าที่เป็น photosynthetic reserve material (carbon และ energy)

2.1.1.2 รงควัตถุ (pigment) รงควัตถุของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไม่ได้อยู่ในพลาสติด แต่อยู่บริเวณเมมเบรนที่เรียกว่าไทลาคอยด์ (thylakoid) ลักษณะไทลาคอยด์ต่างจากสาหร่ายอื่นๆ ตรงที่ไม่มีเยื่อหุ้มบางๆ หุ้มคลอโรพลาสต์ (มาลินี 2534) รงควัตถุประกอบด้วย

- คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) ทำหน้าที่จับพลังงานแสงและถ่ายทอดสู่ photosystem I และทำหน้าที่เฉพาะในส่วนของการ cyclic photophosphorylation
- แคโรทีนอยด์ (carotenes) ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- แชนโทฟิลล์ (xanthophylls) ได้แก่ มิกโซแชนทิน(myxoxanthin), มิกโซแชนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll), ออสซิลลาแซนทิน (oscillaxanthin), ซีอาแซนทิน (zeaxanthin), ลูทีน (lutein), ฟลาวิซิน (flavicin), อะฟานิโซฟิลล์ (aphanizophyll) และ อะฟานิซิน (aphanycin)

- ไฟโคบิลิน ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (c-phyocyanin), ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophyocyanin) และ ซี-ไฟโคอีริทริน (c-phycoerythrin) (Desikachary, 1959)

2.1.1.3. เซโทโรซิสต์ (heterocyst) เป็นเซลล์พิเศษที่มีผนังเซลล์หนา พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่นใน Order Nostocales และ Order Stigonematales เท่านั้น (ขุติ 2538) ถ้าดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นว่า ส่วนประกอบของเซลล์เป็นเนื้อเดียวกันหมด แต่ถ้าดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบว่าภายในมีเมมเบรน ปกติในเซลล์จะใสหรือมีสีเหลืองอ่อนหรือน้ำตาลจาง เนื่องจากขาดรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง เหลือแต่แคโรทีนอยด์จึงทำให้มีสีดังกล่าว การเกิดเซโทโรซิสต์เกิดได้โดยเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในเส้นสายมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเซลล์ธรรมดา แล้วผนังเซลล์จะสร้างไฟบรัส (fibrous) เป็นชั้นๆ ขึ้นมา ทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะหนากว่าเดิม ถ้าเปรียบเทียบกับเซลล์เซโทโรซิสต์กับอะคิเน็ต (akinet) จะพบว่าเซโทโรซิสต์จะมีลักษณะใสกว่า ส่วนอะคิเน็ตมีลักษณะทึบแสงกว่าเพราะมีอาหารสะสม เซลล์ของเซโทโรซิสต์เมื่อแรกจะมีลักษณะเหลี่ยมเช่นเดียวกับเซลล์อื่นต่อมาจะค่อยๆ กลมขึ้น หลังจากนั้นไซโตพลาสซึมจะไหลผ่านรูเล็กๆ ที่ผนังเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้สีซีดลง ส่วนบริเวณด้านข้างของเซโทโรซิสต์ที่ติดอยู่กับเซลล์อื่น จะมองเห็นเป็นตุ่มเล็กๆ ทั้ง 2 ด้านซึ่งเรียกว่า โพลาร์โนดูล (polar nodule) ในโพลาร์โนดูลยังมีรูเล็กๆ เชื่อมระหว่างเซโทโรซิสต์กับเซลล์ข้างเคียงเรียกว่าโพลาร์นอตช์ (polar notch) หน้าที่ของเซโทโรซิสต์เดิมที่เชื่อว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สร้างเซโทโรซิสต์เท่านั้นที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ทั้งนี้เพราะว่าเซโทโรซิสต์มักเกิดขึ้นในขณะที่อาหารใช้เลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินขาดสารประกอบไนโตรเจน เซโทโรซิสต์สร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียได้จึงทำให้เชื่อว่าเซโทโรซิสต์เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน ปัจจุบันมีรายงานว่า *Gloeocapsa* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเซลล์เดี่ยวและไม่มีเซโทโรซิสต์ก็สามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นกันเซโทโรซิสต์จะเป็นจุดอ่อนที่ทำให้เซลล์ขาดออกจากกัน แต่ละท่อนที่ขาดออกจากกันเรียกว่า ฮอร์โมกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(hormogone) หรือฮอร์โมโกเนีย (homogonia) ซึ่งอาจเป็นสาขายาวหรือสายสั้นๆก็ได้และฮอร์โมโกเนียดังกล่าวสามารถแบ่งเซลล์ให้เส้นสายที่ยาวต่อไปได้ ส่วนเฮทเทอโรซิสต์เองถ้าหลุดออกจากเส้นสายสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมมากกว่าเซลล์ธรรมดาเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะงอกเป็นเส้นใหม่ได้

2.1.1.4. การแตกแขนง (branching)

การแตกแขนงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมี 2 แบบคือการแตกแขนงที่แท้จริง (true branching) และการแตกแขนงเทียม (false branching)

ก. การแตกแขนงที่แท้จริง แบ่งออกเป็น 3 แบบคือ

- การแตกแขนงด้านข้าง (lateral branching) เกิดจากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในสายทำการแบ่งตัวในแนวตั้งฉากกับแนวการแบ่งเซลล์ปกติ หลังจากนั้นเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จะแบ่งเซลล์ต่อไปอีก ทำให้เกิดเป็นแขนงงอกยาวออกไปทางด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้ง 2 ด้าน

- การแตกแขนงคู่ (dichotomous branching) เกิดจากการแบ่งเซลล์ยอด (apical cell) ของเส้นสาย โดยทำการแบ่งตามแนวแขนงกับแนวแกนได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์จะแบ่งตัวต่อไปอีก ได้เป็นแขนงใหม่อยู่ตรงปลายเป็นคู่

- การแตกแขนงแบบตัว V คว่ำ (mastigocladaceous หรือ reverse “V” shape branching) เกิดจากการแบ่งเซลล์จากปกติ หลังจากนั้นเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่ทั้ง 2 เซลล์จะยึดตัวแล้วดันออกไปทางเดียวกัน แล้วจึงทำการแบ่งเซลล์ต่อไปอีกให้แขนงสั้นๆชนกันและชะงักการเจริญเติบโต ทำให้มีลักษณะเป็นรูปตัว “V” คว่ำ

ข. การแตกแขนงเทียม (false branching)

การแตกแขนงเทียมพบเฉพาะในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเท่านั้น เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ในเส้นสายแบ่งตัวตามปกติได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ พลังเซลล์ส่วนที่ชนกันจะโค้งมน หลังจากนั้นเซลล์ใหม่ทั้ง 2 เซลล์หรือเพียงเซลล์เดียวจะทำการแบ่งตัวเกิดเป็นแขนงใหม่ดันออกทางด้านข้างของสายเดิมเกิดเป็นแขนงเทียม ถ้าเจริญเพียงแขนงเดียวเรียกว่าแขนงเทียมเดี่ยว (false branch in single) หากเจริญทั้งสองแขนงเรียกว่าแขนงเทียมคู่ (false branch in pair) การเกิดแขนงเทียมนี้ แขนงที่แตกใหม่อาจดันชีวิตที่หุ้มติดไปด้วยหรืออาจแทงทะลุหุ้มออกไป ทำให้เกิดมีรอยขาดของชีวิตเดิม เรียกรอยนี้ว่าโอเครีย (ocrea)

2.1.1.5 การสืบพันธุ์ ไม่พบการสืบพันธุ์แบบมีเพศในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ภายนอก
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เงิน พบเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศซึ่งได้แก่

- การแบ่งเซลล์ (fission) โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์จาก 1 เป็น 2 เป็น 4 สำหรับสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเซลล์เดี่ยว แบ่งเซลล์หลายๆครั้งได้กลุ่มเซลล์ซึ่งต่อไปอาจจะหลุดจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆได้ ชนิดที่เป็นกลุ่มเซลล์ก็เข้าไปในลักษณะเดียวกันสำหรับพวกที่เป็นเส้นสายเกิดการขาดตอนตรงบริเวณรอยต่อของเซพเทอโรซิสต์กับเซลล์ที่อยู่ติดกัน สำหรับเซลล์ที่ไม่มีเซพเทอโรซิสต์เกิดขึ้นภายในเส้นสายจะมีเซลล์ตาย (dead cell) ซึ่งเป็นจุดอ่อนให้เกิดการขาดตอน

- การสร้างสปอร์ (spore) มีการสร้างสปอร์ 2 แบบ คือ เอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์และเมื่อหลุดออกจากเซลล์ก็จะเจริญเป็นต้นใหม่ได้อีกแบบหนึ่งเรียกว่าเอกโซสปอร์ (exospore) ซึ่งเกิดขึ้นจากการตัดแบ่งบริเวณส่วนปลายของเซลล์ออกมา อาจจะตัดเพียง 1 เซลล์หรือหลายๆเซลล์ติดต่อกัน

2.1.1.6 การเคลื่อนที่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดที่เป็นเส้นสาย เช่น *Oscillatoria* สามารถเคลื่อนที่ได้โดยไม่มีแฟลกเจลลา

2.1.2 สารเคมีที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดต่างมีดังนี้

2.1.2.1 ไขมัน (lipid) และกรดไขมัน (fatty acid)

จากการศึกษาของ Wada และ Marata (1990) พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechocystis* PCC 6803 ประกอบด้วย glycerolipid 4 ชนิดคือ monogalactosyl diglycerides (MGDG), digalactosyl diglycerides (DGDG), sulfoquinovosyl diglycerides (SQDG) และ phosphatidyl glycerol (PG) เป็นส่วนใหญ่ และมีการค้นพบกรดไขมัน (fatty acid) จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเส้นสาย เช่น *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica*, *Oscillatoria chalybea*, *Nostoc calcicola* และ *Tolypothrix* sp.

นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina maxima* ประกอบด้วยไขมัน 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำกรดไขมันไปวิเคราะห์ด้วย TLC plate จะประกอบด้วย digalactosyl diglycerides 23.4 เปอร์เซ็นต์ phosphatidyl glycerol 25.9 เปอร์เซ็นต์ monogalactosyl diglycerides 4.6 เปอร์เซ็นต์ sulfolipid 5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันที่เป็นกลาง (neutral lipids) 7.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าไขมันที่สำคัญของสาหร่ายคือ polyunsaturated fatty acid โดยเฉพาะ Gamma-linoleic acid และ Beta-linoleic acid ซึ่งพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกลุ่ม Oscillatoriaceae (Canto de Loura and Dubacy, 1987)

2.1.2.2 สารปฏิชีวนะ (antibiotic)

สารปฏิชีวนะหมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ สามารถที่จะยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์อื่นๆได้ โดยใช้ในปริมาณที่ต่ำมากและจะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืชหรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะสารเหล่านี้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูง ปัจจุบันยาปฏิชีวนะจะรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ที่สังเคราะห์จากปฏิชีวนะเป็นต้นแบบ (ควมพร 2530) สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากสาหร่ายมีองค์ประกอบของสารต่างๆ เช่น สารประกอบเปปไทด์ (peptide) กรดไขมัน กรดอินทรีย์อื่นๆ โบรโมฟินอล (bromophenol) สารยับยั้งพวกฟีนอลิก (phenolic inhibitor) เทนนิ (lannin) เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ และแอลกอฮอล์

ได้มีรายงานการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยมีการพบกรดอะคริลิก (acrylic acid) ครั้งแรกใน *Phaeocystis pouchetii* (Sieburth, 1960) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ สารพวก chlorinate และ γ -ylidene- γ -butyrolactone ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Scytonema hofmanni* ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เช่นกัน

Surk-Sik และคณะ (1992) รายงานว่าสาร calophycin ที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix fusca* EU-10-1 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างกว้างขวาง จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี disc-diffusion soft agar plate พบว่าความเข้มข้นของ calophycin 1.2 $\mu\text{g}/\text{disc}$ สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Trichophyton mentagrophytes* เกิดเป็นโซนใส (clear zone) ขนาด 13 7 12 13 และ 15 มิลลิเมตร ตามลำดับ ค่า minimum inhibit concentration ของ calophycin ในการต้านเชื้อรา *C. albicans*, *T. mentagrophytes* และ *A. fumigatus* เท่ากับ 1.25 2.5 และ 1.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อทำการจัดจำแนก (identified) สาร calophycin โดยหาสูตรโครงสร้างทางเคมี พบว่าเป็นสารจำพวก cyclic decapeptide, cyclic (L-Ala-D-Asp-L-Asn-L-Glu-Gly-L-N-Measn-L-Pro (2R,3R,4S)-Hamp-L-Val) เมื่อ Hamp คือ (2R,3R,4S)-3-amino-2 hydroxy-4 methylpalmitic acid unit และ Measn คือ N-methylasparagine

Walter และ Frankmole (1992) รายงานว่า laxaphycin A และ B เป็นสาร cyclic peptide ที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena laxa* FK-1-2 มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา เมื่อศึกษาลักษณะของสารดังกล่าวด้วยเครื่อง NMR และ MS เพื่อทำการศึกษาโครงสร้างของ amino acid ของ laxaphycins A และ B และพบว่าประกอบด้วย cyclic (Aoc-Hse-E-Dhb-Hyp-Hse-Phe-Leu-Ile-Leu-Gly) เมื่อ Aoc คือ 3-aminooctanoic acid และ cyclic (Ala-Hleu-Glu-N-Melle-Hasn-Thr-Pro-Leu-Thr-Ade-Val-Hleu) และ Ade คือ 3-aminodecanoyl ส่วน laxaphycin E เป็น cyclic decapeptide ที่พบน้อย และมีโครงสร้างแตกต่างจาก cyclic decapeptide A ตรง 3-aminodecanoyl ใน leu ของ Aoc และ laxaphycin D ซึ่งเป็น cyclic dodecapeptide แตกต่างจาก laxaphycin B ตรง 3-aminooctanoyl unit (Aoc) ถูกแทนด้วย Ade unit

นอกจากนี้ยังพบว่าสาร tjipanazoles ซึ่งแยกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Tolypothrix tjipanensis* ซึ่ง tjipanazoles เป็นสารจำพวก indolo [2,3-9] carbazoles มีโครงสร้างคล้ายกับสารที่พบใน actinomycetes และ silme moulds แต่ไม่มี pyrrolo [3,4-C] ring สารนี้จะเป็นพืชต่อเซลล์เล็กน้อย แต่ในระดับการทดลองกับสิ่งมีชีวิตแล้ว จะไม่สามารถต่อต้านเชื้อ *Candida albican* ได้ อย่างไรก็ตาม tjipanozoles A และ A₂ สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าวและโรคราสนิมของข้าวสาลี ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเกษตร

2.1.2.3 สารพิษ (toxin)

สารพิษจากสาหร่ายคือ สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายของเซลล์ เป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Bu'Lock, 1961) •

กลุ่มสารพิษจากสาหร่ายที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. กลุ่มที่เป็นอันตรายต่อระบบประสาท (neurotoxins)
2. กลุ่มที่เป็นอันตรายต่อดับ (hepatotoxins)
3. กลุ่มที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (cytotoxins)

สารพิษที่ผลิตขึ้น ส่วนใหญ่จะผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม (Carmichael and Biggs, 1979) ได้มีการศึกษาสารพิษจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น *Calothrix crustacea* ผลิตสารพิษ aplysiatoxin ต่อด้านแบคทีเรีย ส่วน *Lyngbya majuscula* ผลิตสารพิษ lyngbyatoxins ต่อด้านเชื้อรา

2.1.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators, PGR)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (PGR) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพควบคุมหรือมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ผลิตในธรรมชาติ พบในราและสาหร่ายทะเล สำหรับในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยเฉพาะสาหร่ายที่เป็นเส้นสายและตรงในโครเจนได้นำมาทดสอบกับธัญพืช ได้แก่ ฝรั่งไทย ผักกาดและมะเขือเทศ พบว่ามีผลต่อการเจริญของพืช

2.1.2.5 เอนไซม์ (enzyme)

ในภาคอุตสาหกรรมและการทดลองในห้องปฏิบัติการมีความต้องการเอนไซม์เป็นจำนวนมากสำหรับเอนไซม์ที่ผลิตโดยสาหร่าย เช่น phosphoglycerate kinase (PGK) ซึ่งใช้ในการตรวจหา ATP ที่ผลิตได้จาก *Spirulina platensis* นอกจากนั้นยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิด เช่น *Anabaena*, *Mastigocladus* และ *Microcoleus* ผลิตเอนไซม์ restriction endonuclease ทำหน้าที่ทำลายสารพันธุกรรมที่แปลกปลอมเข้าไปในเซลล์ (Richmond, 1986)

2.1.3 ธาตุอาหารสำหรับสาหร่าย (algal nutrition)

จากการที่สาหร่ายสามารถเปลี่ยนระบบเมแทบอลิซึมได้ตามสภาวะแวดล้อม ทำให้การศึกษาด้านความต้องการธาตุอาหารของสาหร่ายค่อนข้างสับสน โดยปกติ

โภชนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ไปจะมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ สิ่งมีชีวิตที่สร้างอาหารได้เองโดยไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องอาศัยอาหารจากแหล่งอื่น (autotrophy) และสิ่งมีชีวิตที่ได้รับอาหารจากแหล่งอื่น (heterophy) จุลินทรีย์ที่เป็นสร้างอาหารได้เอง จะใช้สารอาหารในรูปของธาตุอาหารที่เป็น สารอนินทรีย์และได้พลังงานจากแสงหรือจากการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ (Lwoff, 1951) ส่วนสิ่งมีชีวิตที่สร้างอาหารเองไม่ได้ จะได้รับสารอาหารและพลังงานจากสารอินทรีย์ที่ สร้างโดยสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Nelson and Lewin, 1974) สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ มีความ ต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะมีแร่ธาตุอาหารในปริมาณที่สูงกว่าระดับที่พบในธรรมชาติมาก ระดับแร่ธาตุที่เหมาะสม สำหรับสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จะเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น ความหนาแน่นของเซลล์ แสง อุณหภูมิ และ พีเอช โดยเฉพาะแสงมักเป็นปัจจัยที่จำกัด ปริมาณเซลล์สูงสุดของสาหร่าย

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของสาหร่ายมีดังนี้

2.1.3.1 คาร์บอน (carbon)

- อนินทรีย์คาร์บอน (inorganic carbon)

สาหร่ายทุกชนิดที่เจริญแบบ photoautotrophy สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ หรือ H_2CO_3 หรือ HCO_3^- หรือ CO_3^{2-} (ขึ้นอยู่กับพีเอชของน้ำ) ในการสังเคราะห์ สารอินทรีย์อื่นๆ สารประกอบอนินทรีย์เหล่านี้ยังทำหน้าที่สำคัญ คือ เป็นบัฟเฟอร์ (buffer) โดยปกติเมื่อน้ำอยู่ในสภาวะสมดุลกับคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ ค่าพีเอช จะเป็นเบสเล็กน้อย (8-8.5) และอนินทรีย์คาร์บอนส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป HCO_3^- เมื่อ พีเอช สูงขึ้นไปอีก CO_3^{2-} ก็จะเป็นรูปที่มีอยู่มากที่สุด และเมื่อสาหร่ายใช้ CO_3^{2-} ไป พีเอชก็จะ สูงขึ้นอีก เนื่องจากมีไอออน OH^- เหลือจากปฏิกิริยาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงจำเป็นต้อง ให้อนินทรีย์คาร์บอน เพื่อให้ได้อัตราการเจริญสูงสุดโดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของ แก๊สบริสุทธิ์หรือผสมกับอากาศในอัตราประมาณร้อยละ 5 พ่นลงไปซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้อยู่ ทั่วไป (Ingle and Colman, 1975)

สาหร่ายสามารถดูดซึมคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในเซลล์ได้โดยตรง

แล้วรวมกับ ribulose biphosphate จากนั้นแยกเป็น phosphoglyceric acid 2 โมเลกุล

โดยเอนไซม์ ribulose biphosphate (RuBP) carboxylase ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการตรึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ที่พบในพืชสีเขียวทั่วไป สำหรับการนำ HCO_3^- เข้าไปในเซลล์จะอาศัยกลไกที่เรียกว่า active transport แล้วสลายไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำโดยใช้ เอนไซม์ carbonic anhydrase บริเวณด้านนอกของผนังเซลล์ (Miller and Colman, 1980)

- อินทรีย์คาร์บอน (organic carbon)

สาหร่ายสามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนสำหรับการเจริญได้ โดยที่สาหร่ายสามารถสลับเมแทบอลิซึม ระหว่าง autotrophy ในเวลากลางวันที่ได้รับแสง กับ hetrotrophy ในเวลากลางคืนได้ และในบางครั้งอาจสามารถเกิดเมแทบอลิซึมทั้งสองอย่างในเวลาเดียวกันได้ โดยปกติแล้วประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญ (สร้างเซลล์) จะมีค่าประมาณ 55% ในขณะที่การใช้ CO_2 จะมีประสิทธิภาพประมาณ 20 %

สารอินทรีย์ที่สาหร่ายใช้ได้มักจะอยู่ในรูปที่เป็นโครงสร้างง่ายๆ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือ แอซิเตต เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญแบบ heterotrophy จะมีประสิทธิภาพในการใช้คาร์บอนได้สูงกว่า แต่จะมีปัญหาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียรุนแรงกว่าเช่นกัน

2.1.3.2 ไนโตรเจน (nitrogen)

ส่วนประกอบของเซลล์จะมีไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีปริมาณเป็นที่สองรองจากคาร์บอน (ไม่นับไฮโดรเจนและออกซิเจน) ในสาหร่าย (ยกเว้นพวกไดอะตอม) ที่เจริญอยู่ในระยะ exponential จะมีไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 7-10% และคาร์บอนอยู่ประมาณ 50% ของน้ำหนักแห้งนอกจากนี้ยังพบน้ำมัน (oil) พอลิแซ็กคาไรด์ (Vaccaro, 1965)

สารประกอบไนโตรเจนหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์สามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ตั้งแต่แก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้ในเตรด (NO_3^-) ไนไตรต์ (NO_2^-) แอมโมเนีย (NH_4^+) และยูเรียได้จนถึงกรดอะมิโน เช่น glycine, serine, alanine, glutamic acid และ aspartic acid (Thomas, 1968 ; Wheeler and North, 1974 ; Neilson and Larson, 1980) และกรคนิวคลีอิก เช่น purine และ pyrimidine ที่สาหร่ายบางชนิดนำไปใช้ได้

เมื่อใช้แอมโมเนียในการเลี้ยงสาหร่ายฟิเอชของน้ำจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการปลดปล่อยไฮโดรเจนออกไซด์ออกมาจากกระบวนการดูดซึมแอมโมเนียเข้าไปในเซลล์ ซึ่งฟิเอชที่เป็นกรด จะยับยั้งการเจริญของสาหร่ายเป็นส่วนใหญ่ ในทางปฏิบัติจึงไม่ควรใช้แอมโมเนียเกินกว่า 1 มิลลิโมล สำหรับไนไตรต์ก็ไม่สามารถใช้ที่ความเข้มข้นเกินกว่า 1 มิลลิโมล ได้เช่นกัน เนื่องจากความเป็นพิษของสารประกอบนี้ ดังนั้นไนเตรตจึงเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ที่สุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั่วไป ซึ่งก็อาจมีปัญหาเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของฟิเอช แต่โดยปกติแล้วสาหร่ายสามารถทนสภาพที่เป็นเบสได้ดีกว่าสภาพที่เป็นกรดและสาหร่ายบางชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการฟิเอชสูงในการเจริญ สำหรับยูเรียที่มีราคาถูกกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจนอื่นๆก็สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฟิเอช

ในกรณีที่เกิดการขาดไนโตรเจนระหว่างการเจริญ สาหร่ายสามารถนำสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในเซลล์มาใช้ในการแบ่งตัวได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะมีการนำโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ phycocyanin มาใช้ ทำให้ปริมาณไนโตรเจน (โปรตีนหรือ phycocyanin) ในเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และมีการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการผลิตสาหร่ายเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนจะต้องระมัดระวังเกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารต้องมีเพียงพอ

2.1.3.3 ฟอสฟอรัส (phosphorus)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักอีกตัวหนึ่ง ซึ่งมักขาดแคลนระหว่างการเจริญของสาหร่าย ฟอสฟอรัสมีหน้าที่สำคัญในเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวกับการถ่ายทอดพลังงาน และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยปกติในแหล่งน้ำทั่วไปมักมีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (total-phosphorus) อยู่ในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัสมากกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ (H_2PO_4^- หรือ HPO_4^{2-} รวมเรียกว่า Pi) (Goldman and Jenkins, 1974) ปริมาณความต้องการ Pi ของสาหร่ายจะแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์และสภาวะแวดล้อม ได้แก่ความเข้มข้นของ Pi ในอาหาร แสง ฟิเอช และระดับความเข้มข้นของไอออนโลหะอื่นๆ เช่น Na^+ , K^+ และ Mg^{++}

เมื่อสาหร่ายเกิดการขาด Pi จะแสดงอาการคล้ายกับการขาดธาตุ

ไนโตรเจนคือเซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แปลงคือ ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์เอ ATP, RNA และ DNA จะลดลง ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้น โดยรวมแล้วปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดภายในเซลล์จะค่อยๆลดลง ในกรณีที่มีการขาดปริมาณฟอสฟอรัสอย่างรุนแรงอาจทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงด้วย เช่น ทำให้ขนาดและรูปร่างของเซลล์เล็กลง

2.1.3.4 จุลธาตุ (microelement)

จุลธาตุเป็นธาตุที่สาหร่ายมีความต้องการน้อยมากในระดับมิลลิกรัมหรือไมโครกรัม ต่อลิตร จุลธาตุที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีดังนี้

- เหล็ก มีความสำคัญต่อเมแทบอลิซึมของไนโตรเจนโดยที่ ferredoxin จะทำหน้าที่เป็น electron donor สำหรับไนเตรต (NO_3^-) และไนไตรต์ (NO_2^-) (Versteat, 1980) นอกจากนี้เหล็กยังมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงเพราะเกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์รงควัตถุ (chlorophyll a และ C-phyococyanin) (Oquist, 1971) โดยที่ ferredoxin และ iron-sulfur proteins เป็นตัว acceptor ของ photosystem I (PSI) ซึ่งเป็น องค์ประกอบที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยสาหร่ายจะสะสมเหล็กไว้ในเซลล์ เมื่อเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary) สาหร่ายจะขาดเหล็กทำให้รงควัตถุถูก ทำลายเซลล์จึงมีสีซีดและเกิดการสะสมน้ำตาลกลูโคส

