

การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้น
(*Crotalaria medicaginea* Lam.) ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น
Preliminary of lipase production from endophyte
fungi from *Crotalaria medicaginea* Lam.



นริศรา สกุลหงษ์
บัญญัติ เลิศพฤกษ์สุกิจ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2565 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRELIMINARY OF LIPASE PRODUCTION FROM
ENDOPHYTE FUNGI FROM
Crotalaria medicaginea Lam.



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2022
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้น (<i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.) ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น Preliminary of lipase production from endophyte fungi from <i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนริศรา สกุลหงษ์ รหัสนักศึกษา 62050504	นายบัญญัติ เลิศพฤกษ์สุกิจ รหัสนักศึกษา 62050507
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2565	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์	

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	 

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้น (<i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.) ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนริศรา สกุลหงษ์	รหัสนักศึกษา 62050504
	นายบัญญัติ เลิศพฤกษ์สุกิจ	รหัสนักศึกษา 62050507
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2565	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์	

บทคัดย่อ

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) เบื้องต้นของเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นทั้งหมด 30 ไอโซเลท (Isolate) สามารถคาดการณ์สกุล (Genus) จากลักษณะสัณฐานวิทยาได้ 2 สกุล คือ *Aspergillus* (6 ไอโซเลท) และ *Fusarium* (2 ไอโซเลท) ส่วน 22 ไอโซเลทนั้นไม่สามารถคาดการณ์ได้ เนื่องจากมีเพียงลักษณะโคโลนี และไม่มีการพบสปอร์ (Spore) หรือโคนิเดีย (Conidia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นทุกไอโซเลทบนอาหาร Peptone agar + Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (PA + TW 20) พบว่ามีเชื้อรา 9 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยไอโซเลทที่มีค่าดัชนีเอนไซม์สูงสุด 2 ลำดับแรกคือ 21-215 (1.73 ± 0.05) และ 22-124 (1.73 ± 0.09) เทียบได้ว่ามีค่าดัชนีเอนไซม์อยู่ในเกณฑ์ของผู้ผลิตระดับทั่วไป (Moderate producer) คือ อยู่ในช่วง 1-2 และเมื่อทำการระบุสายพันธุ์ (Species) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification) บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS 5 และ ITS 4 พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นทั้งสองนั้นคาดการณ์ได้ว่าเป็น *Periconia* sp. และ *Xylaria* sp. ตามลำดับ จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้นั้น มีความหลากหลายในสายพันธุ์เชื้อรา และคาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อไปได้

คำสำคัญ : เอนไซม์ไลเปส เอนโดไฟต์ ผักแว่นต้น เชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Preliminary of lipase production from endophyte fungi from <i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.	
Students	Miss. Naritsara Sakunhong	Student ID 62050504
	Mr. Banyaphon Lertpruksukij	Student ID 62050507
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
School	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2565	
Advisor	Dr. Narumon Tangthirasunan	

Abstract

In this experiment, we did study in morphology, and predict genus of 30 endophytic fungi isolated from *Crotalaria medicaginea* Lam. As we can predict genus of fungi in 2 genera (8 isolates): *Aspergillus*, (6 isolates) *Fusarium*, (2 isolates) and unpredictable genus (22 isolates) because the feature studies only show colony and absent of spore or conidia under microscope. The study about lipase production of endophytic fungal from *C. medicaginea* Lam. on Peptone agar + 1% Tween 20 (PA + TW 20) shown that there are 9 isolates which can produce lipase. The 2 isolates with highest enzymatic index are isolate 21-215 (1.73 ± 0.05) and isolate 22-124 (1.73 ± 0.09) that in the group of moderate producer with enzymatic index in range between 1 to 2. The fungi with the highest enzymatic index was identified by DNA amplification in Internal transcribed spacer (ITS) by using ITS5 and ITS4 primers. The result shown that both endophytic fungi from *C. medicaginea* Lam. was *Periconia* sp. and *Xylaria* sp. respectively. This study shown that endophytic fungi from *C. medicaginea* Lam. have variation in genus and expect for the further applied in various industrial fields.

Keywords : Lipase, Endophyte, *Crotalaria medicaginea* Lam., Fungi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี เนื่องจากความกรุณาของ ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาเพื่อปรับปรุงแก้ไขปัญหาในการทำโครงการพิเศษ และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์จาก ผักแว่นต้น เพื่อนำมาใช้ในการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่าง แบคทีเรีย และยีสต์ เพื่อนำมาใช้ในการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ที่ให้คำปรึกษา เพื่อปรับปรุงแก้ไขปัญหาในการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา และพี่ ๆ นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความสะดวกในการเบิกใช้สารเคมี และอุปกรณ์เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณนางสาวนฤสรณ์ รัตนะ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งแนะนำการใช้อุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมีอย่างถูกต้อง

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้ที่คอยให้คำปรึกษา พร้อมทั้งเป็นกำลังใจในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นริศรา สกุลหงษ์
บุญญพนต์ เลิศพฤกษ์สุกิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ผักแว่นต้น (<i>Crotalaria medicaginae</i> Lam.).....	3
2.2 เชื้อรา (Fungi).....	3
2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	5
2.4 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา.....	8
2.5 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	9
2.6 การระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	15
3.1 ตัวอย่างเชื้อรา.....	15
3.2 อุปกรณ์.....	16
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	17
3.4 สารเคมี.....	17
3.5 การศึกษาการเจริญเติบโต และการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น	18
3.6 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตไลเปส	18
3.7 การระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	21
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโต และการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น	21
4.2 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตไลเปส.....	54
4.3 การระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่ผลิตไลเปส.....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสวงนไวสำหรับกรใชงวนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดเบลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งทมิกรนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	58
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	58
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	58
เอกสารอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก.....	66
ภาคผนวก ก.....	67
ภาคผนวก ข.....	70
ภาคผนวก ค.....	74



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 รหัสไอโซเลท (Isolate) และสายพันธุ์พืช/โฮสต์ (Host)	15
3.2 คู่มือที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR)	18
3.3 การเตรียมความเข้มข้