- โบรอน แมงกานีส และทองแดง (boron, manganese and copper)
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอมมีความต้องการโบรอน ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวไม่ต้องการ หน้าที่ของโบรอนยังไม่ชัดเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม สาหร่ายทุกชนิดที่ทำการสังเคราะห์แสงจะต้องการแมงกานีสและทองแดง เพราะธาตุทั้งสองมีความจำเป็นต่อ electron transport system นอกจากนี้แมงกานีสและทองแดงยังทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (co-factor) ของเอนไซม์หลายชนิด ระดับความเข้มข้นของแมงกานีสที่พอเพียงสำหรับการเจริญของสาหร่ายประมาณ 10^{-6} โมล และสาหร่ายจะแสดงอาการขาดธาตุนี้เมื่อความเข้มข้นต่ำกว่า 10^{-8} โมล

- โมลิบดีนัม วาเนเดียม โคบอลต์ และนิกเกิล (molybdenum, vanadium, cobalt and nickel)

โมลิบดีนัมทำหน้าที่สำคัญทางด้านเมแทบอลิซึมของไนโตรเจนได้แก่
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nitrate reductase และการตรึงไนโตรเจน ดังนั้นสาหร่ายทุกชนิดที่ต้องการไนโตรเจนผ่านกระบวนการโคกระบวนการหนึ่งจึงมีความต้องการธาตุนี้

- วาเนเดียมจำเป็นต่อสาหร่ายสีเขียว แต่หน้าที่ที่แท้จริงของธาตุนี้อย่างไรยังไม่ทราบแน่ชัด สาหร่ายหลายชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการโคบอลต์ หรือวิตามินบี 12 ที่มีโคบอลต์เป็นส่วนประกอบอยู่ เมื่อสาหร่ายขาดธาตุโคบอลต์อัตราการเจริญจะลดลง 25-75% เนื่องจากโคบอลต์ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายหมู่เมทิล (methyl group) ในเมแทบอลิซึม

- นิกเกิล สาหร่ายมีความต้องการในระดับต่ำมาก ๆ บางครั้งนิกเกิลอาจเป็นพิษต่อสาหร่าย เช่น *Navicula pelliculosa* แต่ก็จำเป็นสำหรับสาหร่ายส่วนใหญ่ เช่น *Oscillatoria* sp. โดยที่นิกเกิลมีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ urease ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการดูดซึมยูเรียเข้าไปในเซลล์

- ซิลิกอน และเซเลเนียม (silicon and selenium)

สาหร่ายหลายชนิดมีซิลิกอนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งไคโตะคอม สาหร่ายสามารถดูดซึมซิลิกอนที่อยู่ในรูปอนุโมลซิลิเกต (SiO_4) เท่านั้น สำหรับเซเลเนียมพบว่าเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับสาหร่ายบางชนิด แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นพิษสำหรับสาหร่ายบางสายพันธุ์ เช่น *Scenedesmus dimorphus* และ *Anabaena cylindrica* โดยทั่วไปการเติมเกลือซิลิเกตจะเร่งการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แต่จะยับยั้งการเจริญของไคโตะคอม

2.1.4 อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อต้องการให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น สาหร่ายมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมดังนี้

2.1.4.1 การตอบสนองต่อแสง (response to light)

การตอบสนองต่อแสงที่เกิดขึ้นมี 2 กระบวนการคือ photo-inhibition

และ photo-inactivation ทั้งสองกระบวนการนี้จะลดประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากรงควัตถุถูกทำลายจากการได้รับแสงที่มีความเข้มมากเกินไป โดยปรากฏการณ์ photo-inhibition จะเกิดขึ้นเมื่อมีความเข้มของแสงประมาณ 80 หรือ 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ นอก จากความเข้มของแสงแล้ว คุณภาพของแสงก็อาจทำให้เกิด photo-inhibition ได้เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งแสงอัลตราไวโอเลต ส่วนกระบวนการ photo-inactivation เป็นกระบวนการทางเคมี โดยพบว่าที่ความยาวคลื่นของแสงสีฟ้าจะทำลายเอนไซม์ ribulose-bisphosphate (RuBP) carboxylase ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง และพบว่าแสงสี ฟ้าจะทำลาย cytochrome อีกด้วย (Sokawa and Hase, 1968)

การปรับตัวของสาหร่ายต่อการได้รับแสงและการถูกบดบัง (light and shade) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุภายในเซลล์ทำให้การตอบสนองต่อการสังเคราะห์ และองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ถูกกระทบกระเทือน ลักษณะการปรับตัวต่อแสงของ สาหร่ายมีอยู่ 2 แบบคือ

แบบที่ 1 ความเข้มของแสงจะมีผลในทางย้อนกลับต่อปริมาณ คลอโรฟิลล์เอทีมี โดยในสาหร่ายที่เจริญได้เร็วจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง และมีการ ปรับตัวในเวลาอันสั้น ทำให้สาหร่ายเจริญได้ดีในสภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของ แสงอย่างกะทันหัน

แบบที่ 2 ความเข้มของแสงจะมีผลในทางย้อนกลับต่อกิจกรรม หรือปริมาณเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งจะพบในสาหร่ายที่เจริญช้า และ สามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีแสงจำกัด จึงมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในสัดส่วนที่น้อยกว่า

การตอบสนองของสาหร่ายต่อแสงในอีกลักษณะหนึ่งได้แก่ การเคลื่อนที่ หาแสง (active movement) หรือหนีแสง (passive movement) แต่ละเคลื่อนที่ได้ช้าหรือเร็ว นั้น ขึ้นกับโครงสร้างของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ คุณสมบัติข้อนี้สามารถนำมาใช้ ประโยชน์ในการเก็บเกี่ยวเซลล์หรือใช้ในการแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์

2.1.4.2 การตอบสนองต่ออุณหภูมิ (response to temperature)

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและกิจกรรมของเซลล์สาหร่ายมีอยู่ 2

ลักษณะ ประการแรกได้แก่ ผลที่มีต่อองค์ประกอบของโครงสร้างของเซลล์ โดยเฉพาะใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนของโปรตีนและไขมัน ประการที่สอง ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเซลล์ในแง่ของการกระตุ้นพลังงานในปฏิกิริยาต่างๆ ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบอีกหลายอย่างตามมาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ คือ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในเวลากลางคืน อัตราการหายใจจะเพิ่มขึ้นในอัตรา exponential เช่นกัน ส่วนอิทธิพลของอุณหภูมิต่อองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย Sato และ Murata (1980) พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อองค์ประกอบของกรดไขมัน สาหร่ายที่เจริญระหว่างอุณหภูมิ 22-38 องศาเซลเซียส เช่น *Anabaena variabilis* จะสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัว ได้มากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว

2.1.4.3 ความเป็นกรด-เบส

สาหร่ายแต่ละชนิดเจริญได้ในระดับพีเอชที่แตกต่างกัน ซึ่งส่วนมากจะสัมพันธ์โดยตรงต่อความสามารถในการใช้สารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งรูปของอนินทรีย์คาร์บอนในน้ำ (CO_2 , HCO_3^- หรือ CO_3^{2-}) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญได้ดีที่พีเอชเป็นเบสในช่วง 7.5-11 เนื่องจากสาหร่ายเหล่านี้สามารถใช้ HCO_3^- ในการสังเคราะห์แสง (Coleman and Colman, 1981)

2.1.4.3 การตอบสนองต่อความเค็ม (response to salinity)

สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีความทนทานต่อความเค็มไม่เท่ากัน บางชนิดทนเกลือได้ในระดับไม่กี่มิลลิโมลาร์ ในขณะที่บางชนิดเจริญได้ดีในน้ำเกลือที่เข้มข้น ดังนั้นจึงแบ่งสาหร่ายได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับระดับความเค็มได้แก่ สาหร่ายที่ทนเกลือ (halotolerant algae) เป็นสาหร่ายที่สามารถทนต่อความเค็มได้ดี ในขณะที่สาหร่ายที่ชอบเกลือ (halophilic algae) ต้องการปริมาณเกลือที่เข้มข้นพอจึงจะเจริญได้ดี

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับถั่วเขียว

2.2.1 พันธุ์ถั่วเขียว

การพิจารณาชนิดพันธุ์ของถั่วเขียวบางครั้งใช้สีของเมล็ดเป็นเกณฑ์ เช่น ถั่วเขียวผิวมันเมล็ดใหญ่ ถั่วเขียวธรรมดาหรือถั่วเขียวผิวด้าน ถั่วเขียวสีทอง ถั่วเขียวผิวดำ เหล่านี้เป็นต้น แต่ในปัจจุบันพันธุ์ของถั่วเขียวได้รับการพัฒนาปรับปรุงจากพันธุ์พื้นเมือง จนกลายเป็นพันธุ์ใหม่ๆขึ้นมาอีกมากมาย เช่น พันธุ์อุทอง 1 พันธุ์ชัยนาท 36 พันธุ์ชัยนาท 60 พันธุ์กำแพงแสน 1 พันธุ์กำแพงแสน 2 และพันธุ์ มก.1 ซึ่งแต่ละพันธุ์มีคุณสมบัติ และลักษณะประจำสายพันธุ์แตกต่างกันบ้างเล็กน้อยในด้านผลผลิต การต้านทานโรคและแมลงการตอบสนองต่อสภาพการปลูกและอายุการเก็บเกี่ยว ในที่นี้จะกล่าวถึงพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยเพียง 1 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน 2 ถั่วเขียวพันธุ์นี้ได้ทำการคัดเลือกมาทำการศึกษา เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่มีอายุสั้น แต่มีข้อเสียคือมีความต้านทานโรคต่ำ ลำต้นขาวใบมีขนอ่อนปกคลุม มีดอกเป็นช่อ ช่อดอกหนึ่งๆมีดอกประมาณ 10-25 กลีบ ดอกมีสีเหลือง เมื่อฝักแก่จะมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม เมล็ดมีสีเขียวผิวมัน น้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 6.2 กรัม ผลผลิตเฉลี่ย 120 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะที่ดีคือ มีอายุสั้น ให้ผลผลิตสูง แต่มีข้อเสียคืออ่อนแอต่อโรค

2.2.2 ฤดูปลูก

ฤดูการปลูกถั่วเขียวมีดังนี้

ก. ฤดูแล้ง เป็นการปลูกในนาหลังจากการเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว ประมาณเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์

ข. ต้นฤดูฝน เริ่มปลูกในเดือนพฤษภาคมและมิถุนายน โดยระบบการปลูกถั่วเขียวสามารถทำได้หลายวิธีเช่น ระบบปลูกพืชสลับระหว่างข้าวกับถั่วเขียวพบได้ ในเขตภาคกลางบริเวณพื้นที่ที่อาศัยน้ำฝน เช่น อ. บางแพ จ. ราชบุรี จะปลูกถั่วเขียวก่อนการไถนา

ค. ปลายฤดูฝน โดยทั่วไปจะปลูกประมาณเดือนสิงหาคมและกันยายน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งในบางท้องถิ่นนิยมปลูกถั่วเขียวหลังการเก็บเกี่ยวพืชหลัก เช่น หลังเก็บเกี่ยวข้าวโพดหรือปลูกระหว่างร่องแถวเป็นระบบการปลูกแซม นิยมทำกันในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ขอนแก่น อุดรธานี

2.2.3 การเลือกพื้นที่ปลูกและการปลูกถั่วเขียว

ถั่วเขียวสามารถเจริญเติบโตได้ในดินเกือบทุกชนิด แต่จะชอบดินที่มีความเป็นกรดและเบสประมาณ 6.5-7.0 ลักษณะดินเป็นดินร่วนระบายน้ำดีมีธาตุอาหารพอประมาณ การปลูกถั่วเขียวอาจปลูกแซมกับพืชอื่นๆ เช่น มันสำปะหลังและถั่วจะช่วยให้ลดการระบาดของของวัชพืชและเป็นการใช้พื้นที่ให้เกิดประโยชน์รวมทั้งเป็นการเพิ่มรายได้ให้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วเขียวจะช่วยบำรุงดินและเพิ่มอินทรีย์วัตถุในดิน ช่วยลดการเสื่อมโทรมของดินให้ช้าลง ในปัจจุบันนี้การทำเกษตรธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำนาธรรมชาติ ได้นำเอาถั่วเขียวมาเป็นพืชหลักในการหว่านพร้อมกับข้าว เพื่อเป็นการเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้กับข้าวเมื่อถั่วสลายตัวกลายเป็นปุ๋ย วิธีการที่นิยมทำกัน คือ การหว่านถั่วพร้อมกับข้าวในวันเดียวกัน เสร็จแล้วคลุมฟางหนา 3-5 นิ้ว เมื่อฝนตกลงมาหรือมีความชื้นเพียงพอ ถั่วจะงอกก่อน 3-5 วัน จากนั้นข้าวจะงอกตามมา เมื่อถั่วโตขึ้นกำลังจะออกดอก ถ้าควบคุมน้ำได้ให้ปล่อยน้ำขังในนาจะทำให้ต้นถั่วเน่าตายกลายเป็นปุ๋ยให้กับข้าว

2.2.4 คุณค่าอาหารจากถั่วเขียว

คุณค่าอาหารจากถั่วเขียวมีมากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าถั่วเขียวไม่ใช่พืชที่ให้ไขมัน หรือโปรตีนเป็นหลัก (ไซยา 2539) แต่จะมีแป้งปริมาณสูงถึง 65% จึงเหมาะสำหรับนำไปทำแป้งผงในอุตสาหกรรมอาหาร หรือใช้ทำขนม และในถั่วเขียวยังประกอบด้วยโปรตีน 23.4% ไขมัน 1.2% ส่วนวิตามินและเกลือแร่ ประกอบด้วยแคลเซียม 125 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 340 มิลลิกรัม เหล็ก 5.7 มิลลิกรัม วิตามินเอ 130 มิลลิกรัม วิตามินบี 1 0.66 มิลลิกรัม วิตามินบี 2 0.22 มิลลิกรัม วิตามินซี 10 มิลลิกรัม และไนอะซีน 2.4 มิลลิกรัม

อุตสาหกรรมหลักอีกอย่างหนึ่งของเมล็ดถั่วเขียวคือ การทำถั่วอกซึ่งนับเป็นอาหารผักสำคัญอย่างหนึ่งสามารถนำมาประกอบอาหารได้มากมายหลายชนิด ในวันหนึ่งๆ จะมีคนบริโภคถั่วอกเป็นปริมาณหลายหมื่นตัน

ตารางที่ 2

คุณค่าอาหาร จากถั่วเขียว	เมล็ดถั่วเขียว (เปอร์เซ็นต์)	แป้งถั่วเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ถั่วงอก (เปอร์เซ็นต์)	วันเส้น (เปอร์เซ็นต์)
ไขมัน	1.20	0.20	0.20	0.60
แป้ง	64.00	85.50	6.60	82.90
โปรตีน	23.40	0.20	3.80	0.13

ตารางที่ 2 ถั่วเขียวและผลิตภัณฑ์ถั่วเขียวแปรรูป มีคุณค่าอาหารดังนี้



2.3 โรคเน่าดำในถั่วเขียว

ถั่วเขียวเป็นพืชตระกูลถั่วที่พบว่ามีเชื้อโรคพืชเข้ามาทำลายหลายชนิด แต่ความรุนแรงของโรคจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ พันธุ์ที่ปลูก ฤดูปลูก ความอุดมสมบูรณ์ของดิน สภาพดินฟ้าอากาศ (Litzenberger, 1974 ; Rachie, 1974) การเกิดโรคเน่าดำ ตามพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกถั่วเขียว เป็นการระบาดของที่ทำความเสียหายในพื้นที่เขตร้อนและร้อนชื้นซึ่งได้แก่ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Charles, 1977) เมื่อเกิดการระบาดของโรคจะยากต่อการควบคุม ทำให้ผลผลิตของถั่วเขียวลดลง

2.3.1 เชื้อราสาเหตุของโรค

เชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำ ในถั่วเขียวคือ *Macrophomina phaseolina* (Kaiser and Mossahebi, 1968 ; Rangaswami, 1975) เป็นเชื้อราที่อยู่ใน class Deuteromycetes เจริญอยู่ได้ในดินและเศษซากพืชที่ถูกทำลาย (Edmuds, 1964) หรืออาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในดิน (Ghaffar and Zentmyer, 1968) โดยอยู่ในรูป sclerotium และดินเป็นแหล่งแรกของการติดเชื้อ (primary source of inoculum) (Smith, 1969) ซึ่ง sclerotium สามารถอาศัยในพืชและดินได้หลายๆปี (Dhibgra and Sinclair, 1977)

วงชีวิต (life cycle) ของเชื้อ *M. phaseolina* มีดังนี้

ก. ระยะเส้นใย (mycelial stage) พบว่า *M. phaseolina* จะผลิตเส้นใย ในระยะของการเพาะเลี้ยง โดยจะมีลักษณะสีขาวถึงน้ำตาลหรือเทา เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเป็นสีดำ เส้นใยจะเจริญจากจุดศูนย์กลางและแผ่กระจายเป็นวงแหวน การแตกแขนงของเส้นใย (hyphal branches) จะเป็นมุมแหลม

ข. ระยะการสร้างสปอร์ (pycnidial stage) พบว่าเมื่อยังอ่อน pycnospore มีลักษณะเป็นรูปไข่ เซลล์ใส (hyaline) มีขนาดโดยเฉลี่ย 23 x 11 ไมครอน เมื่อแก่จะมี 2 เซลล์ สีเข้มขึ้น มีขนาดโดยเฉลี่ย 26 x 12 ไมครอน

mature pycnidium กลมหรือค่อนข้างกลม สีดำ มี ostiole ลักษณะพองกลม

(erupt) มีขนาดตั้งแต่ 90-200 ไมครอน

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

conidiospore ก้านชูสปอร์จะใสไม่มีสี ไม่มีผนังกัน เรียกลักษณะนี้ว่า Botryodiplodia type หรือ Macrophomina stage (Thirumalachar, 1953)

การสร้าง pycnidium ไม่ใช่ลักษณะประจำของเชื้อนี้ที่เดียว แต่จะขึ้นกับชนิดของอาหาร สิ่งแวดล้อม ซึ่งลักษณะของ pycnidium และ sclerotium จะแตกต่างกันตาม strain และชนิดของพืชที่อาศัย นอกจากนี้ยังพบ pycnidial stage เสมอบนลำต้นของปอกระเจา ถั่ว และทานตะวัน

ก. sclerotial stage จะพบ sclerotium เป็นเม็ดกลมๆ (globose) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน (Wyllie and Brown, 1970) sclerotium เมื่อแก่มีสีดำ เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน เชื้อราจะเจริญเป็นเส้นใย และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน จะสร้าง sclerotium (Bhattacharya and Samaddar, 1976) โดยลักษณะของ sclerotium แสดงในภาพที่ 2

2.3.2 ลักษณะอาการ

อาการระยะต้นกล้า จะแสดงอาการเป็นแผลชำบริเวณ hypocotyl และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมแดง ในสภาพอากาศแห้งแล้ง ที่อุณหภูมิสูงสีของรากและลำต้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและดำ ในที่สุดเกิดแห้งเหี่ยวตาย ดังแสดงในภาพที่ 3

อาการที่พบเสมอๆ จะปรากฏที่ผิวภายนอกบริเวณโคนลำต้นจะเป็นสีน้ำตาลเข้ม โดยมี sclerotium สีดำเกิดเป็นกลุ่มกระจุกกระจายและ sclerotium มีขนาด 0.05-0.2 มิลลิเมตร (Mackie, 1932) มองคล้ายหยดดำนูน และเนื่องจากเนื้อเยื่อภายในถูกทำลายเมื่อมีลมแรงหรือใช้มือโยกเพียงเบาๆ ลำต้นจะหักพับ ส่วนใหญ่จะเกิดบริเวณโคนเหนือพื้นดิน

เชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายระยะในวงจรชีวิต ได้แก่ mycelial stage, pycnidial stage และ sclerotial stage ส่วนมากจะพบ sclerotial stage มากกว่าระยะอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การแพร่ระบาด

ปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรง จะเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ความชื้นในดิน (available soil moisture) 25-80% ถ้าความชื้นมากกว่า 80% เชื้อจะไม่เข้าทำลายพืช ถ้าอุณหภูมิในดินประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส จะเกิดสภาวะ drought stress ต้นพืชที่อยู่ในสภาพ drought stress จะทำให้อ่อนแอต่อโรค จึงเหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อ (Hsi, 1961 ; Edmuds, 1964 ; Watanabe and Smith, 1975 ; Smith, 1969) ในสภาพ water stress ถ้าเกิดหลังการออกดอกจะเพิ่มความรุนแรงของโรคเน่าดำถึง 90%

เชื้อนี้อยู่ข้ามฤดูได้โดย sclerotium จากต้นพืชที่เป็นโรคซึ่งร่วงลงสู่ดิน หรืออยู่ในเศษซากพืชที่เป็นโรค โดยทั่วไปจำนวน sclerotium ต่อดิน 1 กรัม จะมีจำนวนมากกว่า 1,000 เม็ด (Papavizas and Klag, 1975) และจำนวน sclerotium จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นถ้าปลูกพืชชนิดเดียวกันติดต่อกันหลายปี การงอกของ sclerotium ไม่จำเป็นต้องอาศัยอาหารจากภายนอก (Bhattacharya and Samaddar, 1976) และการงอกในดินจะช้าหรือเร็วนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยของสภาพแวดล้อม โดยเส้นใยของเชื้อจะเข้าจากทางรากสู่ลำต้น เมื่อดำเนินเป็นแผลเนื่องจากเปลือกแตกโดยเครื่องมือการเกษตร หรือเนื่องจากแมลงไส้เดือนฝอย ในสภาพที่แมลง ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายร่วมด้วย โรคจะเกิดอย่างรวดเร็วและรุนแรง

2.3.4 การป้องกันกำจัดโรคเน่าดำ

2.3.4.1 ปลูกพืชหมุนเวียน

2.3.4.2 การทำลายผลผลิตโดยวิธีเฉพาะ เมื่อถึงระยะเวลาเก็บเกี่ยว ถ้าลักษณะอาการของโรคแสดงให้เห็นภายนอก เมื่อพืชใกล้แก่ (physiological maturity) และความชื้นในดินระหว่าง 30-35% ซึ่งเมล็ดยังไม่สูญเสียน้ำหนักแห้งควรรีบเก็บเกี่ยวก่อนที่จะล้มและเมล็ดเสียหายอย่างรุนแรง

2.3.4.3 ปรับปรุงดินในแปลงเพาะปลูกให้มีการให้น้ำที่ดี เป็นการควบคุมโรคนี้วิธีหนึ่ง ให้มีความชื้นในดิน (available soil moisture) มากกว่า 80% เชื้อนี้จะไม่เข้าทำลายและเป็นการลด drought stress ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.4 กำจัดวัชพืชและแมลง

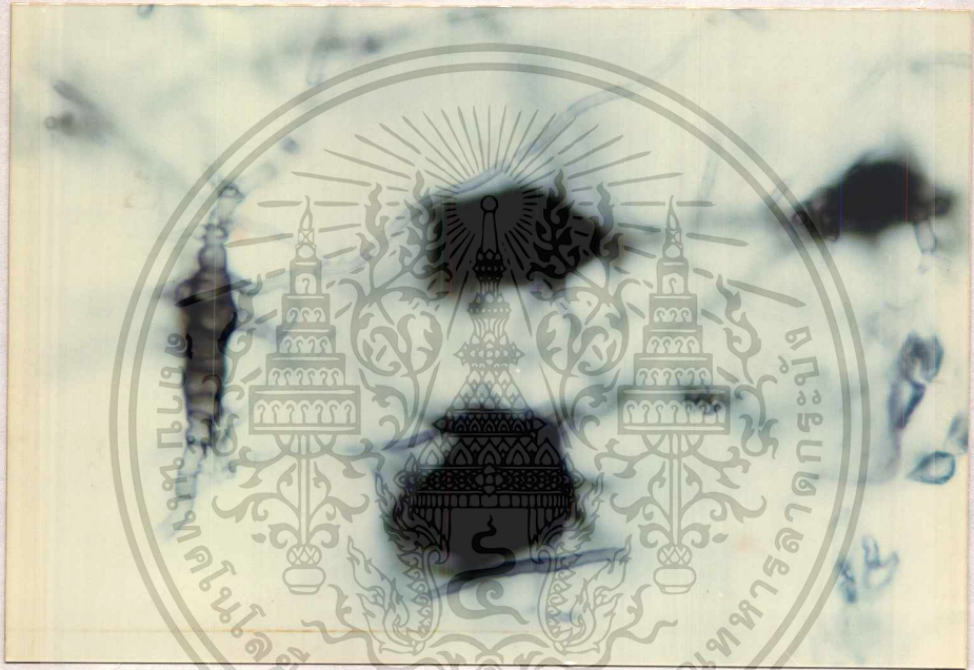
2.3.4.5 การให้น้ำอย่างสมดุล

2.3.4.6 คลุกเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกด้วยสารเคมีกำจัดเชื้อรา เพื่อป้องกันเชื้อ
เข้าทำลายในระยะต้นกล้า และใช้การรมด้วยสารเคมี (soil fumigation) เพื่อทำลายเชื้อที่
อาศัยอยู่ในดิน

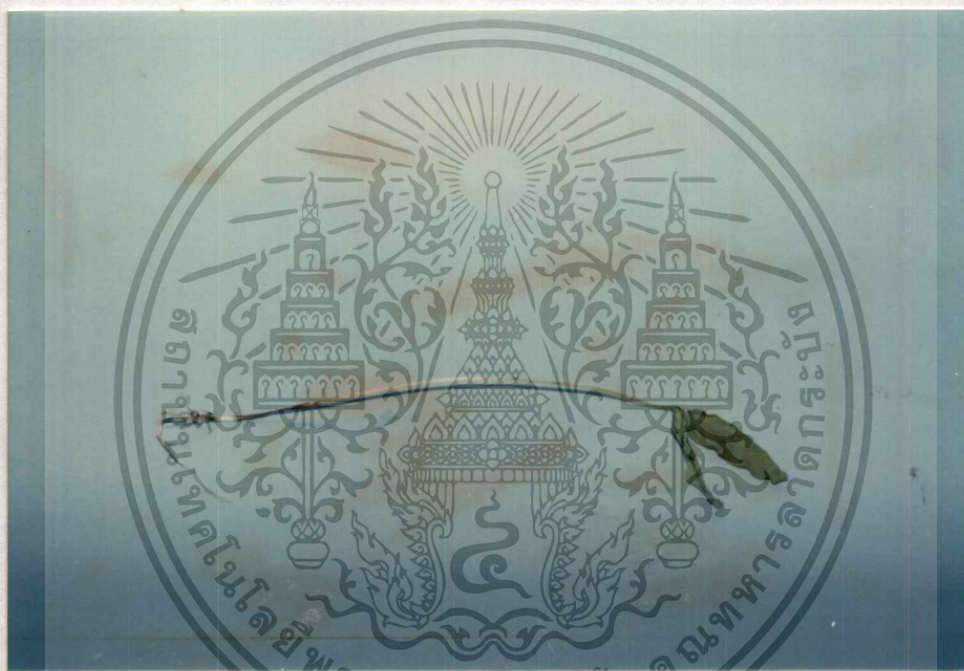
2.3.4.7 ใช้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพ

2.3.4.8 ใช้พันธุ์ต้านทานโรค





ภาพที่ 2 แสดงลักษณะ sclerotium ของเชื้อรา *M. phaseolina*



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะลำต้นถั่วเขียวที่เป็นโรคเน่าดำ เมื่อสังเกตลักษณะจากภายนอกจะเห็นเป็นสีน้ำตาลดำหรือดำ บริเวณโคนลำต้น

2.4 การป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืชด้วยสารป้องกันและกำจัดเชื้อรา

สารพิษป้องกันเชื้อรา (fungitoxicant) หมายถึงสารที่มีพิษต่อเชื้อราโดยตรง ไม่ว่าจะเป็นโดยการฆ่าหรือการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา การป้องกันและกำจัดเชื้อรามีหลายวิธี เช่น

2.4.1 การป้องกันเชื้อราโรคพืชโดยใช้สารเคมี

การใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อราโรคพืชนับเป็นวิธีที่รู้จักแพร่หลายมากที่สุดแต่ไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุด เพราะการกำจัดด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ผู้ใช้ต้องมีความรู้เกี่ยวกับการใช้สารเคมีพอสมควรเพราะเป็นอันตรายต่อมนุษย์พืชและสัตว์ได้ รวมถึงสารเคมียังทำลายสภาวะแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีในการป้องกันโรคพืชเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมาก ทั้งนี้เพราะหากใช้อย่างถูกต้องแล้วจะเห็นผลอย่างชัดเจนในเวลารวดเร็วกว่าการป้องกันด้วยวิธีอื่นๆ ซึ่งชนิดของสารเคมีที่ใช้ป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช จะอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น แบบพ่นเป็นละอองน้ำ (spray) พ่นเป็นผง (dust) การใช้ในรูปแก๊ส (fumigant) การใช้แบบทา (paint) การใช้ในลักษณะของเหลวคล้ายแป้งเปียก (paste) การใช้วิธีหว่านยาชนิดเม็ด (granula) และชนิดดูดซึม (systemic) (สมศิริ 2529) สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืชมีหลายชนิด ในที่นี้จะขอกกล่าวถึงสารเคมีที่ป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชที่ใช้ในการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าสารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้แก่ benomyl, carbendazim, mancozeb และ prochloraz. $MgCl_2$ complex ส่วนสารเคมี benomyl, mancozeb และ triabandazole ใช้ป้องกันและกำจัดเชื้อรา *M. phaseolina* สารเคมี captan และ polyoxin ป้องกันและกำจัดเชื้อรา *Curvularia* sp. (กองโรคพืชและจุลชีววิทยา 2535)

ตารางที่ 3

สารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อรา		เชื้อราสาเหตุโรคพืช (pathogens)
ชื่อสามัญ	ชื่อการค้า	
benomyl	Benlate 50% WP, Fundazol	<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. <i>M. phaseolina</i>
captan	Orthocide 50% WP, Carbicide 50% WP	<i>Curvularia</i> sp.
carbendazim	Derosal 60% WP	<i>Colletotrichum</i> sp.
mancozeb	Azinmag 80% WP	<i>Colletotrichum</i> sp., <i>M. phaseolina</i>
polyoxin	Polyoxin-Z 2.2% WP	<i>Curvularia lunata</i>
prochloraz. MgCl ₂ complex	Octave 50% WP	<i>Colletotrichum</i> sp.
triabendazole	Tecto 90% WP	<i>M. phaseolina</i>

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช

หมายเหตุ WP = wettable powder (เป็นยาผงที่ใช้สำหรับทำเป็น
สารแขวนลอยในน้ำ)

2.4.2 การป้องกันเชื้อราโรคพืชโดยใช้สารปฏิชีวนะ

การนำสารปฏิชีวนะมาใช้กับพืชนั้นมีมานานแล้ว ซึ่งสารปฏิชีวนะที่นำมาใช้รักษาโรคพืชระยะแรกนั้นเช่น streptomycin, tetracycline, cycloheximide และ griseofulvin เป็นต้น โดยเฉพาะ streptomycin และ tetracycline จะควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย ส่วนการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราใช้ cycloheximide และ griseofulvin สำหรับ cycloheximide ฆ่าเชื้อราได้ดีมาก แต่มีข้อเสียคือทำลายเซลล์พืชด้วย ประโยชน์ของการใช้สารปฏิชีวนะทางการเกษตรแทนวัตถุมีพิษคือปริมาณของสารปฏิชีวนะที่ใช้ต่ำมากประมาณ 10-50 พีพีเอ็ม และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารที่ฉีดพ่นไปหนึ่งหน่วยพื้นที่นั้นจะน้อยกว่าการใช้วัตถุมีพิษมาก ที่สำคัญคือไม่เป็นพิษกับพืชหรือถ้าเป็นก็น้อยมากและสารปฏิชีวนะจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยจุลินทรีย์ในดิน จึงไม่มีปัญหาเรื่องมลพิษ สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราโรคพืชแสดงในตารางที่ 4 พบว่า actidione (cycloheximide) เป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อราในดิน ส่วน aureofungin และ blastidicin ยับยั้งเชื้อรา *Bipolaris maydis* และ blastidicin S เป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *Streptomyces grieseochromogens* ยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea*

ตารางที่ 4

สารปฏิชีวนะป้องกันและกำจัดเชื้อรา	เชื้อราสาเหตุโรคพืช
actidione	Soil fungi
aureofungin (from <i>Streptomyces cinnamonosus</i> var. <i>terricola</i>)	<i>Bipolaris maydis</i> , <i>Pyricularia grisea</i>
bacillomycin	<i>Bipolaris maydis</i>
blasticidin S (from <i>Streptomyces grieseochromogens</i>)	<i>Pyricularia grisea</i>

ตารางที่ 4 สารปฏิชีวนะที่ใช้ป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช

2.4.3 การป้องกันเชื้อราโรคพืชโดยชีววิธี

การป้องกันและการควบคุมเชื้อราโรคพืชโดยชีววิธี เป็นวิธีหนึ่งของการควบคุมปริมาณโรคพืชโดยใช้สิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์

ข้อได้เปรียบของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคือประหยัด ได้ผลถาวรและปลอดภัย แต่มีข้อจำกัดของการควบคุมคือใช้เวลานานกว่าจึงจะเห็นผล ในทางตรงกันข้ามการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราโรคพืชได้ผลรวดเร็วและเป็นที่พอใจของเกษตรกร ตัวอย่างการป้องกันเชื้อราโดยใช้จุลินทรีย์ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ยับยั้งเชื้อรา *Curvularia oryzae* เชื้อ *Chaetomium globosum* ยับยั้งเชื้อรา *Curvularia lunata* ส่วนเชื้อ *Streptomyces griseus* ยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidematum*

ตารางที่ 5

จุลินทรีย์ป้องกันและกำจัดเชื้อรา	เชื้อราสาเหตุโรคพืช
<i>Bacillus subtilis</i> NSRS 89-24	<i>Pyricularia grisea</i> , <i>Curvularia oryzae</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Curvularia lunata</i>
<i>Chaetomium cupreum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> และ <i>Fusarium lycopersioi</i>
<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Pythium aphanidematum</i>

ตารางที่ 5 จุลินทรีย์ที่ใช้ป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช

ข้อดีและข้อเสียในการใช้สารเคมี สารปฏิชีวนะและการควบคุมโดยชีววิธี เพื่อป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6

วิธีการควบคุมเชื้อราโรคพืช	ข้อดี	ข้อเสีย
การใช้สารเคมี	- ได้ผลรวดเร็ว - หาซื้อง่ายเนื่องจากมีจำหน่ายตามท้องตลาด	- เกิดมลพิษกับสภาพแวดล้อมและสารพิษตกค้างในผลผลิตก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค - การใช้สารเคมีเป็นเวลานานอาจเป็นเหตุให้โรคพืชเกิดการดื้อต่อสารเคมี - ราคาแพง
การใช้สารปฏิชีวนะ	- ไม่มีพิษตกค้างในผลผลิตทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม	- ราคาแพง
การควบคุมโดยชีววิธี	- ประหยัด - ได้ผลถาวร - ปลอดภัย	- ขึ้นกับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง ความเป็นกรด-เบส ของดิน จึงยากแก่การควบคุม

ตารางที่ 6 แสดงข้อดีและข้อเสียของการป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืชโดยวิธีต่างๆ

คุณสมบัติที่ดีของสารป้องกันและกำจัดเชื้อรา

1. สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี ไม่มีผลข้างเคียงต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

2. สามารถทำลายเชื้อราโรคพืชได้มากชนิด (broad spectrum)

3. ไม่ทำให้เชื้อราเกิดการดื้อยาเมื่อใช้ไปนานๆ

4. ไม่เป็นอันตรายต่ออวัยวะที่สำคัญของร่างกาย เช่น ตับ ไต สมอ

5. ละลายน้ำได้ดี ซึ่งจะทำให้การดูดซึมเป็นไปอย่างรวดเร็ว

6. ออกฤทธิ์เร็ว แต่ฤทธิ์อยู่ได้นาน

7. ใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็มีประสิทธิภาพต่อการควบคุมและกำจัดเชื้อราได้

8. ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างต่ำ



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. สารเคมีสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็น analytical grade ของ Fluka และ Sigma
2. สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธีแอนโทรอน (anthrone) โมลิชส์ (Molisch's) นินไฮดริน (ninhydrin) ไบยูเรต (biuret) และ เอนไซม์โปรติเอส (enzyme protease) เป็น analytical grade ของ Merck และ Sigma
3. อาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar (PDA) ของ Difco
4. จานเพาะเชื้อพลาสติก (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ของ Bibby Sterilin LTD, U.K.
5. ตะข่ายกรองแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาด 108 ไมครอน
6. แผ่นทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (BBL blank paper discs ของ Becton Dickinson)
7. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman filter paper No.1)
8. กระดาษเพาะเมล็ด
9. เครื่องแก้ว เช่น ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง กรวยกรอง บีกเกอร์ แท่งแก้ว-คนสาร ฯลฯ
10. เข็มเย็บเชื้อ (loop, needle)
11. เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)
12. ถัง carboy สำหรับเลี้ยงสาหร่ายความจุ 12 ลิตร ของ Nalgene
13. เครื่องเขย่า (shaker)
14. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ Sorvall รุ่น SS-3
15. เครื่องปั่นละเอียดให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer) ของ Polytron PT 205
16. เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator) ของ Buchi รุ่น 461

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. เครื่องทำให้เซลล์แห้งที่จุดเยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียส (lyophilizer) ของ Edwaed Britain รุ่น 501
 18. ตู้อบเครื่องแก้ว (oven) ของ Memmert รุ่น Modell 600
 19. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Tomy Seiko Japan รุ่น SS-245
 20. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ของ Olympus Tokyo รุ่น CH 30
 21. ตู้แช่แข็ง
 22. แผ่น TLC (silica gel 60F₂₅₄ pre-coat for preparative; Merck, Germany)
 23. แผ่น TLC อลูมิเนียม (TLC aluminum sheets silica gel 60F₂₅₄; Merck, Germany)
 24. ผงแป้ง (talc) ของ White Swan Brand ขนาด 325 Mesh
 25. สารลดแรงตึงผิว (Tween 20)
 26. ดินสิดา
 27. เชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 165 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
 28. ถั่วเขียวพันธุ์ก้านแพงแสน 2 ได้มาจากสถานีทดลองพืชไร่ อ. ศรีสำโรง
- จ. สุโขทัย
29. เชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 6 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราที่ก่อโรคกับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งได้รับความเอื้อเฟื้อจากกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีรายชื่อดังนี้

<i>Colletotrichum truncatum</i>	สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง
<i>Curvularia lunata</i>	สาเหตุโรคราที่เมล็ดธัญพืช
<i>Fusarium oxysporum</i>	สาเหตุโรคเหี่ยวในพืชล้มลุก
<i>Bipolaris maydis</i>	สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าวโพด
<i>Macrophomina phaseolina</i>	สาเหตุโรคเน่าดำ ในถั่วเขียว
<i>Pyricularia grisea</i>	สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว

วิธีการวิจัย

3.1 ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช

3.1.1 ขั้นตอนการเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (แสดงในภาพที่ 4)

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านการกระตุ้นการเจริญเติบโตแล้ว มาเลี้ยงในอาหาร BGA (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่ฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า (ภาพที่ 5) ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 29± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนเป็นเวลา 14 วัน

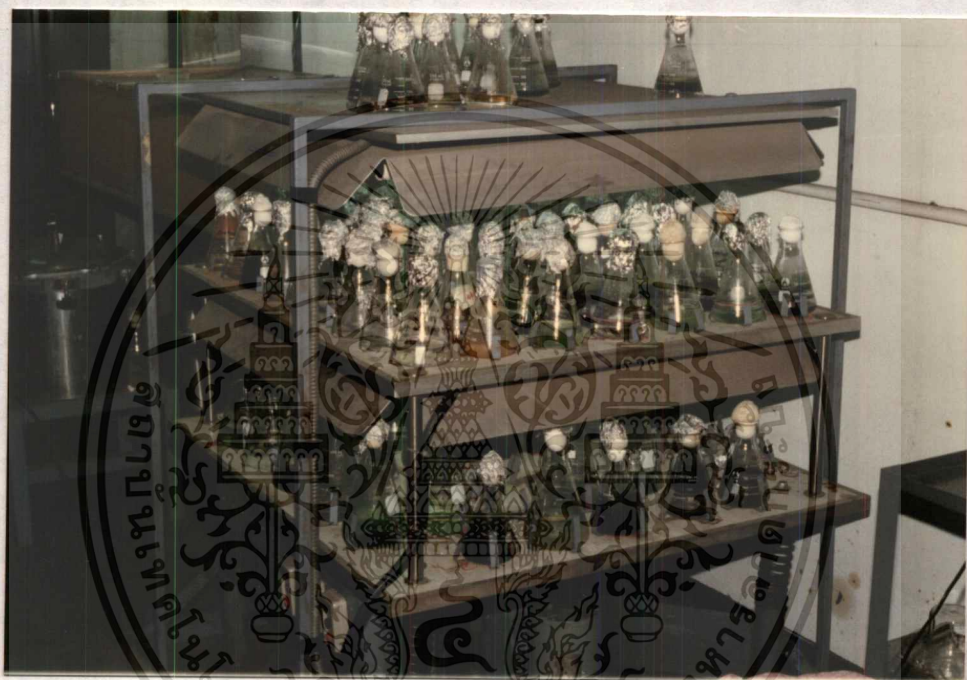
จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยกรองด้วยแผ่นกักต่อนเนื้อ ขนาด 108 ไมครอนหรือนำไปเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 20 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของเซลล์สาหร่าย ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง ก่อนนำไปสกัด

การสกัดทำโดยนำตัวอย่างสาหร่ายที่สะอาดมาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เซลล์แตก ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องปั่นละเอียด ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์แตกเป็นเนื้อเดียวกัน จึงสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) และเมทานอล (CH_3OH) ในอัตราส่วน 1:2 (ระบบทำละลาย ประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 1:2:1) กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนที่ได้จากการกรอง (filtrate) มาระเหยแห้งแบบลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง นำสารดังกล่าวมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาละลายในระบบทำละลายเดิม แล้วหยดลงบนแผ่นทดสอบ ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น



ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 แสดงสถานะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน บนเครื่อง
เขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์

3.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคพืช โดยวิธี swab inoculation และ paper disc (Bauer et al., 1966)

3.1.2.1 ขึ้นเตรียมเชื้อรา

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใส่ในจานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จานละ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนอาหารแข็ง จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา (spore suspension) โดยเจือจาง ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นับจำนวนสปอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยวิธีนับโดยตรง (direct count) โดยใช้ haemocytometer ส่วนเชื้อ *M. phaseolina* ซึ่งไม่สร้างสปอร์จะใช้วิธีนำเส้นใยของเชื้อรา มาเจือจาง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อนับจำนวนเส้นใย (dilution plate count) โดยนับจำนวนเส้นใยให้ได้ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร (Collins and Patricia, 1970)

จากนั้นจุ่มสำลี (cotton bud) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในสารแขวนลอยของเชื้อรา (swab) บนผิวหน้าอาหาร PDA จนทั่วพื้นผิวและทิ้งให้แห้ง

3.1.2.2 ขึ้นเตรียมสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

นำสารสกัด (crude algal extract) ละลายในเมทานอล แล้วหยดลงบนแผ่นทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น โดยใช้สารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผ่น ทิ้งไว้ให้แห้ง ส่วนตัวควบคุมจะหยดตัวทำละลาย (solvent system) บนแผ่นทดสอบ แทนสารสกัด

3.1.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ต่อการยับยั้งเชื้อราโรคพืช บนอาหาร PDA (แสดงในภาพที่ 6)

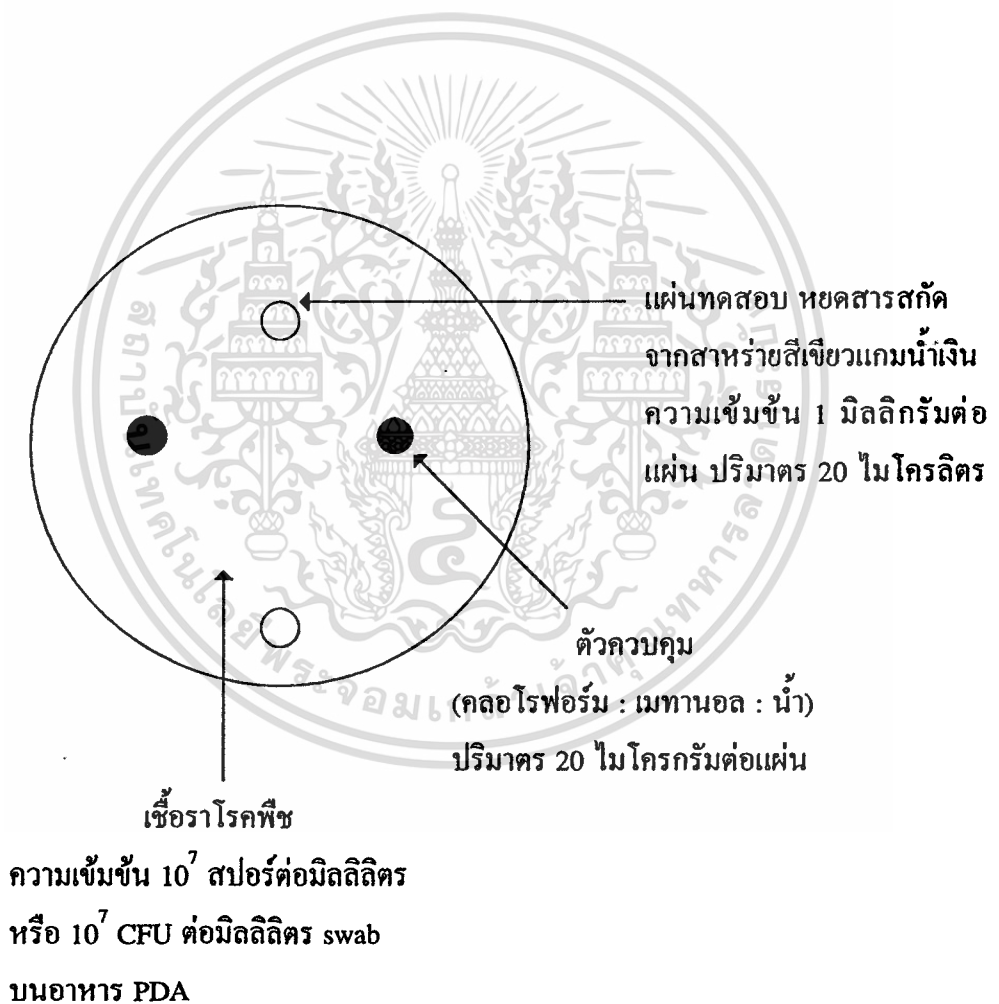
นำแผ่นทดสอบซึ่งหยดสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน วางลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่เพาะเชื้อรา โดยวางตำแหน่งตรงกันข้ามในแนวเส้นตรงและวาง

แผ่นทดสอบที่เป็นตัวควบคุม บนผิวหน้าอาหารในจานเดียวกันแบบตรงกันข้ามตามแนว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นตั้งฉากอีกแนวหนึ่ง แต่ละจานเพาะเชื้อจะวางแผ่นทดสอบ 4 แผ่นในตำแหน่งที่สมดุล บ่มที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดของโซนใส (clear zone) นำสำหรับสปีชีส์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช คีที่ สุด (ภาพที่ 7) ไปศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพที่ 6 แสดงรูปแบบของการทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อราโรคพืช โดยวิธี swab inoculation และ paper disc plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะสำหรับยีสี่เขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8906

3.1.3 การศึกษาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ระยะเวลาต่างๆ ในขบวนการหมัก

3.1.3.1 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

 นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด คือ *Calothrix* sp. TISTR 8906 ปริมาณ 0.02% โดยน้ำหนัก มาเลี้ยงในขบวนการหมักขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุนาอาหารเหลว BGA+N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มของแสง 60 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายทุกวันเป็นเวลา 20 วัน นำเซลล์ที่ได้ไปเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 4,000 g เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาทำให้แห้งโดยการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ผลิตในระยะเวลาต่างๆ ทำโดยนำสาหร่ายที่ซึ่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ในแต่ละวันมาสกัดด้วยเมทานอล จากนั้นนำมาทดสอบกับเชื้อราโรคพืชโดยวิธี swab inoculation และ paper disc plate (ดังข้อ 3.1.2) เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับสารมาตรฐานของ cycloheximide ดังภาคผนวก ค

3.1.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ต่อการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8906 มาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

3.1.4.1 การศึกษาแหล่งอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ต่อการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้สูตรอาหาร BGA, BGA+N, BG-11 และ

Allen's (ภาคผนวก ก ข้อ 1.1 1.2 และ 1.3) โดยนำอาหารดังกล่าว ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นบรรจุอาหารของแต่ละชนิดลงในขวดรูป-ชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อสาหร่ายปริมาณ 0.02% โดยน้ำหนักแห้ง ลงในอาหารแต่ละชนิด ในอาหารแต่ละชนิดจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่ อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้แสง ฟลูออเรสเซน ความเข้มของแสง $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่มีการ ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ปริมาณสูงสุดตามการทดลองในข้อ 3.1.3 นำไปหาความ สามารถในการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* โดยวิธี swab inoculation และ paper disc plate (ดังข้อ 3.1.2) การวัดการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินใช้วิธีชั่งน้ำหนักแห้ง (ดังข้อ 3.1.3.1)

3.1.4.2 ศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการ เจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยใช้โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้ความเข้มข้น 0 0.5 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร วิธีการศึกษาเหมือนข้อ 3.1.4.1

3.1.4.3 ศึกษาปริมาณไดฟอสเฟตโซเดียมไนโตรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีส่วนผสมของโซเดียมไนเตรดที่ความเข้มข้น เหมาะสม (ดังข้อ 3.1.4.2) โดยใช้ความเข้มข้นของไดฟอสเฟตโซเดียมไนโตรเจนฟอสเฟต เท่า กับ 0 0.3 0.6 0.9 1.2 1.5 1.8 และ 2.1 กรัมต่อลิตร วิธีการศึกษาเหมือนข้อ 3.1.4.1

3.1.4.4 ศึกษาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีส่วนผสมของโซเดียมไนเตรด ไดฟอสเฟตโซเดียมไนโตรเจนฟอสเฟต ที่ ความเข้มข้นเหมาะสม (ดังข้อ 3.1.4.2 และ 3.1.4.3) โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0 0.03 0.05 0.07 0.09 0.11 0.13 และ 0.15 กรัมต่อลิตร วิธีการศึกษา เหมือนข้อ 3.1.4.1

3.1.4.5 ศึกษาพีเอชเริ่มต้น ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่มีส่วนผสมของ โซเดียมไนเตรด ไดฟอสเฟตโซเดียมไนโตรเจนฟอสเฟต และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น เหมาะสม (ดังข้อ 3.1.4.2 3.1.4.3 และ 3.1.4.4) โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบส ของ

อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วย 1 นอร์แมล กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1 นอร์แมล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้เท่ากับ 5 6 7 8 9 10 และ 11 ตามลำดับ วิธีการศึกษาเหมือนข้อ 3.1.4.1

3.1.5 การศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารที่เหมาะสม ที่ระยะเวลาต่างๆ ในถัง carboy

3.1.5.1 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดคือ *Calothrix* sp.TISTR 8906 ปริมาณ 0.02% มาเลี้ยงในถัง carboy (ภาพที่ 8) ที่บรรจุอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินปริมาตร 10 ลิตร โดยให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 60 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส เข้าถัง carboy ทุกวัน

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายทุกวัน เป็นเวลา 20 วันโดยใช้กระบอกตวงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตวงสารแขวนลอยของสาหร่าย ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาทำให้แห้งโดยการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายมาสกัดด้วยเมทานอล และนำมาทดสอบกับเชื้อราโรคพืชโดยวิธี swab inoculation และ paper disc plate (ดังข้อ 3.1.2)



ภาพที่ 8 สภาวะการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตร ต่อนาที ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส

3.1.6 การศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (minimum inhibit concentration) ของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina*

เตรียมสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัม ในเมทานอลปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงบนแผ่นทดสอบ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำมาทดสอบกับเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยวิธี swab inoculation และ paper disc plate (คังซ้อ 3.1.2)

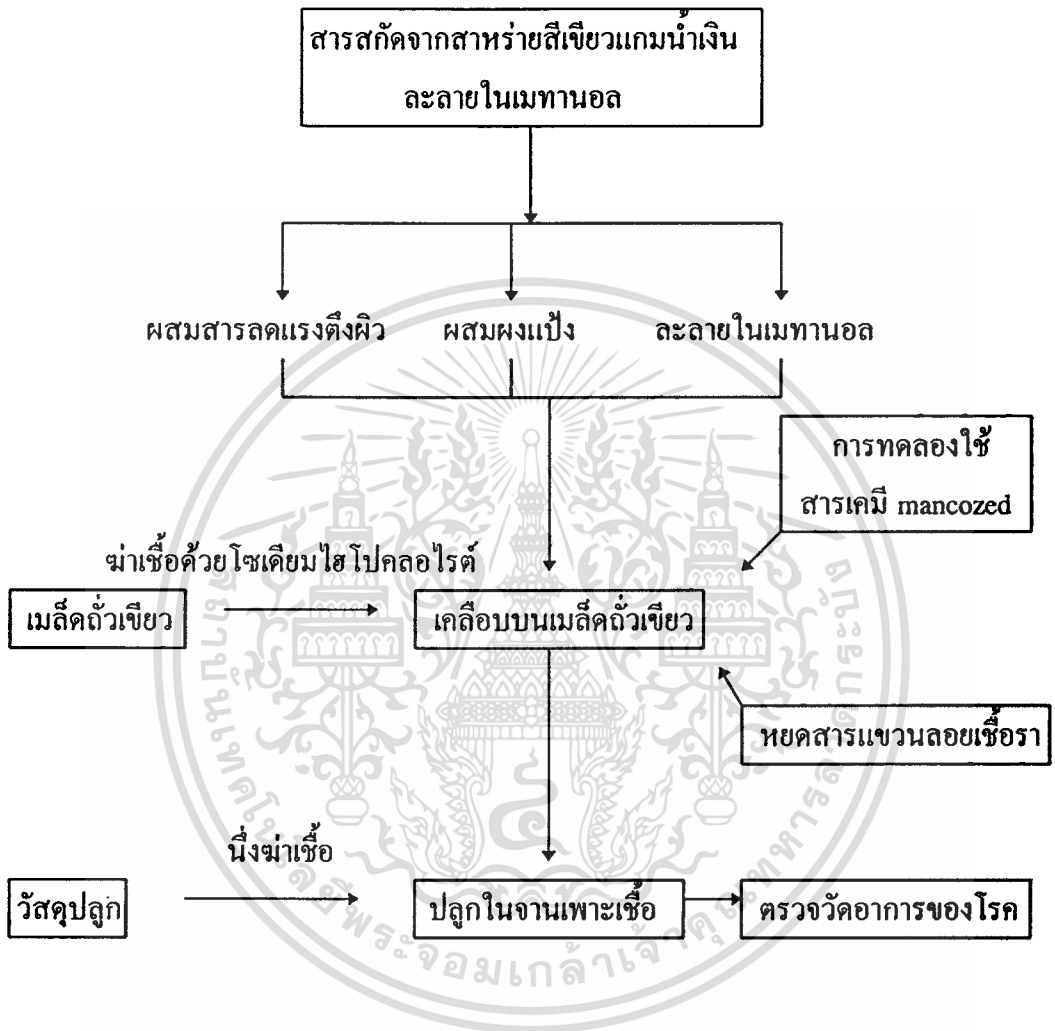


3.2 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ติดเชืบนถั่วเขียว โดยทำการทดลองในงานเพาะเชื้อและในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า

3.2.1 ขั้นตอนเตรียมพืชเพื่อทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ในงานเพาะเชื้อ

นำกระดาดเพาะเมล็ด ที่ตัดเป็นวงกลมให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 85 มิลลิเมตร ไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วใส่ลงในงานเพาะเชื้อพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร โดยแต่ละงานเพาะเชื้อจะใช้กระดาดเพาะเมล็ด งานละ 3 แผ่น

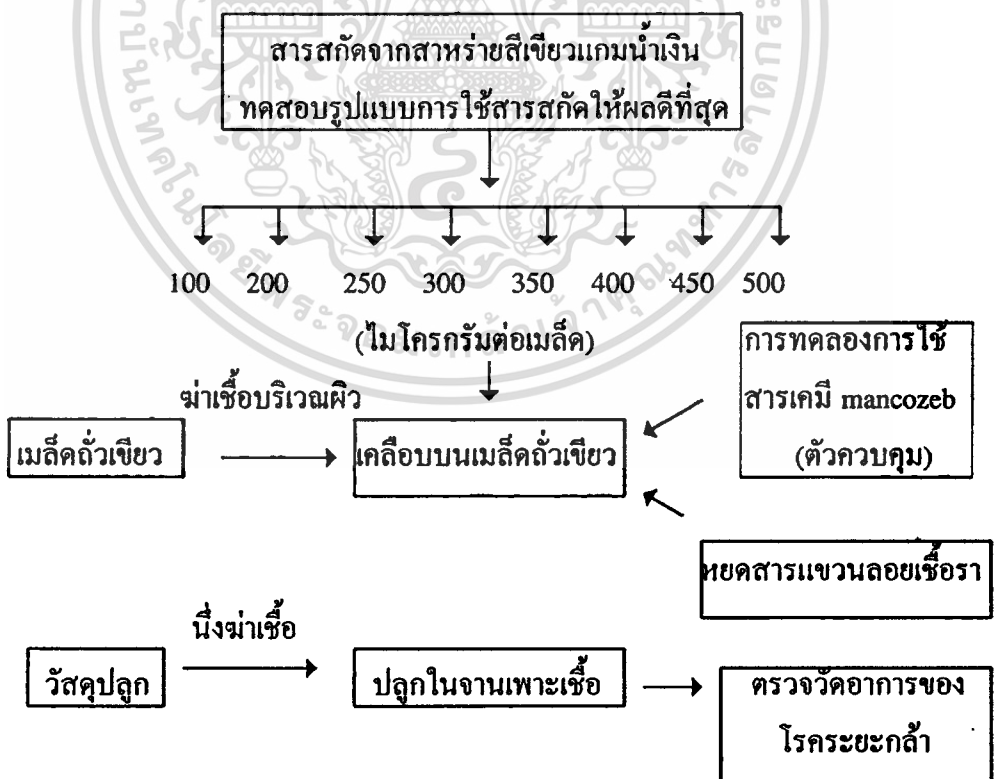
นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 2 ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 90% มาฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่นั่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยละลายสารที่สกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในเมทานอล เพื่อทดสอบรูปแบบ แบ่งสารสกัดออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนแรกผสมกับสารลดแรงตึงผิว (Tween 20) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% ส่วนที่สองผสมกับผงแป้ง และส่วนที่สาม คือส่วนที่ละลายในเมทานอล นำสารสกัดทั้งสามรูปแบบมาเคลือบบนเมล็ดถั่วเขียวให้ได้ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อเมล็ด (วางไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) วางบนกระดาดเพาะเมล็ด จากนั้นหยดสารแขวนลอยเชื้อรา *M. phaseolina* ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ด ลงบนถั่วเขียวที่เคลือบสารสกัด ส่วนสารเคมี mancozeb ที่ใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรากับสารสกัด จะใช้ความเข้มข้น 3 กรัมต่อเมล็ดถั่วเขียว 1 กิโลกรัม หรือ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด คลุกกับเมล็ดถั่วเขียว (ตัวควบคุมจะหยด *M. phaseolina* ลงบนเมล็ดถั่วเขียว) ให้น้ำเมล็ดถั่วเขียว ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่องานเพาะเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำมาตรวจระดับอาการของโรค (ดังแสดงในภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แสดงรูปแบบการเตรียมพืชเพื่อทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียว
แกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8906

3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีต่อการยับยั้ง การเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina* ในงานเพาะเชื้อ

เตรียมวัสดุปลูกและเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ตามวิธีการข้อ 3.2.1 จากนั้นเตรียมสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ในรูปแบบที่เหมาะสมต่อการใช้งาน มาทดสอบผลของความเข้มข้นของสารสกัดที่ 100 200 250 300 350 400 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ต่อการยับยั้งเชื้อรา โดยเคลือบสารสกัดแต่ละความเข้มข้นบนเมล็ดถั่วเขียว แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนวางบนกระดาดเพาะเมล็ด จากนั้นหยดเชื้อราที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ด บนถั่วเขียว ส่วนสารเคมี mancozeb ที่ใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรากับสารสกัด จะใช้ที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อเมล็ดถั่วเขียว 1 กิโลกรัม หรือ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด คลุกกับถั่วเขียว จากนั้นทำการทดลองตามวิธีการข้อ 3.2.1 (ดังแสดงในภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แสดงรูปแบบการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียว

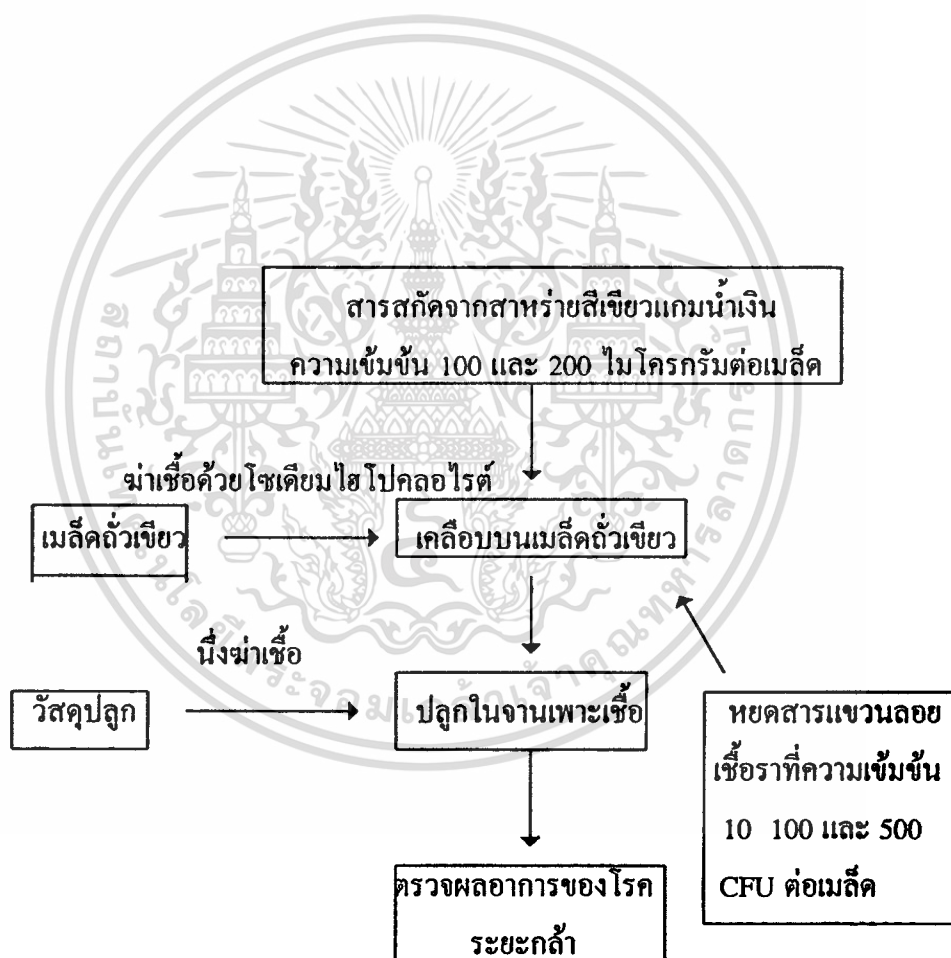
แกมน้ำเงินต่อการยับยั้ง การเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina* ในงานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อราและความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อการติดเชื้อ ของถั่วเขียวในงานเพาะเชื้อ

เตรียมวัสดุปลูกและเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวตามวิธีการข้อ 3.2.1 จากนั้นนำสารสกัดที่ผ่านการศึกษารูปแบบการใช้สารสกัดที่เหมาะสม มาทดสอบผลของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้น 10 100 และ 500 CFU ต่อเมล็ด โดยทำการทดลองตามวิธีการข้อ 3.2.1 (ดังแสดงในภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงรูปแบบการศึกษความเข้มข้นของเชื้อราและความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อการติดเชื้อ ของถั่วเขียวในงาน เพาะเชื้อ

3.2.4 ขั้นตอนการกำหนดตัวอย่างเพื่อการทดลองและออกแบบการวิจัยในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า

3.2.4.1 หลักเกณฑ์การกำหนดตัวอย่าง

3.2.4.1.1 สารสกัด

เมื่อได้รูปแบบและความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม ในระดับงานเพาะเชื้อ แล้วจึงนำผลดังกล่าวมาคิดแปลงการทดลองเพื่อปลูกถั่วเขียวในถุงพลาสติก ที่มีสภาพใกล้เคียงกับธรรมชาติ แล้วศึกษาว่าความเข้มข้นของสารสกัดและการศึกษารูปแบบการใช้สารสกัดนั้น จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หรือไม่ในสภาพที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติ

3.2.4.1.2 พีช

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวกำแพงแสน 2 มาฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษเพาะเมล็ดที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและผ่านการทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำเมล็ดถั่วเขียวที่ผ่านการเคลือบด้วยสารสกัด มาทดลองกับเชื้อราในถุงพลาสติก โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 วิธี

1. หยดสารแขวนลอยของเชื้อรา *M. phaseolina* (Chang and Kommedahl, 1968) เพื่อทำให้ทุกเมล็ดมีความสามารถในการเกิดโรคได้เท่ากัน ที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ดลงบนเมล็ด จากนั้นปลูกในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณ 250 กรัมต่อ 1 ถุง การปลูกเชื้อราโดยวิธีนี้ เชื้อราจะติดเชื้อบนเมล็ดถั่วเขียวโดยตรง (seed-borne)

2. นำสารละลายเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 10^3 CFU ต่อ ดิน 1 กรัม ผสมในดิน (William and Smith, 1968) ใส่ในถุงพลาสติกปริมาณดิน 250 กรัมต่อ 1 ถุง จากนั้นปลูกถั่วเขียวที่ผ่านการเคลือบด้วยสารสกัด การปลูกเชื้อด้วยวิธีนี้ เชื้อราจะอาศัยในดิน (soil-borne) และติดเชื้อบนเมล็ดได้โดยการชักนำของสารเคมีที่ซึม ออกมาทางราก

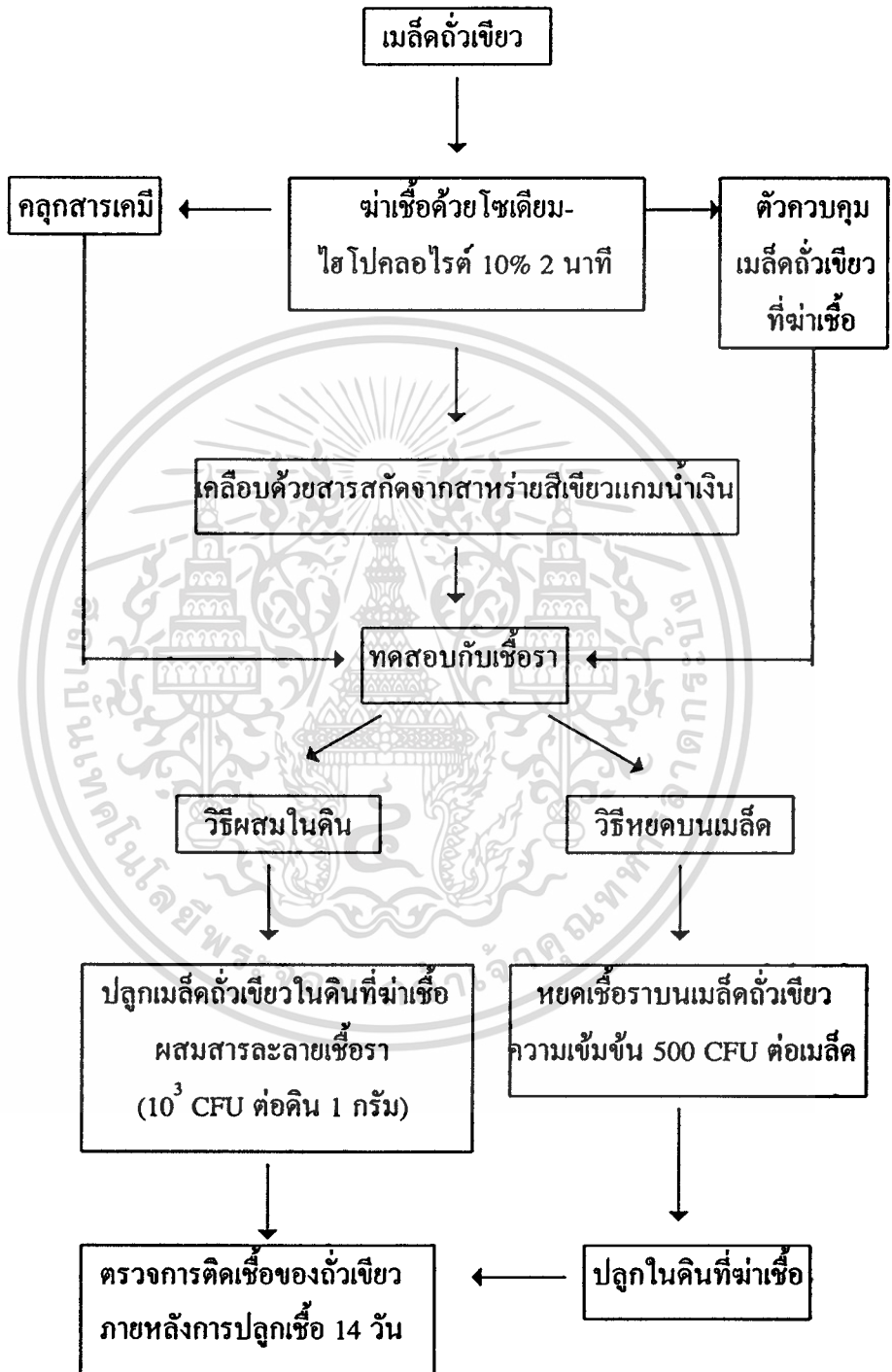
ส่วนการทดลองสารสกัดเปรียบเทียบกับสารเคมีทำได้ดังนี้

นำเมล็ดถั่วเขียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาคลุกด้วยสารเคมี mancozeb ที่มี ความเข้มข้น 3 กรัมต่อเมล็ดถั่วเขียว 1 กิโลกรัม หรือ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ทำการ ทดลองกับเชื้อราตามวิธีข้อ 3.2.4.1.2 ข้อ 1 และ ข้อ 2 (ดังแสดงในภาพที่ 12)

ในการทดลองจะวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete-Block (RCB) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 วิธี (treatment) 20 ซ้ำ (replication) โดยปลูก เมล็ดถั่วเขียวในถุงพลาสติก ถุงละ 6 เมล็ด โดยให้ระยะการปลูกห่างกัน 1x1 นิ้ว แถวยาว 2 แถว แถวละ 3 เมล็ด

ตรวจวัดอาการของโรค โดยการนับจำนวนเมล็ดถั่วเขียวที่ติดเชื้อภายหลัง การปลูกเชื้อ 14 วัน นำผลที่ได้มาวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 0.05

ส่วนตัวควบคุมสำหรับเปรียบเทียบการทดลอง จำนวน 20 ซ้ำ โดยใน 1 ถุง จะปลูกเมล็ดถั่วเขียว 6 เมล็ด ปลูกเชื้อราที่ความเข้มข้น 500 CFUต่อเมล็ด ลงบนถั่ว เขียวด้วยวิธีผสมในดิน และหยดลงบนเมล็ด ตามวิธีข้อ 3.2.4.1.2 ข้อ 1 และ ข้อ 2 และ ปลูกเมล็ดถั่วเขียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 6 เมล็ด เพื่อดูว่าเมล็ดพันธุ์มี-เปอร์เซ็นต์การงอกดีหรือไม่และศึกษาการติดเชื้อราของเมล็ดก่อนนำไปทดลอง ขั้นตอน การศึกษาทั้งหมดแสดงในภาพที่ 13

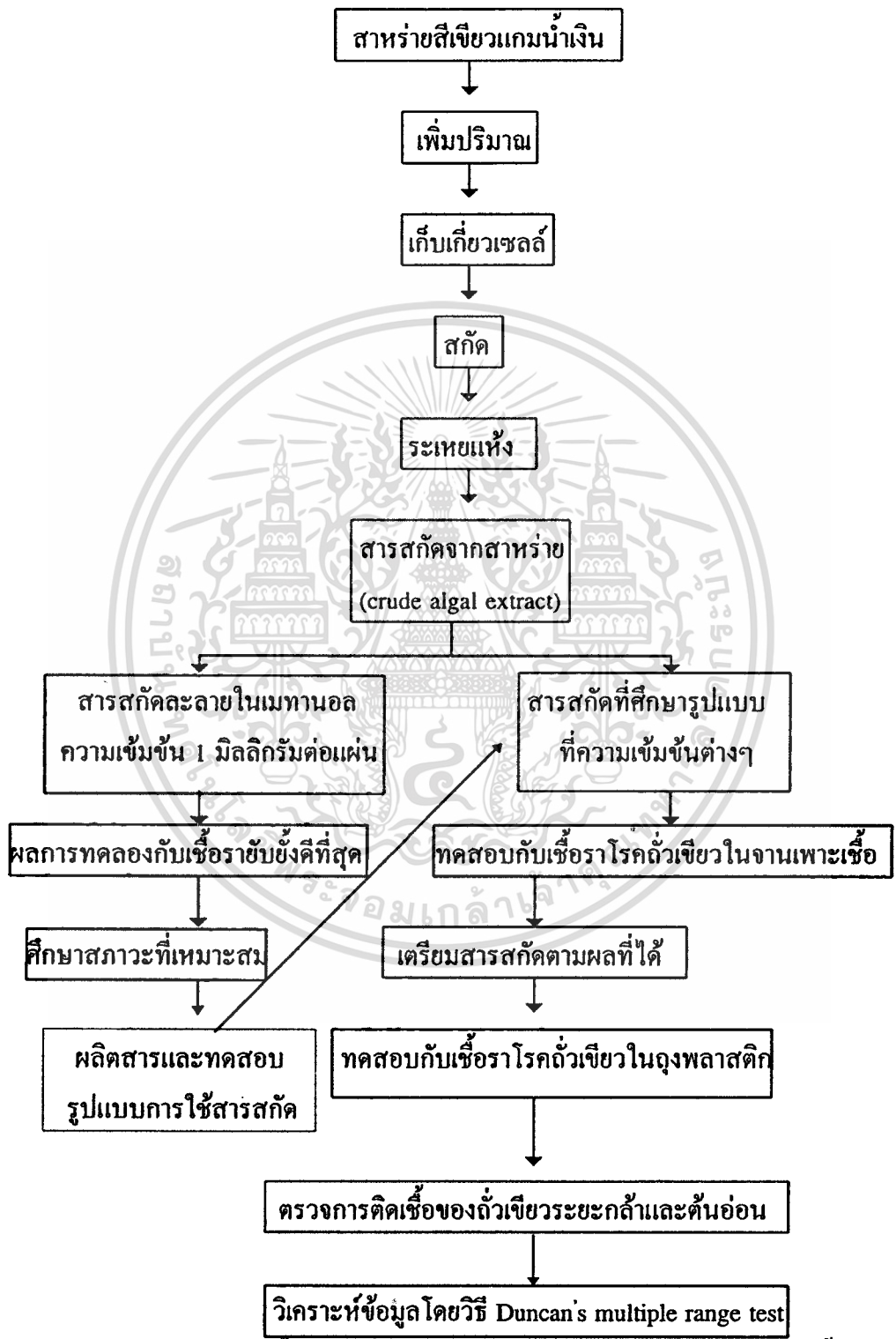


ภาพที่ 12 แสดงรูปแบบการทดสอบการใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เพื่อการยับยั้งเชื้อรา ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 13 แสดงขั้นตอนกระบวนการทดลอง การใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ควบคุมโรคพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.2 การออกแบบการวิจัย

3.2.4.2.1 การวิจัยในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *M. phaseolina* โดยใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถยับยั้งเชื้อรา โดยวิธี paper disc plate บนจานอาหาร PDA จากนั้นทำการทดสอบการยับยั้งโรคของถั่วเขียวในจานเพาะเชื้อ

3.2.4.2.2 การวิจัยในเรือนปลูกพืชทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวที่ปลูกในถุงพลาสติกทั้งหมด 125 ถุง ไปวางไว้ในเรือนทดลองที่ซิงดาข่าย (sun-shield) เพื่อควบคุมแสง และให้ปริมาณแสงที่ผ่านเข้ามาได้มีปริมาณร้อยละ 60 โดยการเรียงถุงพลาสติกเป็นรูป 4 เหลี่ยมจตุรัส เป็นบล็อก 6 บล็อกๆ ละ 20 ถุง วางไว้ภายใต้สภาพธรรมชาติตลอดระยะเวลาการทดลอง รดน้ำช่วงเช้าและเย็นทุกวัน ปริมาตร 250 มิลลิลิตรต่อ 1 ถุง

3.2.4.2.3 การตรวจอาการของโรคถั่วเขียวที่เกิดจากเชื้อ *M. phaseolina*

สังเกตลักษณะส่วนต่างๆ ของถั่วเขียว เช่น ราก โคน ลำต้น ใบ ในระยะต้นกล้าและระยะต้นอ่อน ที่ถูกเชื้อรา *M. phaseolina* ทำลาย

3.2.4.3 ขั้นตอนการประเมินผลและวิเคราะห์ผล

ทำการประเมินผลเป็น 2 ช่วงคือ

3.2.4.3.1 ทำการวัดขนาดโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหาร PDA ที่ swab เชื้อรา ด้วย vernier caliper

3.3.3.2.2 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) (เจริญ จันทลักษณ์ 2523) โดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 ขั้นตอนการทดสอบทางเคมี

3.3.1 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC) ในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน

3.3.1.1 การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

นำสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8906 มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หยด (spot) สารที่ทำให้เข้มข้นแล้วลงบนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel 60F₂₅₄; Merck) ที่มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร กว้าง 2 เซนติเมตรและยาว 8 เซนติเมตร โดยตำแหน่งที่หยดอยู่ห่างจากขอบล่างแผ่นซิลิกาเจล 1.5 เซนติเมตร นำแต่ละแผ่นไปตีเวลลอป (develop) ในภาชนะอิมมัตด้วยสารละลายผสม โดยให้ส่วนของแผ่นซิลิกาอยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 1.0 เซนติเมตร

สารละลายผสมที่ใช้มีดังนี้

3.3.1.1.1 คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 6:4:1

3.3.1.1.2 คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 7:3:1

3.3.1.1.3 คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 10:3:1

เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้ง ตรวจสอบตำแหน่งของสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยวิธีออโตไบโอกราฟี (autobiograph) กับเชื้อ *M. phaseolina* ซึ่งวิธีออโตไบโอกราฟี ทำได้โดยนำอาหาร PDA อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เทลงบนแผ่นซิลิกาเจลที่ต้องการตรวจสอบตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้น swab สารละลายแขวนลอยของเชื้อ *M. phaseolina* บนผิวหน้าอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบตำแหน่งที่มีบริเวณยับยั้งการเจริญเกิดขึ้น และตรวจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารผลงานวิจัยที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอบตำแหน่งของสารโดยนำไปส่องด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เปรียบเทียบตำแหน่งของสารที่ปรากฏเมื่อตรวจด้วยวิธีอโตไบโอกราฟกับวิธีการส่องด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

เลือกระบบสารละลายที่เมื่อคิเวลลอปแล้วให้ส่วนที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* แยกจากส่วนอื่นที่ปะปน

3.3.1.2 การใช้วิธีทินแลเซอร์โครมาโทกราฟีในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลยับยั้งการเจริญออกจากสิ่งเจือปน

นำระบบสารละลายที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.1.1 มาปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของระบบตัวทำละลายให้เหมาะสมในการแยกสารยิ่งขึ้น และใช้วิธีตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่นซิลิกาเจลโดยวิธีอโตไบโอกราฟ และวิธีการส่องรังสีอัลตราไวโอเลต จากนั้นเลือกระบบสารละลายที่เมื่อคิเวลลอปแล้วให้ส่วนที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแยกจากส่วนอื่นที่ปะปนมาได้ดีที่สุด

หยดสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทำให้เข้มข้นเหมือนข้อ

3.3.1.1 ลงบนแผ่นซิลิกาเจลกว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร เป็นแนวตรงตลอดความยาวของแผ่นซิลิกาเจล โดยให้ห่างจากขอบปลายด้านล่าง 1.5 เซนติเมตร นำไปคิเวลลอปในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยสารละลายผสมที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งได้จากการทดลองข้อ

3.1.6.1 เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากขอบปลายบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้ง ขูดซิลิกาเจลตำแหน่งที่ทราบแล้วว่ามีสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อรา นำมาละลายในเมทานอล กรองแยกส่วนที่เป็นซิลิกาเจลและเมทานอล

นำสารซึ่งอยู่ในส่วนที่เป็นเมทานอลไประเหยเอาเมทานอลออก โดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน จากนั้นนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี

3.3.1.3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกออกจากสิ่งเจือปนแล้ว โดยวิธีทินแลเซอร์โครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.3.1 ปฏิกริยานินไฮดริน (ninhydrin reaction)

ปฏิกริยานินไฮดริน เป็นปฏิกริยาการทดสอบกรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโนในเปปไทด์หรือโปรตีน การหากรดอะมิโนหรือโปรตีนทำได้โดย นำสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยานินไฮดรินปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดประมาณ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินถึงม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก ซึ่งแสดงว่าสารตัวอย่างประกอบด้วยกรดอะมิโนหรือโปรตีน

3.3.1.3.2 ปฏิกริยาไบยูเรต (biuret reaction)

ปฏิกริยาไบยูเรต เป็นปฏิกริยาการทดสอบสารที่ประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ ตั้งแต่สองแห่งขึ้นไป ซึ่งทำการทดลองโดยนำสารละลายตัวอย่างใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% 1 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1% 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นให้บันทึกผลเป็นบวก ซึ่งแสดงว่าสารตัวอย่างประกอบด้วยพันธะเปปไทด์

3.3.1.3.3 การทดสอบโมลิช (Molisch's test)

การทดสอบโมลิช เป็นวิธีการทดสอบน้ำตาล โดยใช้กรดเข้มข้นคือน้ำออกจากน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซส กลายเป็นเฟอไฟิวรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอไฟิวรัลในกรณีของเฮกโซส ถ้าเป็นอัลโดเฮกโซส จะได้อนุพันธ์เฟอไฟิวรัลประมาณ 1% และถ้าเป็นคีโตเฮกโซส จะได้อนุพันธ์เฟอไฟิวรัล 20-25% ซึ่งการทดสอบน้ำตาลทำได้โดยใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำยาโมลิช (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ลงไปหลอดละ 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ค่อยๆหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงข้างๆหลอดทดลอง ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย ถ้าเป็นสีชมพูจนถึงม่วงให้บันทึกผลเป็นบวก ซึ่งแสดงว่าสารตัวอย่างประกอบด้วยน้ำตาล

3.3.1.3.4 การทดสอบแอนโทรน (anthrone test)

การทดสอบแอนโทรนเป็นการทดสอบน้ำตาลทั่วๆไป โดยใช้กรดกำมะถันคือน้ำออกจากน้ำตาล กลายเป็นเฟอไฟิวรัลหรืออนุพันธ์ของเฟอไฟิวรัล ซึ่งจะรวม

กับแอนทราโนล (ในน้ำยาแอนโทรน) ได้สารละลายสีเขียวจนถึงน้ำเงิน ซึ่งการทดสอบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลทำได้โดยใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำยาแอนโทรน (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดประมาณ 10 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอมเขียวให้บันทึกผลเป็นบวก

3.3.1.3.5 การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน (unsaturation test)

กรดไขมันที่ประกอบเป็นโครงสร้างของไขมันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดอิ่มตัว และชนิดไม่อิ่มตัวซึ่งมีพันธะคู่ พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถทำปฏิกิริยากับสารพวกลอเจน โดยจะฟอกสีฮาลอเจน (โบรมีนและไอโอดีน) จึงใช้คุณสมบัติในข้อนี้ทดสอบว่าไขมันที่ศึกษามีพันธะคู่ในโมเลกุลหรือไม่ ซึ่งทำการทดลองโดยใส่กลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลละลายตัวอย่าง 2 หยด ลงในหลอดทดลองดังกล่าว จากนั้นค่อยๆหยดสารละลายโบรมีนลงไปทีละหยด ผสมให้เข้ากัน โดยเคาะหลอดทดลองด้วยฝ่ามือ ถ้าสารตัวอย่างเป็นไขมันที่มีพันธะคู่ จะฟอกจางสีโบรมีนได้ บันทึกผลเป็นบวก

3.3.1.3.6 การทดสอบการยับยั้งโดยเอนไซม์ (protease inhibition)

ใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด ใส่เอนไซม์โปรติเอสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทั้ง 2 หลอด จากนั้นนำไปย่อยใน mineral oil bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนที่เหลืออีกหนึ่งหลอดจะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารที่ได้ทั้ง 2 หลอด หยดบนแผ่นทดสอบนำไปวางบนจานเพาะเชื้อที่ swab เชื้อราโรคฟิช บ่มที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจวัดผลโดยสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น สารตัวอย่างซึ่งถูกย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสต้องเกิดโซนใส เนื่องจากเอนไซม์ถูกย่อยด้วยความร้อนทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ถูกทำลาย ส่วนหลอดที่ใส่เอนไซม์วางไว้ที่อุณหภูมิห้องถ้าไม่เกิดโซนใสให้รายงานผลเป็นบวก ส่วนตัวควบคุมจะใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการทดสอบต้องเกิดโซนใส

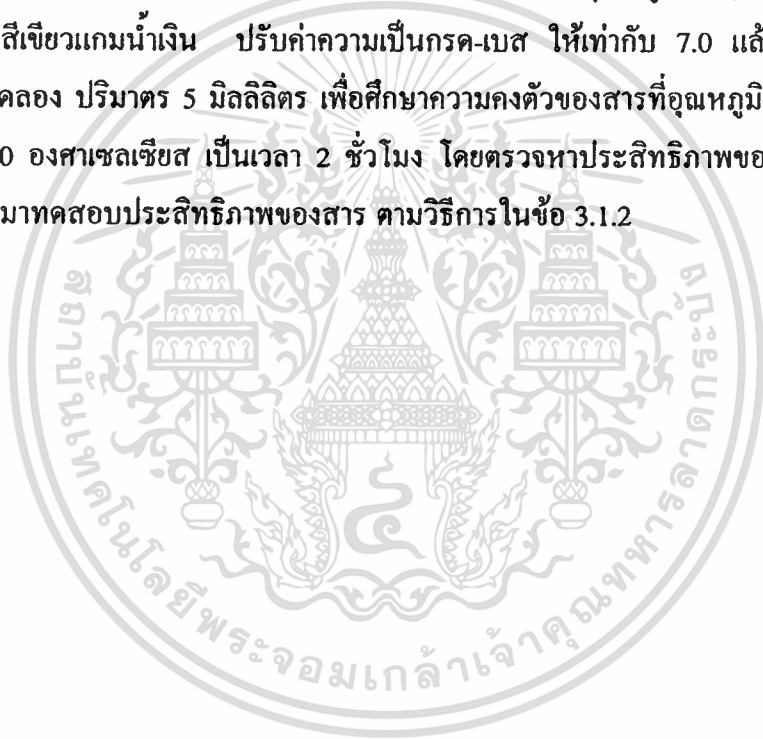
3.3.1.4 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina*

3.3.1.4.1 ศึกษาความเสถียรของสารสกัดในสภาพความเป็นกรด-เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ นำสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (crude algal extract) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้เท่ากับ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 ด้วย 2 นอร์แมล กรดไฮโดรคลอริก หรือ 2 นอร์แมล โซเดียมไฮดรอกไซด์ตามลำดับ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงปรับระดับความเป็นกรด-เบส ให้เป็นกลาง ก่อนนำไปตรวจหาประสิทธิภาพของสาร โดยวิธี swab-inoculation และ paper disc plate ตามวิธีการในข้อ 3.1.2

3.3.1.4.2 ศึกษาความเสถียรของสารสกัด ที่อุณหภูมิต่างๆ นำสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้เท่ากับ 7.0 แล้วเปิดใส่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาความคงตัวของสารที่อุณหภูมิ 50 70 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยตรวจหาประสิทธิภาพของสารทุกๆ 15 นาที นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสาร ตามวิธีการในข้อ 3.1.2



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 คุณสมบัติของสารที่สกัดได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ได้นำสาหร่ายจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาแยกและคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อราโรคพืช ได้แก่ *Colletotrichum truncatum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris maydis*, *Macrophomina phaseolina* และ *Pyricularia grisea* โดยพบว่าสารสกัดที่มีผลในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช แสดงผลการทดลองได้ดังตารางที่ 7

จากตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 11 สกุล 165 สายพันธุ์ พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สกุล ที่สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบได้ ซึ่งได้แก่สาหร่ายสกุล *Calothrix* 5 สายพันธุ์ จากจำนวนสาหร่ายสกุลดังกล่าวที่ใช้ทดสอบ 80 สายพันธุ์ สาหร่ายสกุล *Fischerella* 2 สายพันธุ์ จากจำนวนสาหร่ายสกุลดังกล่าว 10 สายพันธุ์ และ *Scytonema* 1 สายพันธุ์ จากจำนวนสาหร่ายสกุลดังกล่าว 2 สายพันธุ์ ส่วนสารสกัดจากสาหร่ายสกุลอื่นๆ ซึ่งทำการทดลองในครั้งนี้และไม่พบว่ามีการผลิตสารยับยั้งเชื้อรา ได้แก่สกุล *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Hapalosiphon*, *Mastigocladus*, *Nostoc*, *Stigonema* และ *Tolypothrix*

สาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้แสดงในตารางที่ 8 พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Calothrix* sp. TISTR 8902 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum truncatum* ได้ดีที่สุด ในขณะที่ยับยั้งเชื้อรา *Curvularia lunata* และ *M. phaseolina* ได้ดีเท่ากัน ส่วนเชื้อรา *F. oxysporum*, *Bipolaris maydis* และ *Pyricularia grisea* ไม่สามารถยับยั้งได้ สาหร่ายสายพันธุ์ *Calothrix* sp. TISTR 8903 ยับยั้งเชื้อราได้ 2 ชนิด คือ *M. phaseolina* และ *Colletotrichum truncatum* ส่วนสาหร่ายสายพันธุ์ *Calothrix* sp. TISTR 8904 สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ได้เพียงชนิดเดียว โดยมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* (ภาพที่ 14) *M. phaseolina* (ภาพที่ 15) และ *Bipolaris maydis* (ภาพที่ 16) ได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อรา *F. oxysporum* ยับยั้งเพียงเล็กน้อย สาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8910 ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum*, *Cuvelaria lunata* และ *M. phaseolina* ได้เท่ากัน ส่วนสาหร่าย *Fischerella* ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *Fischerella* sp. TISTR 8915 และ *Fischerella* sp. TISTR 8917 เป็นสาหร่ายสกุลเดียวที่ยับยั้งเชื้อรา *Pythium grisea* ได้แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเพียงเล็กน้อย สาหร่าย *Scytonema* sp. TISTR 8925 ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* และ *Curvularia lunata* เพียงเล็กน้อย จะเห็นได้ว่าสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ดังกล่าวมาทดสอบหาประสิทธิภาพการต่อต้านเฉพาะเชื้อรา *M. phaseolina* เป็นสาเหตุของโรคเน่าดำ กับถั่วเขียว เนื่องจากถั่วเขียวเป็นพืชที่เชื้อรา *M. phaseolina* เข้าทำลายในระยะกล้า ซึ่งถือว่าเป็นระยะสำคัญของการเจริญเติบโต และถั่วเขียวยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่เหมาะสมสำหรับทดลองในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นพืชที่เจริญอย่างรวดเร็ว

จากการแยกและคัดเลือกลำพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในเบื้องต้น พบว่าสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้น้อยชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำและเชื้อราโรคพืชแต่ละชนิดมีความไวต่อสารสกัดได้ต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่เวลา 14 วัน ซึ่งอาจไม่ใช่ช่วงระยะเวลาที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด อย่างไรก็ตามในการศึกษาค้างนี้มีสาหร่ายอย่างน้อย 2 สายพันธุ์ ที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้ดี

ตารางที่ 7

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	จำนวนสาหร่ายที่ใช้ ในการคัดเลือก	จำนวนสาหร่ายที่ให้ผลใน การยับยั้งเชื้อราโรคพืช
<i>Anabaena</i>	11	0
<i>Calothrix</i>	80	5
<i>Cylindrospermum</i>	1	0
<i>Fischerella</i>	10	2
<i>Gloeotrichia</i>	3	0
<i>Hapalosiphon</i>	15	0
<i>Mastigocladus</i>	2	0
<i>Nostoc</i>	30	0
<i>Scytonema</i>	2	1
<i>Stigonema</i>	6	0
<i>Tolypothrix</i>	5	0
รวม 11 สกุล	165	8

ตารางที่ 7 แสดงการยับยั้งเชื้อราโรคพืช โดยสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุลต่างๆ

ตารางที่ 8

สหายสี่เขียวแถมน้ำเงิน*	เชื้อราโรคพืช					
	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Bipolaris mydis</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Pyricularia grisea</i>
<i>Calothrix</i> sp. TISTR 8902	++++	++	-	-	++	-
<i>Calothrix</i> sp. TISTR 8903	++	-	-	-	+++	-
<i>Calothrix</i> sp. TISTR 8904	-	-	+	-	-	-
<i>Calothrix</i> sp. TISTR 8906	++++	-	+	++++	++++	-
<i>Calothrix</i> sp. TISTR 8910	+++	+++	-	-	+++	-
<i>Fischerella</i> sp. TISTR 8915	-	-	-	-	-	-
<i>Fischerella</i> sp. TISTR 8917	-	-	-	-	-	+
<i>Scytonema</i> sp. TISTR 8925	++	+	-	-	-	+

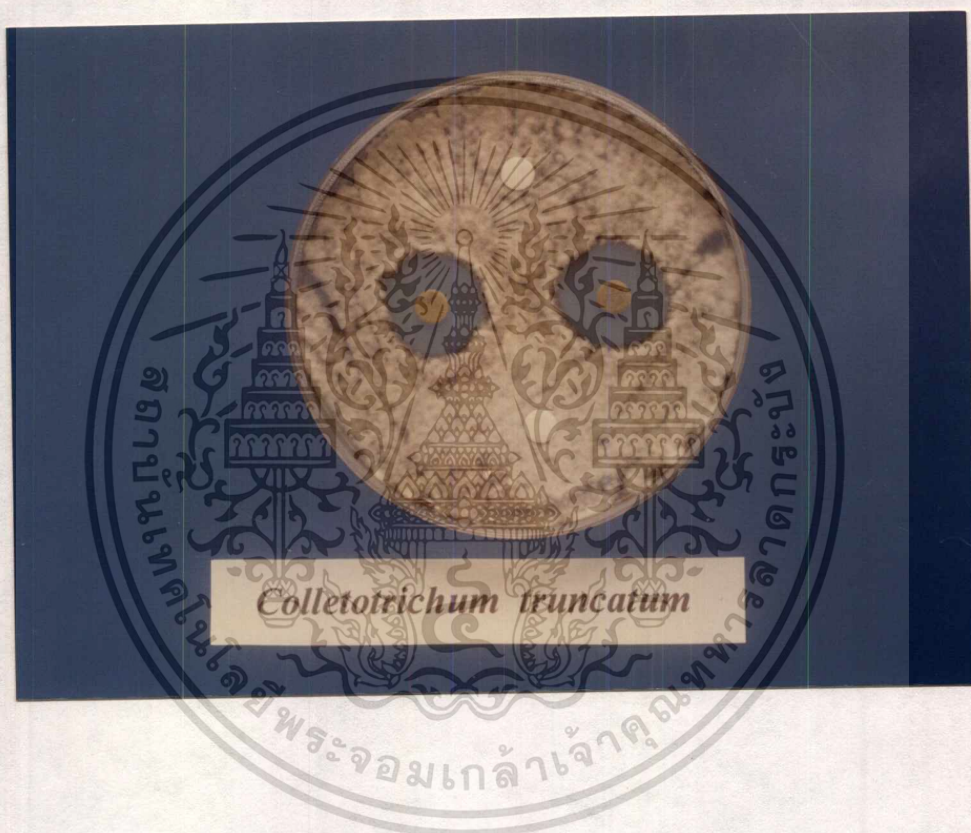
ตารางที่ 8 แสดงความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อราโรคพืช

หมายเหตุ * เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแถมน้ำเงินในอาหาร BGA+N ที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับเชื้อราโรคพืช ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น โดยวิธี paper disc plate

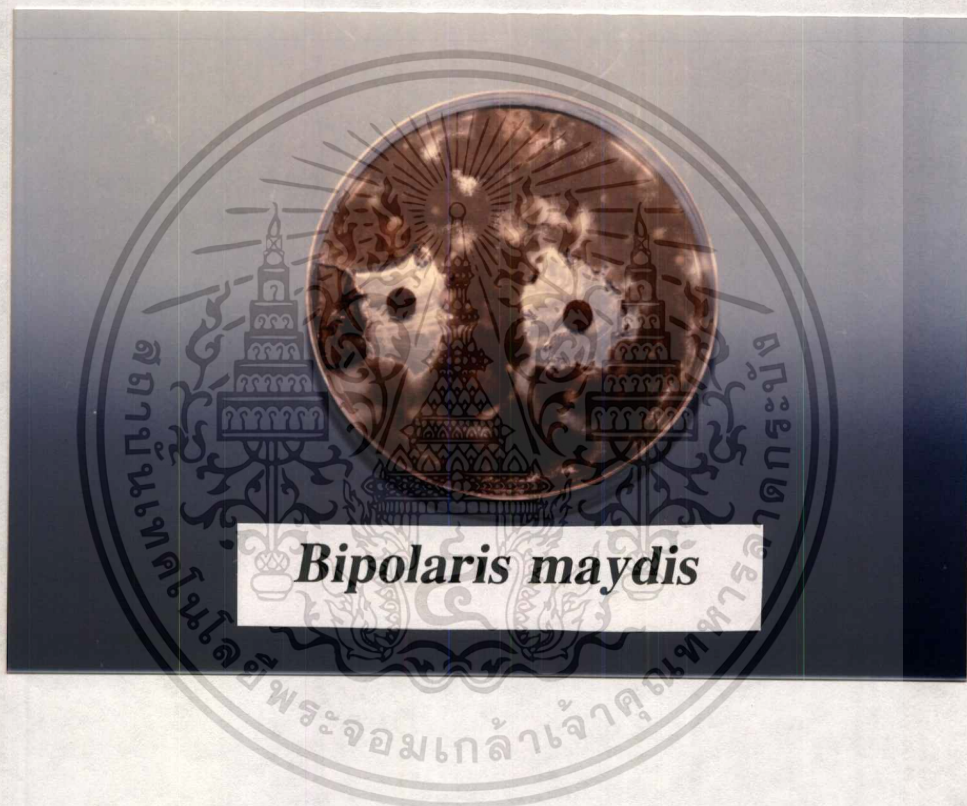
** ขนาดโซนในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช - ไม่เกิดการยับยั้งเชื้อรา + ขนาดโซนใน 6-10 มิลลิเมตร ++ ขนาดโซนใน 11-15 มิลลิเมตร +++ ขนาดโซนใน 16-20 มิลลิเมตร ++++ ขนาดโซนในมากกว่า 20 มิลลิเมตร



ภาพที่ 14 แสดงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* บนอาหาร PDA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น



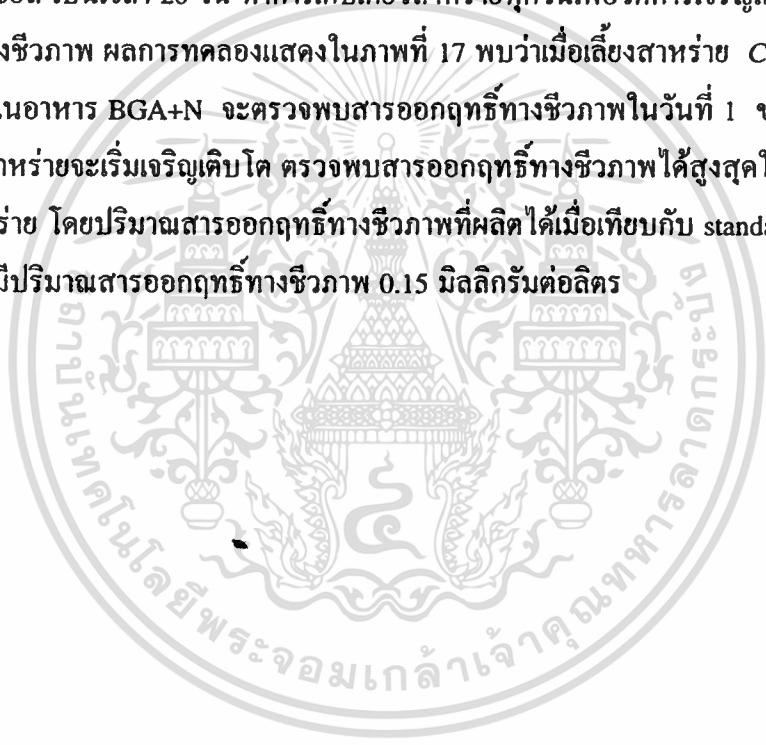
ภาพที่ 15 แสดงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนอาหาร PDA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น

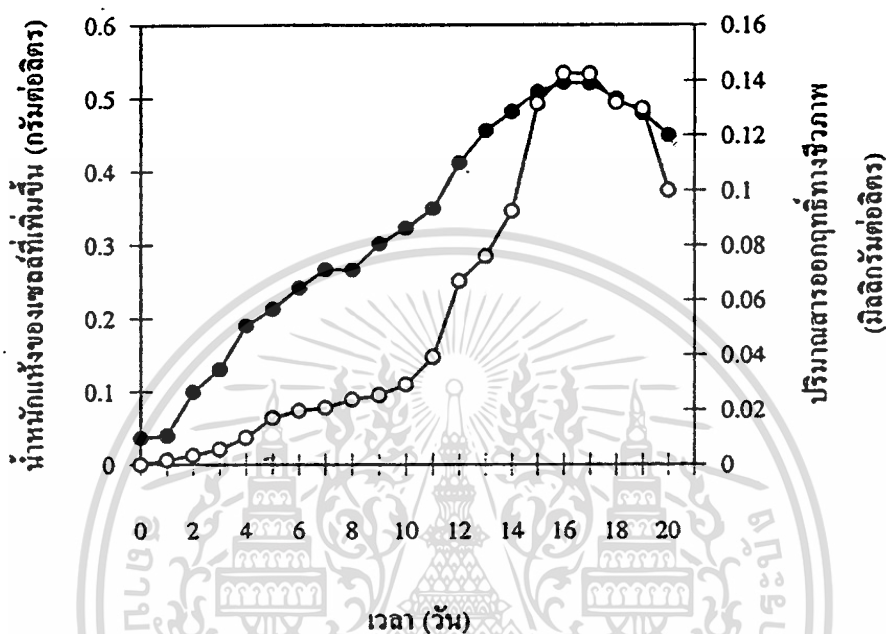


ภาพที่ 16 แสดงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Bipolaris maydis* บนอาหาร PDA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่น

4.2 การศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ที่ระยะเวลาต่างๆ ในขวดรูปชมพู่

ในการศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ที่ระยะเวลาต่างๆ ในอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) โดยเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มสาหร่ายไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน ทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายทุกวันเพื่อวัดการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 17 พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ในอาหาร BGA+N จะตรวจพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในวันที่ 1 ของการบ่มสาหร่าย และสาหร่ายจะเริ่มเจริญเติบโต ตรวจพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงสุดในวันที่ 16 ของการบ่มสาหร่าย โดยปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับ standard cycloheximide มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร





ภาพที่ 17 แสดงช่วงเวลาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ในอาหาร BGA+N บ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน

- น้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)
- ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เทียบกับ
standard cycloheximide (มิลลิกรัมต่อลิตร)

4.3 การศึกษาอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสม ต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906

4.3.1 การศึกษาชนิดของอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การศึกษากาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย 4 ชนิด ได้แก่ BGA, BGA+N, BG-11 และ Allen's สูตรอาหารทั้ง 4 ชนิดมีองค์ประกอบของธาตุอาหารบางชนิดที่แตกต่างกัน (ภาคผนวก ก หมายเลข 1 2 และ 3) พบว่าสูตรอาหาร BGA+N, BG-11 และ Allen's เป็นสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนสูตรอาหาร BGA ไม่มีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจน จากผลการศึกษาพบว่าสูตรอาหาร BGA+N ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดัดแปลงโดยการเติมแหล่งไนโตรเจน เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยเมื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรต (BGA+N) กับสูตรอาหาร BGA พบว่าสูตรอาหาร BGA+N ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเพิ่มขึ้น 1.23 เท่า และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 2.48 เท่า เมื่อเทียบกับสูตรอาหาร BGA ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สาหร่ายต้องการสับสเตรตจากแหล่งไนโตรเจน ถึงแม้ว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่การตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้น ทำให้สาหร่ายมีการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดน้อยลง จึงพบว่าสูตรอาหาร BGA ซึ่งไม่มีแหล่งไนโตรเจนทำให้สาหร่ายผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้น้อย ดังนั้นการศึกษากครั้งนี้จึงใช้สูตรอาหาร BGA+N ในการศึกษาขั้นต่อไป

แหล่งไนโตรเจนมีหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น แก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศ ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดสามารถตรึงได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียมและยูเรีย สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่การใช้แอมโมเนียในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะทำให้พีเอชของน้ำลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน (H^+) ออกมาจากระบวนการดูดซึมแอมโมเนียมเข้าในเซลล์ ซึ่งพีเอชที่เป็นกรดจะยับยั้งการเจริญของสาหร่ายได้ สำหรับไนไตรต์ไม่สามารถ

ใช้ได้เกิน 1 มิลลิโมล เนื่องจากความเป็นพิษของสารดังกล่าว (Morris, 1974) ดังนั้นไนเตรตจึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้มากที่สุด และในการศึกษานี้ใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน

4.3.2 การศึกษาปริมาณโซเดียมไนเตรต (NaNO_3) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการนำสูตรอาหาร BGA มาดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 พบว่าสูตรอาหาร BGA ดัดแปลงที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร สาหร่ายมีการเจริญเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 8.95 เท่า จากสูตรอาหาร BGA ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตตั้งแต่ 2.0 กรัมต่อลิตร ขึ้นไปก็ไม่มีผลต่อการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Scytonema* sp. TISTR 8208 ในอาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Chetsumon et al., 1994) ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมและนำไปใช้ในการดัดแปลงสูตรอาหารในขั้นต่อไป

4.3.3 การศึกษาปริมาณไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0 0.3 0.6 0.9 1.2 1.5 1.8 และ 2.1 กรัมต่อลิตร ในอาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 11 พบว่าความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเพิ่มขึ้น 1.3 เท่า และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 2.75 เท่า จากสูตรอาหาร BGA ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร และ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตตั้งแต่ 1.5 กรัมต่อลิตร ก็ไม่ทำให้การเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น จะเห็นได้ว่าปริมาณฟอสเฟตมีอิทธิพลอย่างมากในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ยังไม่ทราบกลไก

ที่แน่ชัด เพียงแต่สันนิษฐานกันว่าเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของ ATP ภายในเซลล์เนื่องจากความเป็นจริงที่ว่าการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมักจะเริ่มต้นภายหลังที่มีการใช้ฟอสเฟตเกือบหมดไปจากอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (Iwai and Omura, 1982) และจากการศึกษาของ (Martin *et al.*, 1978) กล่าวว่าความสัมพันธ์ของฟอสเฟตในอาหารที่สูง ทำให้ ATP ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นและจะเร่ง primary metabolism แต่จะยับยั้งการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงถือว่าฟอสเฟตเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Talling, 1962 ; Healey and Hendzel, 1980)

ดังนั้นความสัมพันธ์ของโคโบทาเซียไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร เป็นความสัมพันธ์ที่เหมาะสมและนำไปใช้ดัดแปลงสูตรอาหารในขั้นต่อไป

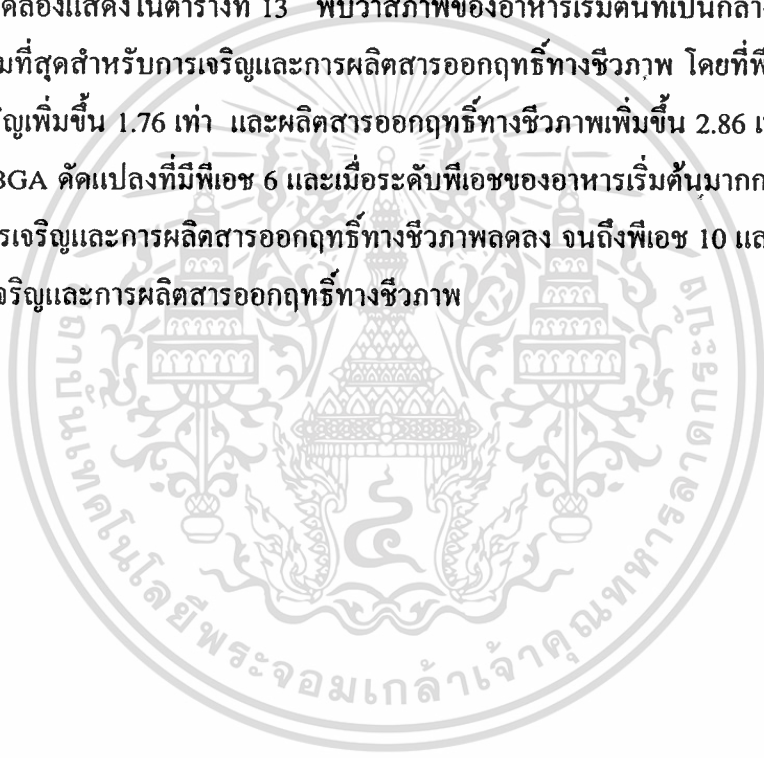
4.3.4 การศึกษาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ความสัมพันธ์ของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 0.03 0.05 0.07 0.09 0.11 0.13 และ 0.15 กรัมต่อลิตร ในอาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร และโคโบทาเซียไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 12 พบว่าที่ความสัมพันธ์ของโซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร เป็นความสัมพันธ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำให้การเจริญเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 4.6 เท่า จากสูตรอาหาร BGA ดัดแปลงที่มีการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร โคโบทาเซียไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 0.07 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.03 กรัมต่อลิตร ทำให้การเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพียงเล็กน้อยหรือไม่ต้องการเลย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Botwick และคณะ (1968)

ดังนั้นความสัมพันธ์ของโซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร เป็นความสัมพันธ์ที่นำไปใช้ในการดัดแปลงสูตรอาหารในขั้นต่อไป

4.3.5 การศึกษาพีเอชเริ่มต้น ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ในอาหาร BGA ดัดแปลงที่มีส่วนประกอบทั้งชนิดและปริมาณของแหล่งอาหารที่เหมาะสม ที่ศึกษาไว้ในข้อ 4.2.2 4.2.3 และ 4.2.4 ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 6 7 8 9 10 และ 11 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13 พบว่าสภาพของอาหารเริ่มต้นที่เป็นกลาง (พีเอช 7) เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยที่พีเอช 7 พบว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้น 1.76 เท่า และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 2.86 เท่า จากสูตรอาหาร BGA ดัดแปลงที่มีพีเอช 6 และเมื่อระดับพีเอชของอาหารเริ่มต้นมากกว่า 7 ขึ้นไป ทำให้การเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง จนถึงพีเอช 10 และ 11 จะไม่พบการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



ตารางที่ 9

ชนิดของอาหาร	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
BGA	0.47	0.68	1.45
BGA+N	0.58	1.69	2.91
BG-11	0.51	0.71	1.39
Allen's	0.50	0.69	1.38

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA, BGA+N, BG-11 และ Allen's

หมายเหตุ อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 16 วัน

ตารางที่ 10

ความเข้มข้นของ โซเดียมไนเตรด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	0.30	0.19	0.63
0.5	0.32	0.50	1.56
1.0	0.39	0.77	1.97
1.5	0.52	1.70	3.27
2.0	0.40	0.54	1.35
2.5	0.40	0.24	0.70

ตารางที่ 10 แสดงการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดในระดับต่างๆ

หมายเหตุ อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 คืออาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้แสงฟลูออเรสเซน ความเข้มแสง $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 16 วัน

ตารางที่ 11

ความเข้มข้นของ ไดโพลเทสเซียม- ไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของ เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	0.17	0	0
0.3	0.28	0.17	0.61
0.6	0.41	0.63	1.54
0.9	0.45	0.90	2.00
1.2	0.48	1.18	2.46
1.5	0.53	1.73	3.26
1.8	0.42	0.89	2.12
2.1	0.40	0.46	1.15

ตารางที่ 11 แสดงการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไดโพลเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ต่างๆกัน

หมายเหตุ อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 คืออาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในรูปหมขุ่นขนาด 250 มิลลิลิตร โดยสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 16 วัน

ตารางที่ 12

ความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	0.47	1.07	2.28
0.03	0.60	1.75	2.91
0.05	0.45	0.68	1.51
0.07	0.43	0.38	0.88
0.09	0.42	0.32	0.76
0.11	0.37	0	0
0.13	0.32	0	0
0.15	0.31	0	0

ตารางที่ 12 แสดงการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ต่างๆกัน

หมายเหตุ อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 คืออาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร ไคโทแซตเซียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยสภาวะการเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้แสงฟลูออเรสเซน ความเข้มแสง 60 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 16 วัน

ตารางที่ 13

พีเอชเริ่มต้น	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
5	0.35	0.81	2.31
6	0.37	0.99	2.68
7	0.65	2.83	4.35
8	0.38	0.14	0.37
9	0.22	0.07	0.32
10	0	0	0
11	0	0	0

ตารางที่ 13 แสดงการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับสภาพความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นต่าง ๆ กัน

หมายเหตุ อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 คืออาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร ไคโทแซตเชียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร โดยสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 16 วัน

4.4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสภาพการตรึงไนโตรเจนกับในสภาพอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสม

ในการทดลองเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสภาพการตรึงไนโตรเจนกับในสภาพอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสม ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 14 พบว่าในสภาพการตรึงไนโตรเจนซึ่งอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายไม่มีแหล่งไนโตรเจน ทำให้สาหร่ายต้องใช้พลังงานภายในเซลล์อีกส่วนหนึ่งสำหรับตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศ เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงทำให้ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพอาหารที่เหมาะสม ซึ่งมีการศึกษาองค์ประกอบของธาตุอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงสาหร่าย โดยการนำอาหาร BGA มาดัดแปลงโดยการเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโคพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 พบว่าสาหร่ายมีการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น โดยเมื่อชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์เพื่อวัดการเจริญเติบโต พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 2.55 เท่า และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 10 เท่า เมื่อเทียบกับสภาพการตรึงไนโตรเจน ดังนั้นการใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจึงเหมาะสำหรับเลี้ยงสาหร่ายมากกว่าสภาพการตรึงไนโตรเจนทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบของอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน ทำให้สาหร่ายไม่สูญเสียพลังงานในการตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศ และพบว่าแหล่งไนโตรเจนยังเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สาหร่ายจึงมีการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น นอกจากนี้สูตรอาหารที่เหมาะสมยังมีไดโคพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตซึ่งเป็น buffering agent ชนิดหนึ่ง (Iwai and Omura, 1982) ในปริมาณที่สูงถึง 1.5 กรัมต่อลิตร อาจเป็นผลทำให้สภาพของอาหารเมื่อปรับความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นเท่ากับ 7 เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ในอาหารที่เหมาะสมมีปริมาณ 0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าในสภาพการตรึงไนโตรเจน ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่สูงจะไปยับยั้งการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งนี้เนื่องจากเกลืออนินทรีย์ อาจเกี่ยวข้องกับ ionic strength ในอาหารซึ่งมีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Ogata et al., 1977)

เมื่อเพาะเลี้ยง *Calothrix* sp. TISTR 8906 ในอาหารที่เหมาะสม โดยเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 20 วัน วัดการเจริญของเซลล์โดยหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Miller, 1955) และหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ โดยเทียบกับ standard cycloheximide ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 18 พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่เหมาะสม โดยมีส่วนประกอบของโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโทเทสซีมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร ให้อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซน ความเข้มของแสง $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ สาหร่ายเจริญได้อย่างช้าๆ และพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพียงเล็กน้อยในวันแรกของการถ่ายเชื้อ (inoculate) สาหร่าย และในวันที่ 7 ของการบ่มสาหร่ายจะเป็นช่วงที่มีการเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็ว และตรวจพบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด โดยให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อเทียบกับ standard cycloheximide (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 2.9 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณสารที่สาหร่ายผลิตได้จะลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่เป็นสับสเตรดสำหรับการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดน้อยลง และสาหร่ายขับของเสียซึ่งเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมออกนอกเซลล์ ทำให้สภาพความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงสาหร่ายเปลี่ยนไป คืออาหารเริ่มต้นมีพีเอชเท่ากับ 7 จนถึงวันที่ 20 ของการเลี้ยงสาหร่ายจะมีพีเอชประมาณ 8

ส่วนช่วงเวลาของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ในสภาพการตรึงไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงในถัง carboy โดยมีสภาวะการเลี้ยงสาหร่ายเช่นเดียวกับการเลี้ยงในสภาพอาหารที่เหมาะสม พบว่าสาหร่ายจะมีการเจริญอย่างช้าๆ และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในวันที่ 4 ของการบ่มเชื้อ โดยจะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดเมื่อเทียบกับ standard cycloheximide มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะลดลง ดังภาพที่ 19

โดยปกติแล้วการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็น secondary metabolite ชนิดหนึ่ง จะไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิตและการผลิตสารดั่ง-

กล่าวจะเริ่มผลิตขึ้นในช่วงสุดท้ายของระยะการเจริญที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential phase) ในสภาวะการเลี้ยงแบบ batch culture (Bu'Lock, 1961 ; Malik, 1979)



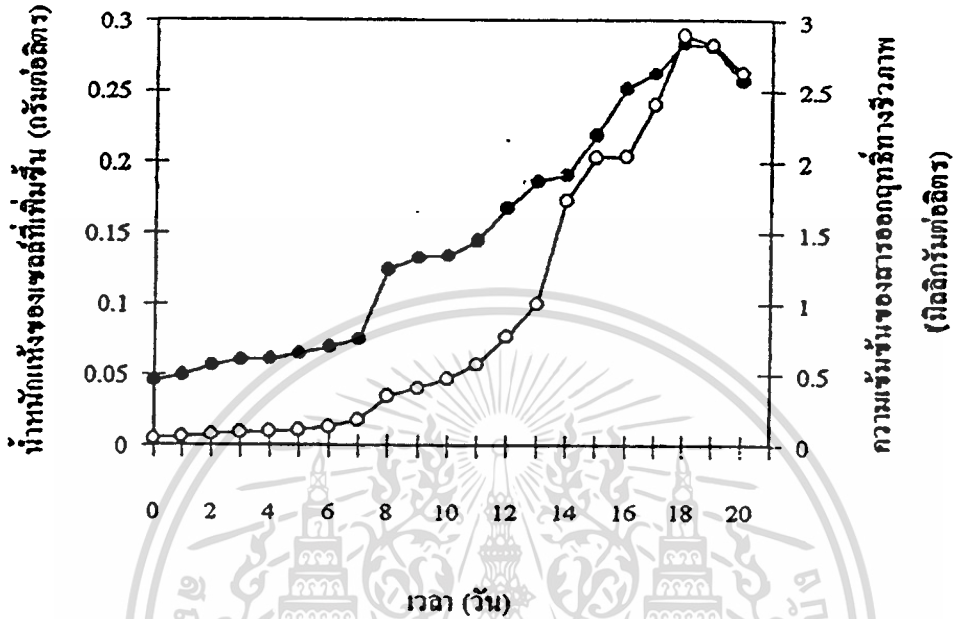
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14

อาหารเลี้ยงสาหร่าย*	N-source	NaNO ₃ (กรัมต่อลิตร)	K ₂ HPO ₄ (กรัมต่อลิตร)	NaCl (กรัมต่อลิตร)	ฟิโอส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้ง** (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ **	
							(มิลลิกรัมต่อลิตร)	(มิลลิกรัมต่อกรัม)
อาหารพื้นฐาน (Basal-BGA)	-	0.0	0.6	0.07	7.5	0.11	0.29	2.54
อาหารที่เหมาะสม (BGA ดัดแปลง)	NaNO ₃	1.5	1.5	0.03	7.0	0.28	2.90	10.21

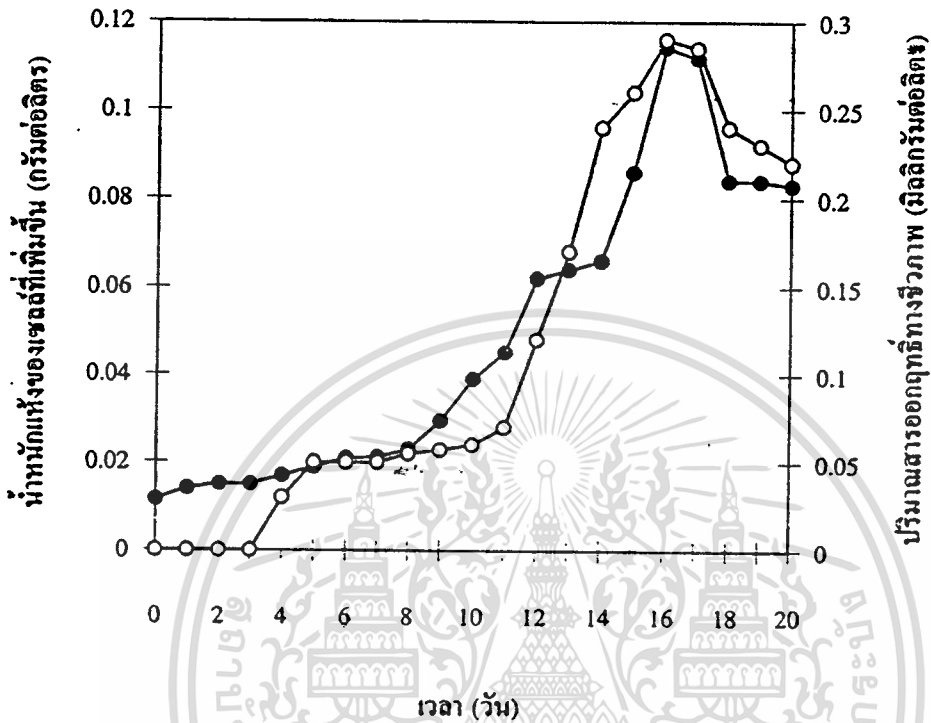
ตารางที่ 14 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906
หมายเหตุ * สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร
ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที

** การเจริญเติบโต คำนวณจากน้ำหนักแห้งของเซลล์ในช่วงสุดท้ายของการเจริญ ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคำนวณในช่วง early stationary และนำไปเทียบกับความเข้มข้นของ standard cycloheximide มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม



ภาพที่ 18 แสดงช่วงเวลาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ในอาหาร BGA คัดแปลงที่มีส่วนประกอบของโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที

- น้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)
- ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อเทียบกับ standard cycloheximide (มิลลิกรัมต่อลิตร)



ภาพที่ 19 แสดงช่วงเวลาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ในอาหาร BGA บ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซน ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที

- น้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)
- ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อเทียบกับ
standard cycloheximide (มิลลิกรัมต่อลิตร)

4.5 ความเข้มข้นที่น้อยสุด (minimum inhibit concentration) ของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina*

ความเข้มข้นที่น้อยสุดของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina* ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 15 พบว่าเมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายมาละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อแผ่น มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี paper disc plate ความเข้มข้นที่น้อยสุดในการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* มีความเข้มข้น 0.09 มิลลิกรัมต่อแผ่น เมื่อเทียบกับ standard cycloheximide จะมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 3.82 ไมโครกรัมต่อแผ่น



ตารางที่ 15

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อแผ่น)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ไมโครกรัมต่อแผ่น)
0.01	0
0.02	0
0.03	0
0.04	0
0.05	0
0.06	0
0.07	0
0.08	0
0.09	3.82
0.1	5.23
0.2	12.12
0.3	14.15
0.4	14.95
0.5	18.44
0.6	22.75
0.7	28.07
0.8	31.17
0.9	36.63
1.0	36.63

ตารางที่ 15 แสดงความเข้มข้นที่น้อยสุด (minimum inhibition concentration) ของสารสกัดจาก *Calothrix* TISTR 8906 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. phaseolina*

หมายเหตุ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบกับ standard cycloheximide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การทดสอบรูปแบบ การใช้สารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* สาเหตุโรคเน่าดำ ของถั่วเขียว ในจานเพาะเชื้อ

จากการนำสารสกัดมาละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาศึกษารูปแบบการใช้สารสกัด โดยผสมสารสกัดด้วยผงแป้งในปริมาณ 0.2 กรัมต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร และสารสกัดผสมสารลดแรงตึงผิว ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อสารสกัด 1 ลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 16 และภาพที่ 20 พบว่าสารสกัดที่ละลายในเมทานอลผสมสารลดแรงตึงผิว 0.1% เป็นรูปแบบที่เหมาะสมในการนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ติดเชือบนถั่วเขียวดีที่สุด โดยพบความรุนแรงของการติดเชื้อน้อยสุด โดยมีค่าเฉลี่ย 0.4 การใช้สารสกัดที่ละลายในเมทานอลอย่างเดียว พบความรุนแรงของการติดเชื้อมีค่าเฉลี่ย 0.7 และรูปแบบการใช้สารสกัดผสมผงแป้ง พบความรุนแรงของการติดเชื้อเฉลี่ย 1.2 ส่วนตัวควบคุมซึ่งนำสารละลายเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ดเคลือบบนเมล็ดถั่วเขียว พบความรุนแรงของการติดเชื้อมีค่าเฉลี่ย 20

สำหรับการเปรียบเทียบรูปแบบการใช้สารสกัดผสมสารลดแรงตึงผิว สารสกัดละลายละลายในเมทานอลอย่างเดียวและการใช้สารเคมี พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะแตกต่างกับการยับยั้งเชื้อราบนต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้ใช้สารสกัด (ตัวควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเจริญเติบโตของถั่วเขียวพบว่า สารสกัดผสมสารลดแรงตึงผิว ทำให้ถั่วเขียวมีความสูงของลำต้นดีที่สุด และมีจำนวนรากที่มากกว่าการใช้สารเคมี โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงนำสารสกัดในรูปแบบผสมกับสารลดแรงตึงผิวไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 16

การทดลอง	ถั่วเขียวที่ติดเชื้อรา ¹	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา ²	ความสูงลำต้น	จำนวนราก
เมล็ด	0	0	9.50 b ³	3.10 b
เมล็ด+เชื้อรา (ตัวควบคุม)	20 c	0	0 a	0 a
เมล็ด+สารสกัด ⁴ (เมทานอล)+เชื้อรา ⁵	0.7 a	96.5	11.99 c	2.92 b
เมล็ด+สารสกัด (เมทานอล)+ผงแป้ง+เชื้อรา	1.2 b	94.0	12.01 c	3.48 b
เมล็ด+สารสกัด (เมทานอล)+สารลดแรงตึงผิว+เชื้อรา	0.4 a	98.0	13.54 d	4.03 c
เมล็ด+สารเคมี ⁶ +เชื้อรา	0.2 a	99.0	9.11 b	3.04 b

ตารางที่ 16 แสดงผลการทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดจาก *Calothyrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* บนถั่วเขียว

หมายเหตุ

¹: ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด

²: เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $\frac{\text{ค่าประเมินการเจริญของเชื้อราบนถั่วเขียวที่ไม่มีสารสกัด} - \text{ค่าประเมินการเจริญของเชื้อราบนถั่วเขียวที่มีสารสกัด}}{\text{ค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อราบนถั่วเขียวที่ไม่มีสารสกัด}} \times 100$

³: ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยวิธี Duncan's multiple range test

⁴: สารสกัดจาก *Calothyrix* sp. TISTR 8906 ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อเมล็ด โดยรูปแบบการใช้สารสกัดละลายในเมทานอลผสมผงแป้ง สารลดแรงตึงผิว 0.1% (สารสกัด 100 มิลลิกรัม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบกับ cycloheximide 1.8 มิลลิกรัม) ตัวควบคุม เคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยเมทานอล

⁵: เชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ด

⁶: สารเคมี mancozeb ซึ่งความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้ทางการค้า 3 กรัมต่อเมล็ดถั่วเขียว

หรือ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 20 แสดงผลการศึกษาการทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ด้วยผงแป้ง สารลดแรงตึงผิว และสารสกัดละลายในเมทานอลอย่างเดี่ยว ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* สาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียว ในจานเพาะเชื้อ

4.7 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Calothyrix* sp. TISTR 8906 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ในงานเพาะเชื้อ

จากการนำสารสกัดที่ละลายในเมทานอลผสมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 100 200 250 300 350 400 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อเมลลิต มาศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมลลิต ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 17 และภาพที่ 21 พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อเมลลิต มีค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวเฉลี่ย 1.6 ส่วนที่ความเข้มข้น 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อเมลลิต ค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวเท่ากัน โดยมีค่าเฉลี่ย 1.0 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดถึง 500 ไมโครกรัมต่อเมลลิต ค่าการติดเชื้อเท่ากับ 0 เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี mancozeb ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อเมลลิต พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อเมลลิต มีค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวเท่ากัน อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อเมลลิตขึ้นไป หรือเมื่อเทียบกับ standard cycloheximide ที่ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อเมลลิต สามารถยับยั้งการติดเชื้อได้ โดยให้ค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 17

การทดลอง	ถั่วเขียวที่ติดเชื้อรา ¹
เมล็ด+เชื้อรา	20.0 d ²
เมล็ด+สารสกัด ³ 100 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา ⁴	12.4 c
เมล็ด+สารสกัด 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา	6.2 b
เมล็ด+สารสกัด 250 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา	1.6 a
เมล็ด+สารสกัด 300 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา	1.2 a
เมล็ด+สารสกัด 350 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา	1.0 a
เมล็ด+สารสกัด 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา	1.0 a
เมล็ด+สารสกัด 450 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา	0.4 a
เมล็ด+สารสกัด 500 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา	0 a
เมล็ด+สารเคมี ⁵ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา	0 a

ตารางที่ 17 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Calothyrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ของถั่วเขียว ในงานเพาะเชื้อ

หมายเหตุ

¹: ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด

²: ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยวิธี Duncan's multiple range test

³: สารสกัดจาก *Calothyrix* sp. TISTR 8906 ผสมสารลดแรงตึงผิว 0.1% (สารสกัด 100 มิลลิกรัม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบกับ cycloheximide 1.8 มิลลิกรัม) ตัวควบคุม เคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยเมทานอลผสมสารลดแรงตึงผิว

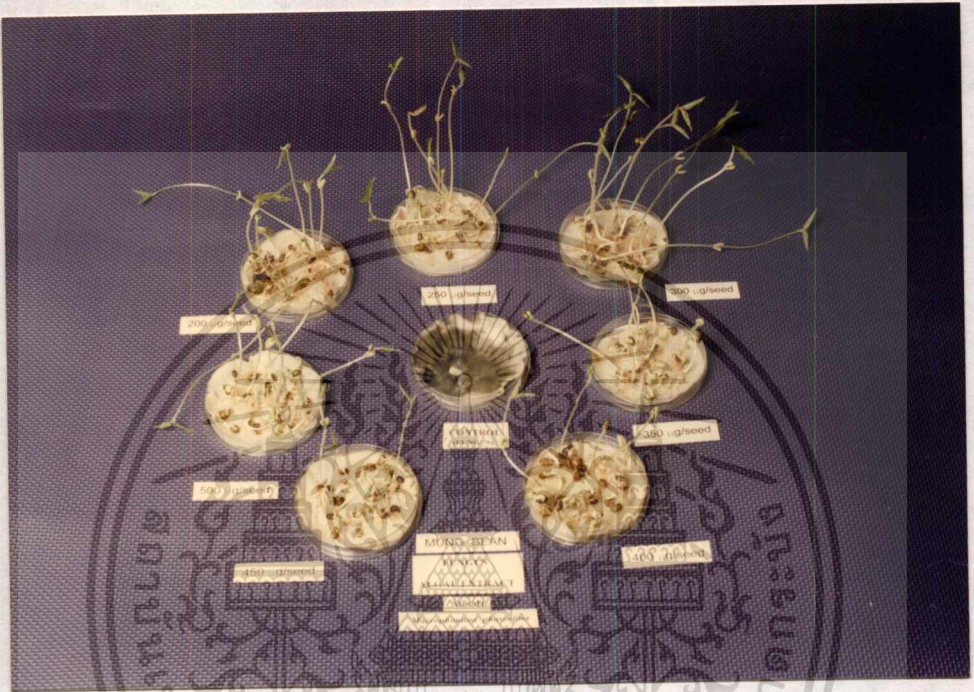
⁴: เชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ด

⁵: สารเคมี mancozeb ซึ่งความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้ทางการค้า 3 กรัมต่อเมล็ด

ถั่วเขียว 1 กิโลกรัม หรือ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 21 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ที่ความเข้มข้น 100 200 250 300 350 400 450 500 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* สาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียว

4.8 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อรา *M. phaseolina* และความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการติดเชื้อราของถั่วเขียว

จากการนำสารสกัดมาละลายในเมทานอลและผสมสารลดแรงตึงผิว ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 10 100 และ 500 CFU ต่อเมล็ด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 18 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้น 10 CFU ต่อเมล็ด มีค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวเฉลี่ย 1.8 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อรา ค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวจะสูงขึ้น โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อรา 100 CFU ต่อเมล็ด ค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวเฉลี่ย 5.2 สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อเมล็ด มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้น 10 100 และ 500 CFU ต่อเมล็ด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนที่ความเข้มข้นของสารสกัด 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้น 10 CFU ต่อเมล็ด มีค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวเฉลี่ย 0.6 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อรา ค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวจะสูงขึ้นเช่นกัน โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อรา 500 CFU ต่อเมล็ด ค่าการติดเชื้อราของถั่วเขียวเฉลี่ย 2.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้น 10 100 และ 500 CFU ต่อเมล็ด โดยสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด พบว่าการติดเชื้อราของถั่วเขียวมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับความเข้มข้นของเชื้อราที่ 10 100 และ 500 CFU ต่อเมล็ด ต่อการติดเชื้อราบนถั่วเขียวปรากฏว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อรา 100 และ 500 CFU ต่อเมล็ด การติดเชื้อราบนถั่วเขียวมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อรา 500 CFU ต่อเมล็ด ถั่วเขียวมีการติดเชื้อราสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของเชื้อราที่ 10 และ 100 CFU ต่อเมล็ด พบว่าค่าการติดเชื้อราของถั่วเขียวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดที่ 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้น 10 100 และ 500 CFU ต่อเมล็ด พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ต่อต้านเชื้อรา *M. phaseolina* ได้ดีกว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อเมล็ด แต่การติดเชื้อของถั่วเขียวมีค่าไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อราทำให้การเกิดโรคของถั่วเขียวสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ในการยับยั้งเชื้อราขึ้นกับความเข้มข้นของเชื้อราและความเข้มข้นของสารสกัด โดยถ้าเชื้อรามีความเข้มข้นมากขึ้น จะต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้มากขึ้นด้วย จึงจะทำให้สารสกัดจากสาหร่ายยับยั้งเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.9 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อ *M. phaseolina* สาเหตุโรคนำดำของถั่วเขียว ในถุงพลาสติกเพาะกล้า

จากการใช้สารสกัดที่ละลายในเมทานอลผสมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อต้านเชื้อรา *M. phaseolina* โดยการปลูกเชื้อราบนถั่วเขียวด้วยวิธีผสมสารแขวนลอย ของเชื้อราที่ความเข้มข้น 10^3 CFU ต่อดิน 1 กรัม ลงในดิน (soil-borne) ซึ่งวิธีนี้เชื้อราจะกระจายในดินได้คืออย่างทั่วถึง แต่ปริมาณเชื้อราที่ติดเชื้อบนถั่วเขียวจะไม่เท่ากันในแต่ละเมล็ด และวิธีเคลือบสารละลายเชื้อราที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ด บนถั่วเขียวโดยตรง (seed-borne) ซึ่งเป็นวิธีที่เมล็ดถั่วเขียวติดเชื้อรา มีปริมาณเท่ากันทุกเมล็ด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 19 พบว่าทั้ง 2 วิธี มีค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิธีผสมสารละลายเชื้อราลงในดิน จะมีค่าการติดเชื้อราของถั่วเขียว 0.3 ส่วนวิธีเคลือบเชื้อราบนเมล็ดถั่วเขียวมีค่าการติดเชื้อรา 0.4 อย่างไรก็ตาม พบว่าถั่วเขียวที่ไม่ใช้สารสกัด (ตัวควบคุม) เมื่อทดสอบกับเชื้อราด้วยวิธีผสมเชื้อราในดิน และวิธีหดยคเชื้อราบนเมล็ด พบว่ามีการติดเชื้อราเพียง 25.8% ซึ่งต่างกับการทดลองในงานเพาะเชื้อรา ซึ่งมีการติดเชื้อสูงถึง 100% ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า มีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับการปลูกถั่วเขียวในแปลงเพาะปลูกจริง ซึ่งมีปัจจัยที่สำคัญมาเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อรา คืออุณหภูมิและความชื้น (Charles, 1977) โดยพบว่าบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เชื้อรามีการตอบสนองต่อ host สูง โดยในระยะแรกเส้นใยจะเข้าสู่ต้นกล้า (Luttrell, 1952) จากนั้นเกิดการ from รูปร่างเป็น sclerotia อยู่ในเนื้อเยื่อ host และพบว่าบริเวณพื้นที่ ที่มีความชื้นมากกว่า 80% เชื้อราจะไม่เข้าทำลายพืช

เมื่อใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ความเข้มข้น 250

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเชื้อ *M. phaseolina* ทั้งวิธีผสมในดิน และวิธีหดยคบนเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การติดเชื้อของถั่วเขียว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบการใช้สารสกัดจากสาหร่ายกับการใช้สารเคมี mancozeb พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อ *M. phaseolina* ในถั่วเขียวได้ในทำนองเดียวกัน ดังภาพที่ 22



ตารางที่ 18

การทดลอง	ถั่วเขียวที่ติดเชื้อรา ¹
เมล็ด+เชื้อรา 10 CFU ต่อเมล็ด	13.2 b ²
เมล็ด+เชื้อรา 100 CFU ต่อเมล็ด	17.6 c
เมล็ด+เชื้อรา 500 CFU ต่อเมล็ด	20.0 c
เมล็ด+สารสกัด ³ 100 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา ⁴ 10 CFU ต่อเมล็ด	1.8 a
เมล็ด+สารสกัด 100 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา 100 CFU ต่อเมล็ด	2.2 a
เมล็ด+สารสกัด 100 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา 500 CFU ต่อเมล็ด	5.2 a
เมล็ด+สารสกัด 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา 10 CFU ต่อเมล็ด	0.6 a
เมล็ด+สารสกัด 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา 100 CFU ต่อเมล็ด	1.6 a
เมล็ด+สารสกัด 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด+เชื้อรา 500 CFU ต่อเมล็ด	2.2 a

ตารางที่ 18 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อ *M. phaseolina* และความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Calothyrix* sp. TISTR 8906 ต่อการติดเชื้อของถั่วเขียวในงานเพาะเชื้อ

หมายเหตุ

¹: ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด

²: ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยวิธี Duncan's multiple range test

³: สารสกัดผสมสารลดแรงตึงผิว 0.1% (สารสกัด 100 มิลลิกรัม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบกับปริมาณ cycloheximide 1.8 มิลลิกรัม) ตัวควบคุม เคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยเมทานอลผสมสารลดแรงตึงผิว

⁴: เชื้อรา *M. phaseolina*

ตารางที่ 19

วิธีทดลอง	การทดลอง	ถั่วเขียวที่ติดเชื้อราโรค- พืช ¹
วิธีผสมในดิน	เมล็ด+เชื้อรา (ตัวควบคุม)	1.55 a ²
(soil-borne)	เมล็ด+สารสกัด ³ (250 ไมโครกรัมต่อเมล็ด) +เชื้อรา ⁴	0.30 b
	เมล็ด+สารเคมี ⁶ (200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด) + เชื้อรา	0.20 b
วิธีหยดบนเมล็ด	เมล็ด+เชื้อรา (ตัวควบคุม)	1.55 a
(seed-borne)	เมล็ด+สารสกัด (250 ไมโครกรัมต่อเมล็ด) +เชื้อรา ⁵	0.40 b
	เมล็ด+สารเคมี (200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด) + เชื้อรา	0.15 b

ตารางที่ 19 แสดงการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* สาเหตุโรคน้ำดำของถั่วเขียวในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า

หมายเหตุ

¹: ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ซ้ำละ 6 เมล็ด

²: ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยวิธี Duncan's multiple range test

³: สารสกัดที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อเมล็ดผสมสารลดแรงตึงผิว 0.1% (สารสกัด 100 มิลลิกรัม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบกับ cycloheximide 1.8 มิลลิกรัม) ตัวควบคุม เคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยเมทานอลผสมสารลดแรงตึงผิว

⁴: เชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 10^3 CFU ต่อดิน 1 กรัม

⁵: เชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ด

⁶: สารเคมี mancozeb ความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้ทางการค้า 3 กรัมต่อเมล็ดถั่วเขียว 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 22 แสดงผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* สาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียว ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.10 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (physicochemical) บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906

คุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารที่ศึกษา ได้แก่คุณสมบัติของความเสถียรในสภาวะความเป็นกรด-เบสต่าง ๆ กัน และความเสถียรของสารสกัดที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของสารมีดังนี้

4.10.1 ความเสถียรของสารสกัดในสภาวะความเป็นกรด-เบสต่างๆ

จากการศึกษาพบว่าเมื่อปรับค่าความเป็นกรด-เบส ของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ให้มีพีเอช 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 23 พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงพีเอช 5 ถึง 8 ความสามารถในการยับยั้งสัณพันธ์เมื่อเทียบกับพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัณพันธ์คงเหลือ 90% และที่พีเอช 6 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัณพันธ์เท่ากับ 100% เมื่อเพิ่มความเป็นกรดตั้งแต่พีเอช 5 และความเป็นเบสตั้งแต่พีเอช 8 ความสามารถในการยับยั้งสัณพันธ์จะลดลง โดยที่พีเอช 13 ความเสถียรของสารสกัดลดลงและมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัณพันธ์คงเหลือ 20% ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วงพีเอช 5 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัณพันธ์คงเหลือ 85% และที่ความเป็นกรด-เบสที่พีเอช 6 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัณพันธ์คงเหลือ 90% เมื่อเพิ่มความเป็นเบสมากๆ ก็คือที่พีเอช 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัณพันธ์เท่ากับ 0 จะเห็นได้ว่าสารที่ผลิตได้ไม่เสถียรอย่างมากในสภาวะความเป็นกรดหรือเบสมากๆ และพบว่าที่พีเอช 6 และ 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดจะมีความเสถียรโดยมีความสามารถในการยับยั้งสัณพันธ์ 100%

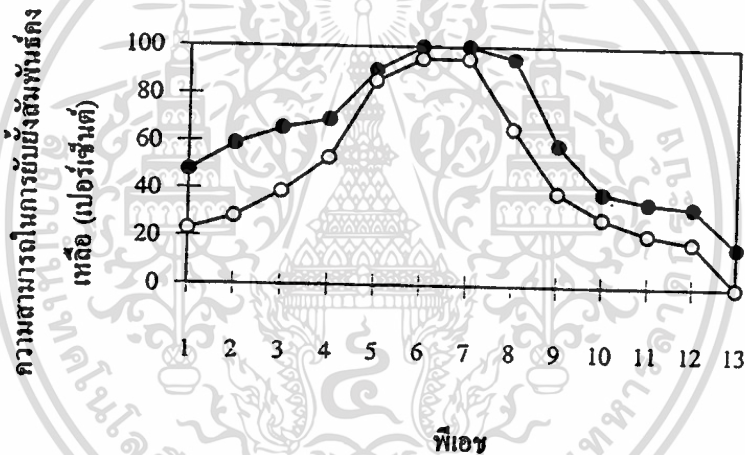
4.10.2 ความเสถียรของสารสกัดที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

จากการศึกษาความเสถียรของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ที่อุณหภูมิ 50 70 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับสภาพให้เป็นกลาง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 24 พบว่าสารสกัดมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัณพันธ์เท่ากับ 100%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้ไปเผยแพร่ภายนอก

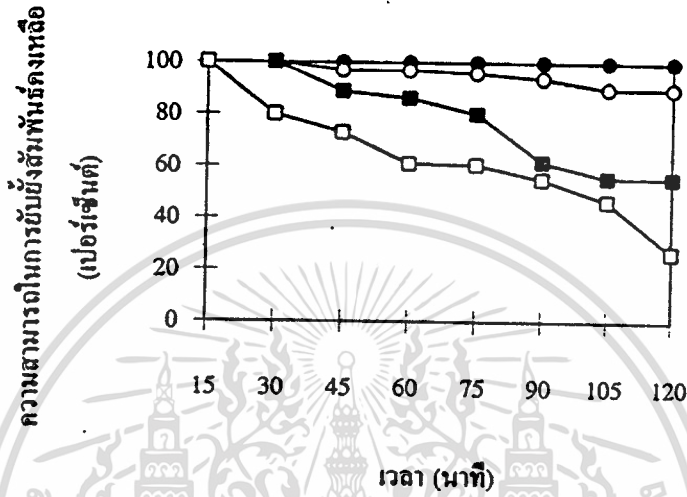
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 70 และ 100 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความเสถียรเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น ความเสถียรของสารจะลดลง โดยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์คงเหลือ 90 เปอร์เซนต์ และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์คงเหลือ 60% จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่ม อุณหภูมิให้สูงขึ้น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์จะลดลงและเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์คงเหลือ 25%



ภาพที่ 23 แสดงความเสถียรของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ที่พีเอช 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตัวควบคุม พีเอช 7 อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์เชื้อรา 100%)

- อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 24 แสดงความเสถียรของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ที่อุณหภูมิ 50 70 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ตัวควบคุม พีเอช 7 อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัณฐานเชื้อรา 100%)

- อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส

4.11 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย

Calothrix sp. TISTR 8906

4.11.1 การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่ผลิตโดย

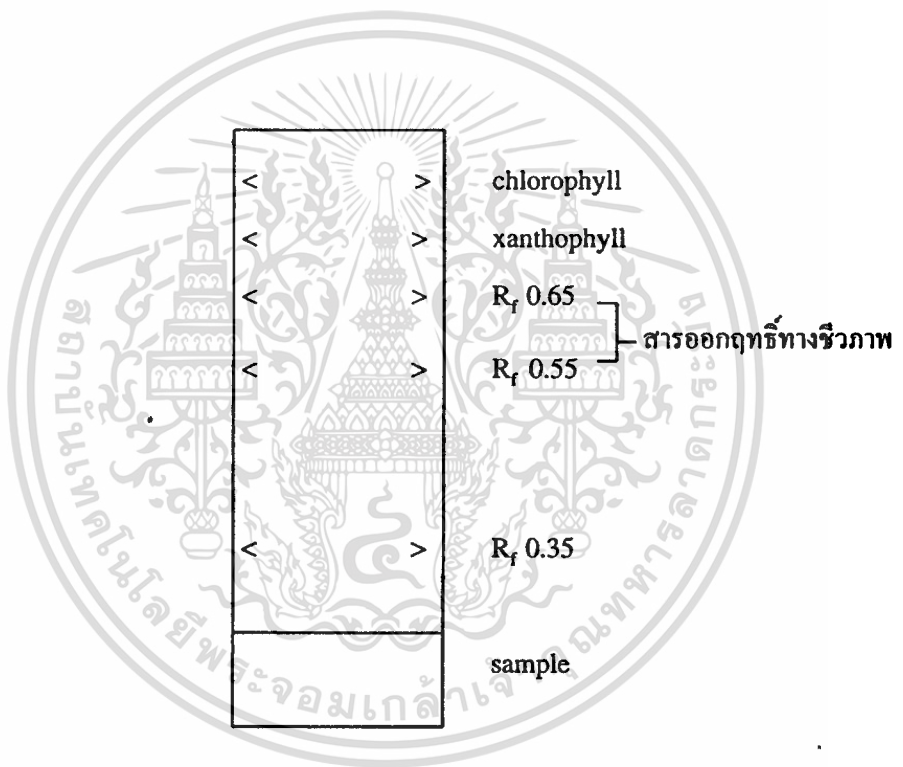
Calothrix sp. TISTR 8906 ออกจากสิ่งเจือปน โดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

จากการใช้วิธีซิลิกาเจลทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี และตรวจหาดำ-
แหน่งของสารโดยวิธีออดิโอบีโอกราฟี พบว่าสารละลายผสมของ คลอโรฟอร์ม : เมทา-
นอล : น้ำ ในอัตราส่วน 7:3:1 เป็นระบบที่เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่
ผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ออกจากสิ่งเจือปน จึงนำระบบที่เหมาะสมดังกล่าว
ไปศึกษาในขั้นต่อไป

4.11.2 การใช้วิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีว ภาพที่ผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ออกจากสิ่งเจือปน

จากการตรวจหาดำแหน่งของสารโดยวิธีออดิโอบีโอกราฟี โดยใช้สาร
ละลายผสมของคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 7:3:1 ซึ่งเป็นระบบที่เหมาะสม
ในการแยกสิ่งเจือปนและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 25
และ ภาพที่ 26 พบตำแหน่งของสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช 2 ตำแหน่ง
ที่ค่า R_f 0.55 และ 0.65 โดยที่ค่า R_f 0.65 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราดีกว่าที่ค่า R_f
0.55 และเมื่อนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ความเข้มข้น 1
มิลลิกรัมต่อแผ่น ทดสอบกับเชื้อรา พบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อเปรียบเทียบกับ
กับ standard cycloheximide พบว่าที่ค่า R_f 0.65 มีปริมาณสาร 34.41 ไมโครกรัมต่อแผ่น
ส่วนที่ค่า R_f 0.55 มีปริมาณสาร 9.79 ไมโครกรัมต่อแผ่น ทั้งนี้เนื่องจากที่ค่า R_f 0.65 องค์
ประกอบของสารอาจเป็นโครงสร้างหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนที่ค่า R_f 0.55
เป็นอนุพันธ์ของโครงสร้างหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงพบสารออกฤทธิ์ทางชีว
ภาพน้อยกว่า เมื่อสังเกตตำแหน่งของสารด้วยตาเปล่าก่อนตรวจหาโดยวิธีต่างๆ พบว่า
ตำแหน่งของสารที่ค่า R_f 0.55 และ 0.65 จะอยู่ได้ตำแหน่งที่มีสีเหลืองบนแผ่นซิลิกาเจลซึ่ง
เป็นแถบของแซนโทฟิลล์ (xanthophyll)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 25 แสดงแบบแผนการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 โดยวิธีซิลิกาเจลทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ในระบบตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 7:3:1



ภาพที่ 26 แสดงตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 โดยวิธีอโตไบโอกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.12 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906

4.12.1 การทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพภายหลังการแยกออกจากสิ่งเจือปน ด้วยวิธีซิลิกาเจลทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

จากการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งผ่านกรรมวิธีซิลิกาเจลทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี มาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีได้แก่ ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch's test, anthrone test และ unsaturation test ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 20 พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ให้ผลการทดสอบปฏิกิริยาในทำนองเดียวกัน คือให้ผลลบกับ ninhydrin reaction ซึ่งไม่พบกรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโนในเปปไทด์หรือโปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มีส่วนประกอบของโปรตีน จึงทำการทดสอบปฏิกิริยา biuret reaction ผลการทดลองให้ผลเป็นลบเช่นกัน ส่วนการทดสอบ Molisch's test และ anthrone test เป็นการทดสอบน้ำตาลต่างๆไป ให้ผลเป็นลบ ในการทดลอง unsaturation test เพื่อหากรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ พบว่าไม่พบกรดไขมันในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการทดสอบทางเคมี พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้ผลเป็นลบ เนื่องจากส่วนใหญ่แล้ว สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำพวก cyclic peptide ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ การทดสอบทางเคมีไม่สามารถค้นพบได้ จึงไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี

4.12.2 การทดสอบเอนไซม์โปรตีเอส

จากการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งผ่านกรรมวิธีซิลิกาเจลทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี มาทดสอบ protease inhibition เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบปฏิกิริยา ninhydrin reaction ผลการทดลองให้ผลเป็นลบ โดยพบว่าเมื่อนำเอนไซม์โปรตีเอส มาข่อย

ออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์โปรติเอส แสดงว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ไม่มีโครงสร้างที่เป็นเปปไทด์สั้นๆ จึงไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอส

ตารางที่ 20	
วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
ninhydrin reaction	negative
biuret reaction	negative
Molisch's test	negative
anthrone test	negative
unsaturation test	negative

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของ
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 165 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาแยกและคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อราโรคพืช โดยวิธี paper disc plate ซึ่งเชื้อราที่นำมาทดสอบมี 6 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum truncatum*, *Curvularia lunata*, *F. oxysporum*, *Bipolaris maydis*, *M. phaseolina* และ *Pyricularia grisea* พบสาหร่ายยับยั้งเชื้อราโรคพืช ได้แก่ สาหร่ายสกุล *Calothrix* 5 สายพันธุ์ สกุล *Fischerella* 2 สายพันธุ์ และสกุล *Scytonema* 1 สายพันธุ์ โดยสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum*, *Bipolaris maydis*, *M. phaseolina* ได้ดีที่สุด

จากการศึกษาอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 พบว่าสาหร่ายมีการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA ดัดแปลงที่มีองค์ประกอบของโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร ไคโทแซนไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส ในถัง carboy บรรจุอาหาร 10 ลิตร ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 18 วัน จากการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสภาพการตรึงไนโตรเจนกับสภาพอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสม ในสภาพการเพาะเลี้ยงเดียวกันพบว่าในสภาพอาหารที่เหมาะสมมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 2.55 เท่า และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพการตรึงไนโตรเจน

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีว-

ภาพจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 โดยเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าการเจริญของสาหร่ายเริ่มเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 18 ของการบ่มสาหร่าย และพบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ปริมาณมากที่สุด โดยเมื่อเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับ standard cycloheximide มีปริมาณ 2.9 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาความเสถียรของสารที่อุณหภูมิและระดับความเป็นกรด-เบส ต่างๆ พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และมีความเสถียรต่อสภาพความเป็นกรด-เบสที่ พีเอช 6 ถึง 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากการใช้วิธีซิลิกาเจลทินแลเยอร์โครมาโทกราฟีแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Calothrix* sp. TISTR 8906 คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 7 : 3 : 1 และตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวอยู่ที่ R_f 0.65 และ 0.55 เมื่อนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกออกจากสิ่งเจือปนแล้วไปทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี ให้ผลลบกับ ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch test, anthrone test และ unsaturation test ส่วนการทดสอบด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ให้ผลเป็นลบเช่นกัน

จากการทดสอบรูปแบบการใช้สารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* สาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียว ในงานเพาะเชื้อ พบว่าสารสกัดละลายในเมทานอลผสมสารลดแรงตึงผิว 0.1% เป็นรูปแบบที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช ส่วนการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ความเข้มข้น 500 CFU ต่อเมล็ด พบว่าระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 250 ไมโครกรัมต่อเมล็ดขึ้นไป ยับยั้งการติดเชื้อราได้ โดยให้ค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี mancozeb ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อเมล็ด

จากการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อรา *M. phaseolina* และความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8906 ต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของถั่วเขียว พบว่า

ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อราขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อราและความ

เข้มข้นของสารสกัด โดยถ้าเชื้อรามีความเข้มข้นสูงขึ้น จะต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้สูงขึ้นด้วย จึงจะทำให้สารสกัดจากสาหร่ายชั้นขี้เชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *M. phaseolina* ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะกล้า โดยวิธีผสมเชื้อราในดิน และวิธีหยดเชื้อราบนเมล็ด พบว่าทั้ง 2 วิธี มีค่าการติดเชื้อของถั่วเขียวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่ต่างกับสารเคมี mancozeb

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จึงควรจะมีการศึกษาต่อในด้านการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้อยู่ในสภาพที่บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อนำไปศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างโมเลกุลของสารและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต่อไป การทดสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ และการปรับปรุงวิธีการในการผลิตและปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.2.2 เพื่อความถูกต้องแม่นยำและยืนยันถึงผลการทดลองให้แน่นอน ควรมีการศึกษาและใช้งานจริงในแปลงทดลองและเปรียบเทียบกับในแปลงที่ทำการเกษตร โดยจะมีตัวแปรทางด้านดิน ลม อากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิ แสงศัตรูพืช และปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง

5.2.3 เพื่อความเป็นไปได้ต่อการถ่ายทอดเทคโนโลยีใหม่ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้แก่เกษตรกรทั่วไป ควรมีการศึกษาถึงต้นทุนในการผลิต รวมถึงค่าใช้จ่าย เพื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8906 กับการใช้สารเคมีของเกษตรกรในปัจจุบันแสดงให้เห็นโดยชัดเจน

5.2.4 ควรมีการศึกษารูปแบบการใช้สารสกัด การเก็บรักษา วิธีการใช้ หรือการแปรสภาพให้สะดวกต่อการใช้ของเกษตรกร รวมไปถึงรูปแบบการผลิตที่อาจจะเป็นไปได้ในเชิงเศรษฐศาสตร์ เพื่อเผยแพร่ออกสู่ตลาดทางด้านเกษตรกรรม ทดแทนการใช้สารเคมีในทางการเกษตรในปัจจุบัน

บรรณานุกรม

กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. เอกสารวิชาการคู่มือการป้องกันและกำจัดโรคพืชด้วยสารเคมีปี 2535. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2535.

จรัญ จันทลักขณา. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนวิจัย. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช, 2523.

จุฬารัตน์ เสรีเชษฐพงษ์. “ดินค่าน้ำชุ่ม” วารสารฐานสัปดาห์วิจารณ์. ฉบับที่ 114 : 39-41.

ไชยา เพ็งอ่อน. ถั่วและพืชคลุมดิน. บริษัทเคสดีไทย กรุงเทพฯ, 2539.

ดวงพร คันธโชติ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พรินติ้งเฮ้าส์, 2530.

ไพฑูรย์ พิสุทธิสินธุ์. สถิติการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช พ.ศ 2536. กรุงเทพฯ : ฝ่ายวัตถุดิบพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2536.

มาลินี ดันติยาภรณ์. พฤกษศาสตร์ทั่วไป. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2534.

ยุวดี พิรพรพิศาล. สานทราย. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2538.

สมศิริ แสงโชติ. โรคพืชเบื้องต้น บทปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529 .

อาภารัตน์ มหาขันธ์. “สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำ.” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 : 39-53.

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antarikanonda, P. Berndt. H, Mayer F. "Hydrogen : a new inhibitor of photosynthesis in the blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena* sp.TA.1." Journal of Archive Microbiology. 145 (1980) : 1-10.

Aharonowitz, Y. "Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis." Journal of Annual Review Microbiology. 34 (1980) : 209-233.

Allen, M.B. "The cultivation of Myxophyceae." Journal of Archive Microbiology. 17 (1952) : 34-35.

Bauer, A.W., J.C. Sherris and M. Turch. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method." Journal of Clinical Pathology. 45 (1966) : 493-496.

Bhattacharya, M. and K.R. Samaddar. "Epidemiological studies on jute diseases survival of *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Ashby in soil." Journal of Diseases Report. 44 (1976) : 27-36

Bostwick, C.D., Brown, I .R and Tischer, R. G. "Some observations in the blue-green alga. *Anabaena flos-aquae* A-37." Journal of Plant Physiology. 21 (1968) : 466.

Bu'Lock, J.D. "Intermediary metabolism and antibiotic synthesis." Journal of Advance Applied Microbiology. 3(1961) : 293-342.

Canto de Loura, I and Dubacy. "The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipid of cyanobacteria." Journal of Plant Physiology. 83 (1987) : 838-843.

Carmichael, W.W and Biggs, D.F. "Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1." Journal of Toxicology. 17 (1979) : 229-236.

Chetsumon, A. Maeda, I and Umeda, F. "Antibiotic production by the immobilized cyanobacterium *Scytonema* sp. TISTR 8208, in a seaweed - type photobioreactor." Journal of Applied Phycology. 6 (1994) : 539-543.

Chang, I. Kommedahl. "Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms." Journal of Phytopathology. 58 (1968) : 8

Charles, Y. Yang. Mungbean Disease and Their Control-A Review. Senior Pathologist, Head of Department of Plant Pathology, AVRDC, 1977. 44pp.

Coleman, J.R. and Colman, B. The effect of pH on photosynthesis and inorganic carbon accumulation in a blue-green alga in photosynthesis IV regulation of carbon metabolism. Akoyunoglou . G. Ed., Balaban International Science Services. Philadelphia. Pa. 1981.

Collins, G.H. and Patricia M. Microbiological Method : Laboratory Techniques. Series. 3 rd . ed. Butterworth and Co. (Publisher) Ltd., London 1970 : 454 pp.

Crowe, A. and Crown, A. Mathematic for Biologists. New York : Academic Press. 1969 .

- Desikachary, T.V. Cyanophyta. Botany Department University of Madras., . Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 1959. 686 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dhibgra, O.D. and J.B. Sinclair. An Annotated Bibliography of *Macrophomina phaseoli*. Imprensa Universitaria, Universidade Federal de. Vicosa, Brazil. 1977 : 244 pp.
- Edmunds, L.K. "Combined relation of plant maturity, temperature, and soil moisture to charcoal stalk rot development in grain sorghum." Journal of Phytopathology. 54 (1964) : 514-517.
- Frankmoll, W.P. and Larsen, L.K. "Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa* isolation and biological properties." Journal of Antibiotics. 45 (1992) : 1451-1457.
- Ghaffar, A. and Zentmyer, G.A. "*Macrophomina phaseoli* on some new weed hosts in California." Journal of Plant Disease Report. 52 (1968) : 223.
- Goldman, J.C. and Jenkins, D. "the kinetics of inorganic carbon limited algal growth." Journal of Water Pollution Contaminated Food. 46 (1974) : 553.
- Healey, F.P and Hendzel, L.L "Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton." Journal of Fish Aquatic Science. 37 (1980) : 422.
- Hsi, D.C.H "An effective technique for screening sorghum resistance to charcoal rot." Journal of Phytopathology. 51 (1961) : 340-341.
- Ingle, R..K. and Colman, B. "Carbonic anhydrase levels in blue-green algae." Journal of Botany. 53 (1975) : 2385.
- Iwai, Y. and Omura, S "Culture condition for screening of new antibiotic." Journal of Antibiotics. 35 (1982) : 123-141.

Kaiser, W.J and H. Mossahebi. "Diseases of pulse crops (edible legumes). in Iran"
Journal of Plant Disease Report. 52 (1968) : 687-691.

Kumer, H.D. Introductory Phycology. New delhi : Affiliated East-West. Press Pvt Ltd,
1988.

Litzenberger, C. Mungbeans (*Vigna radiata*) in his guide for field crops in the tropics
and the subtropics. Washington, D.C., office of Agr., AID, 1974.

Loo, Y.H. and Thornberry, H. "Assay of streptomycin by the paper-disc plate method."
Journal of Bacteriology. 50(1945) : 701-709.

Lwoff, A. Introduction to biochemistry of protozoa , in Biochemistry and Physiology
of Protozoa, Vol.I Lowff. A. , Ed. Academic Press. New York. 1951.

Mackie, W.W "A. hitherto unreported disease of maize and beans." Journal of
Phytopathology. 22 (1932) : 637-644.

Malik, V.S. "Regulation of chorismate-derived antibiotic production." Journal of
Advance Microbiology. 25(1979) :75.

Martin, J.F. "Control of antibiotic synthesis by phosphate." Journal of Advance
Biochem Engineering. 6(1977) : 105-127.

Martin, J.P. Liras, P. and Demain, A.L. "ATP and adenylate energy change during
phosphate-mediated control of antibiotic synthesis." Journal of Biochemical
Biophysical Research. 83 : 822-825.

Miller, C.O. "Kinetic, a cell division factor from deoxyribonucleic acid." Journal
of American Society . 77 (1955) : 1392.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Miller, A.G. and Colman, B. "Evidence for HCO_3 transport by the blue-green alga (cyanobacterium) *Coccochloris penicystis*." Journal of Plant Physiology. 65 (1980) : 397.
- Moore, R.E. and Patterson, G.M. "toxins from cyanophytes belonging to the Scytonemataceae." Journal of Pure Applied Chemical. 58 (1986) : 263-271.
- Morris, I . Nitrogen assimilation and protein synthesis, in *Algal Physiology and Biochemistry*, Stewart, W.D. P. , Ed , Black well Scientific. Oxford. 1974. 583 pp.
- Neilson, A.H. and Larson, T. "The utilization of organic nitrogen for growth of algae : physiological aspects." Journal of Physiology Plant. 48 (1980) : 542.
- Nelson, A.H. and Lewin, R.H. "the uptake and utilization of organic carbon by algae : an essay in comparative biochemistry." Journal of Phycologia. 13 (1974) : 227.
- Ogata, K. Osawa, H. and Tani, Y. "Production of antibiotic by *Streptomyces* sp. a-60." Journal of Fermentation Technology. 55(1977) : 285-289.
- Oquist, G. "Changes in pigment composition and photosynthesis induced by iron-deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*." Journal of Plant Physiology . 25 (1971) : 188.
- Papavizas, G.C. and Klag, N.G. "Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseoli* from soil." Journal of Phytopathology. 65 (1975) : 182-187.

Patterson, G.M. and Caplin, C.M. "Antineoplastic activity of cultured blue-green algal (cyanophyta)" Journal of Phycology. 27 (1991) : 530-536.

Rachil, K.O. Grain legumes of the lowland tropics : mungbean. (By) K.O. Adv. in, Agron. 26 (1974) : 62-77.

Rangaswami, G. Diseases of pulses : Bengal gram, black gram and green gram. (In his diseases of crops plants in India , 2nd ed. New Delhi , Prentice-Hall of India, 1975. 257-269 pp.

Richmond, A. CRC Handbook of Microalgae Mass Culture. Florida : CRC Press , 1986.

Sato, N. and Murata, N. "Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga. *Anabaena variabilis*. the central role of diacylmonoalactosylglycerol in thermo adaptation." Journal of Biochemical Biophysiology Acta. 353 (1980) : 619.

Sieburth, J.M. "Acrylic acid an antibiotic principle in *Phaeocystis* bloom in Antarctic water." Journal of Science. 132 (1960) : 676.

Sokawa, Y. and Hase, E. "Suppressive effect of light on the formation of DNA and on the increase of deoxythymidine monophosphate kinase in *Chorella protothecoides*." Journal of Plant Cell Physiology. 9 (1968) : 461.

Smith, W.H. "Comparision of mycelial and sclerotial inoculum of *Macrophomina phaseolina* in the mortality of pine seedling under varying soil conditions." Journal of Phytopathology. 59 (1969) : 379-382.

Stainer, R.Y. and Bazize, G. "Purification and properties of unicellular blue-green algae(Order Chlorococcales)." Journal of Bacterial Review. 35 (1971) : 171-205.

Surk-Sik, M. Richard, E. and Gregory M.L. "Calophycin a fungicidal cyclic decapeptide from the terrestrial blue-green alga *Calothrix fusca*." Journal Organic Chemistry. 57 (1992) : 1097-1102.

Talling, J.F. Freshwater algae. in Physiology and Biochemistry of Algae , Lewin, A. Ed. Academic Press, New York. 1962 , 743 pp.

Thirumalachar, M.J. "Pycnidial stage of charcoal rot inciting fungus with a discussion on its nomenclature." Journal of Phytopathology. 43 (1953) : 608-610.

Thomas, W.H. Nutrient requirement and utilization algae in metabolism, Biological Handbooks. Altman P.T. and Dittmer. D.S. Eds. Federation of American Societies for experimental Biology , Bethesda. Md. 1968.

Vaccaro, R.F. Inorganic nitrogen in sea-water in chemical oceanography. Vol.1, Rilcy, J.P. and Skirrow, G., Eds., Academic Press. New York. 1965, 365 pp.

Versteate, D.R.T. "A comparison of the influence of iron on the growth and nitrate metabolism of *Anabaena* and *Scenedesmus*." Journal of Plant Physiology. 50 (1980) : 47.

Wada , H. and Marata , N. " Temperature-induced changes in the fatty acid composition on the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." Journal of Plant Physiology . 92 (1990) : 1062-1069.

Walter, P. and Frankmole. "Antifungal cyclic peptides the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*." Journal of Antibiotics. 1992 : 1458-1466.

Watanabe, T. and Smith, R.S. "Populations of microsclerotia of the soil-borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* in relation to stem blight of bean." Journal of Phytopathology. 65 (1975) : 182-187.

Wheeler, P.A. and North, B.B. "Amino acid uptake by marine physiology." Journal Limnol. Oceanogr. 19 (1974) : 249.

William, H. and Smith. "Comparision of mycelial and sclerotial inoculum of *Macrophomina phaseolina* in the mortality of pine seedling under varying soil condition." Journal of Phytopathology. 59 (1968) : 379-382.

Wyllie, T.D. and Brown, M.F. "Ultrastructure formation of sclerotiaa of *Macrophomina phaseolina* ." Journal of Phytopathology. 60 (1970) : 524-528.



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร BGA Medium (Antarikanonda, 1980) สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีส่วนประกอบดังนี้

NaCl	0.070	กรัม
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.380	กรัม
CaCl ₂	0.080	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.600	กรัม
Fe ₂ (SO ₄) ₃ . 6H ₂ O	0.010	กรัม
Titriplex III	0.027	กรัม
H ₃ BO ₃	0.003	กรัม
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0.002	กรัม
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.008	กรัม
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.0003	กรัม
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.00008	กรัม
CoCl ₂	0.00002	กรัม
Deionized water	1000	มิลลิลิตร

พีเอช 7.5

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอละลาย 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ สูตรอาหาร BGA+N เตรียมโดยการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร

2. สูตรอาหาร BG-11 Medium (Stainer et al. , 1971) สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีส่วนประกอบดังนี้

NaNO_3	1.500	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.040	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) , disodium magnesium salt	0.001	กรัม
Na_2CO_3	0.020	กรัม
Trace metal mix A ₅ (see below)	1.000	มิลลิลิตร
Deionized water	1000	มิลลิลิตร
	พีเอช 7.4	
Trace metal mix A ₅		
H_3BO_3	2.860	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.810	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.390	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.049	มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร Allen's Medium (Allen, 1952) สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีส่วนประกอบดังนี้

NaNO ₃	1.500	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.039	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.020	กรัม
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0.020	กรัม
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	0.058	กรัม
EDTA	0.001	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
FeCl ₃	0.002	กรัม
Microelement*	1.000	มิลลิลิตร
Deionized water	1000	มิลลิลิตร
Microelement*		
H ₃ BO ₃	2.860	มิลลิกรัมต่อลิตร
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1.810	มิลลิกรัมต่อลิตร
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222	มิลลิกรัมต่อลิตร
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.390	มิลลิกรัมต่อลิตร
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079	มิลลิกรัมต่อลิตร
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.049	มิลลิกรัมต่อลิตร

พีเอช 7.8

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สูตรอาหาร Potato Dextrose Agar สำหรับเลี้ยงเชื้อรา มีส่วนประกอบดังนี้

Potato	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Deionized water	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยนำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ สี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก ต้มต่อไปอีกสักครู่ นำมารองด้วยผ้าขาวบาง เอาเนื้อมันฝรั่งออกเติม dextrose 20 กรัม ต้มและคนจน dextrose ละลาย นำส่วนผสมนี้ผสมกับวุ้นที่ต้มจนละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร ผสมโดยคนและตั้งไฟให้เข้ากันเติมน้ำกลั่นแทนน้ำที่ขาดหายไปจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ขวดน้ำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราต่างๆ เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะราที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคแก่พืช (phytopathogenic fungi) และแบคทีเรีย (bacteria) บางชนิด

ภาคผนวก ข
น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

1. สารละลายนินไฮดริน

นินไฮดริน	0.2	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์	100	มิลลิลิตร

ละลายนินไฮดรินในเอทิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บไว้ในตู้เย็น สารละลายนินไฮดรินใช้สำหรับการตรวจหากรดอะมิโน

2. น้ำยาโมลิสซ์

สารละลายแอลฟาแอลฟาแนพทอล 5 เปอร์เซ็นต์ ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ต้องเตรียมในวันทดลอง)

3. สารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0

กรดแอสติกเข้มข้น	5.6	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
พีเอช 5.0		

(ปรับพีเอช โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทีละหยด เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร)

ภาคผนวก ค

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

1. กราฟมาตรฐานของ cycloheximide (standard curve of cycloheximide)

1.1 เตรียม cycloheximide มาตรฐาน standard cycloheximide ที่ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 7 10 15 20 30 และ 60 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ($\mu\text{g}/\text{disc}$) (Loo et. al., 1945)

1.2 แผ่นทดสอบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (BBL blank paper discs ของ Becton Dickinson)

1.3 สารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อ *M. phaseolina*

1.4 ทดสอบประสิทธิภาพของ cycloheximide มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างกันในการยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ตามวิธี paper-disc plate method

1.4.1 การหาความเจือจางของสารแขวนลอยเชื้อราที่เหมาะสม โดยปิเปตต์สารแขวนลอยของ *M. phaseolina* ในระดับความเจือจางต่างกัน ความเจือจางละ 1 มิลลิตร ลงบนอาหาร PDA จากนั้น swab เชื้อราให้ทั่วผิวน้ำอาหาร ทิ้งไว้ให้แห้ง ใช้ไมโครปิเปตต์ขนาดบรรจุ 20 ไมโครลิตร ปิเปตต์ cycloheximide มาตรฐานเข้มข้น 7 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นทดสอบ ทำ 2 ซ้ำ ใช้ปากกิปที่ฆ่าเชื้อแล้วก๊ิบเปเปอร์ดิสวางบนผิวน้ำอาหารในงานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยวัดผ่านเส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่นทดสอบเลือกความเจือจางของสารแขวนลอยเชื้อราที่ใช้ทดลอง แล้วให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญประมาณ 18 มิลลิเมตร สำหรับใช้หากราฟมาตรฐานของ cycloheximide แล้วนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อไป

1.4.2 วิธีหากราฟมาตรฐานของ cycloheximide โดยนำสารแขวนลอยของเชื้อ *M. phaseolina* ความเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 1.4.1 ภู (swab) บนจานอาหาร PDA ให้ทั่วผิวหน้าอาหารทิ้งไว้ให้แห้ง ใช้ไมโครปิเปตขนาดบรรจุ 20 ไมโครลิตร ปิเปต cycloheximide มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (ข้อ 1.1) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรลงบนแผ่นทดสอบ 22 แผ่น ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นทดสอบแต่ละความเข้มข้นของสาร ความเข้มข้นละ 2 แผ่น วางลงบนผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้จานเดียวกันแต่อยู่ตรงกันข้ามในแนวเส้นตรง และวางแผ่นทดสอบที่บรรจุสารความเข้มข้น 7 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร 2 แผ่น บนผิวอาหารในจานนั้นแบบตรงกันข้ามตามแนวเส้นตั้งฉากอีกแนวหนึ่ง แต่ละจานเพาะเชื้อจะวางแผ่นทดสอบได้ 4 แผ่นในตำแหน่งที่สมดุลกันและทุกๆจานเลี้ยงเชื้อจะมีแผ่นที่บรรจุสารความเข้มข้น 7 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยวัดผ่านเส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ

1.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อนำไปเขียนกราฟมาตรฐานของ cycloheximide จากข้อ 1.4.2 หาค่าเฉลี่ยของความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดจากการใช้ cycloheximide มาตรฐานเข้มข้น 7 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรจากการทดลองทั้งหมด ดูความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทั้งหมดกับค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละจานเพาะเชื้อ ถ้าค่าเฉลี่ยทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 1 ให้นำค่าที่ต่างกันไปหักออกจากค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากสารที่มีความเข้มข้นอีกระดับหนึ่งซึ่งทดสอบในจานเพาะเชื้อเดียวกัน ทำนองเดียวกันถ้าค่าเฉลี่ยทั้งหมดมีค่ามากกว่าก็นำค่าที่แตกต่างกันนั้นไปเพิ่ม นำค่าความกว้างของบริเวณการยับยั้งซึ่งเกิดจาก cycloheximide มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ปรับค่าแล้วไปเขียนกราฟ semi-logarithmic graph paper และใช้วิธีเขียนกราฟตาม method of least squares (Crowe and Crowe , 1969) ตามสูตรและจากตารางผนวก

$$\text{จาก} \quad Y = ab^x$$

$$\text{หรือ} \quad \log Y = \log a + x \log b$$

$$\sum_{i=1}^n \log Y_i = n (\log a) + (\log b) \sum_{i=1}^n X_i^2 \quad (1)$$

$$\sum_{i=1}^n X_i \log Y_i = (\log a) \sum_{i=1}^n X_i + (\log b) \sum_{i=1}^n X_i^2 \quad (2)$$

แทนค่าในสมการ (1) $11.2582 = 12 (\log a) + 201.75 (\log b)$ (1)

แทนค่าในสมการ (2) $259.2451 = 201.75 (\log a) + 4926.5625 (\log b)$ (2)

จากสมการ (1) และ (2) จะได้

$$\log a = 0.1717$$

$$\text{และ } \log b = 0.0455$$

จากความสัมพันธ์

$$\log y = \log a + x \log b$$

$$\log y = 0.1717 + 0.0455 x$$

$$\text{และ } x = \frac{\log y - 0.1717}{0.0455}$$

แทนค่า y ตามค่าในตารางผนวกจะได้ค่า x เป็นค่าใหม่ซึ่งเมื่อนำไปเขียนกราฟที่มีแกน Y เป็น log scale จะได้เส้นกราฟเป็นเส้นตรง ดังแสดงในภาพ

ภาคผนวก การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำหรับการเขียนกราฟมาตรฐานของ
cycloheximide ตาม method of least squares

ตารางที่ 16

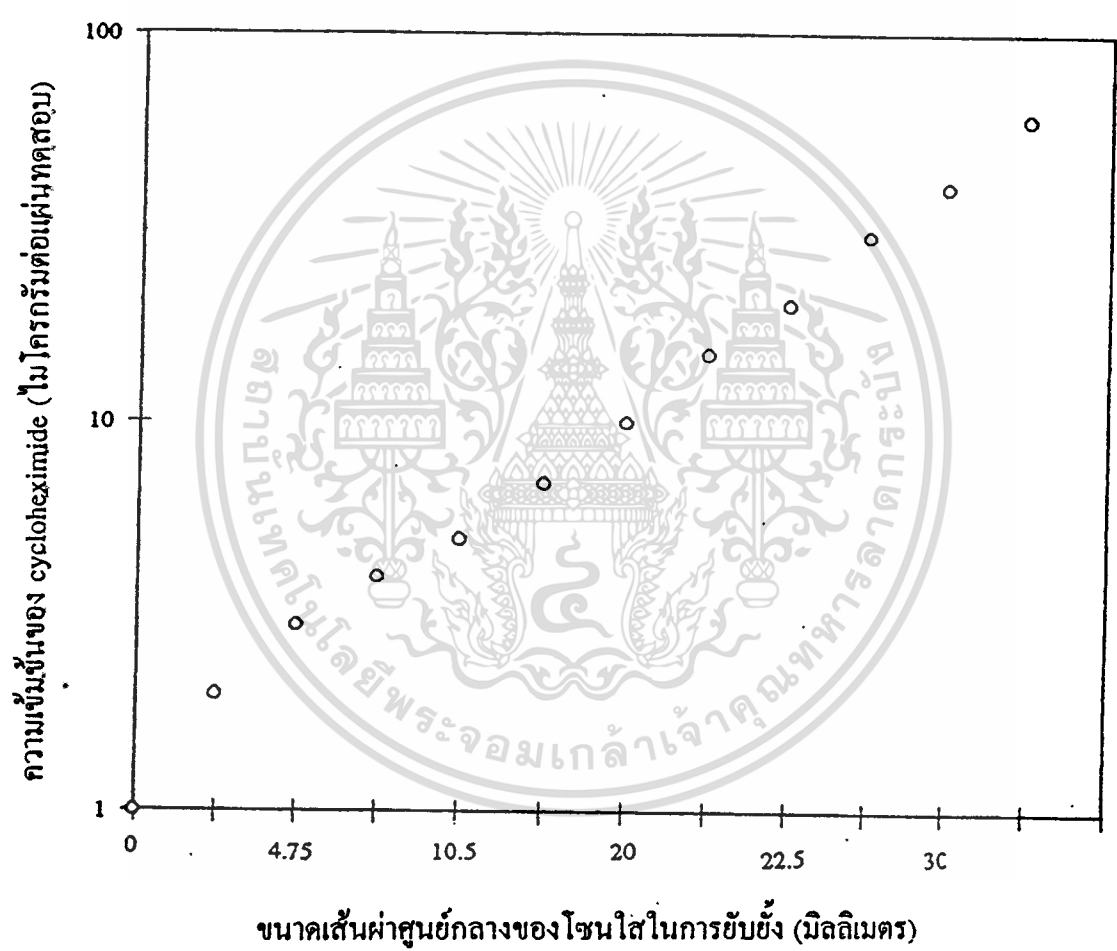
ลำดับข้อมูล	Yi	log Yi	Xi	X ² _i	Xi log Yi
1	1	0	0	0	0
2	2	0.3010	3.5	12.2500	1.0535
3	3	0.4771	4.75	22.5625	2.2662
4	4	0.6020	6.0	36.0000	3.6120
5	5	0.6989	10.5	110.2500	7.3384
6	7	0.8450	18.0	324.0000	15.2100
7	10	1.0000	20.0	400.0000	20.0000
8	15	1.1760	21.5	462.2500	25.2840
9	20	1.3010	22.5	506.2500	29.2725
10	30	1.4771	28.0	784.0000	41.3588
11	40	1.6020	30.0	900.0000	48.0600
12	60	1.7781	37.0	1369.0000	65.7897
		11.2582	201.75	4926.5625	259.2451

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำหรับการเขียนกราฟมาตรฐานของ
cycloheximide ตาม method of least squares

หมายเหตุ Y = ความเข้มข้นของ cycloheximide มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร)

X = ความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina*
(มิลลิเมตร)

ภาพที่ 27



แสดงกราฟมาตรฐานของสาร cycloheximide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพัชรี ผดุงวงศ์ เกิดวันที่ 1 กันยายน 2513 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาวិทยาสตวรรษบัณฑิต (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภาควิชาชีววิทยา 2536 และเข้าทำงานในตำแหน่ง Supervisor Q.C Lab บริษัท เอ็น แอนด์ เอ็น ฟู้ดส์ จำกัด ตั้งแต่ พ.ศ. 2536-2537



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้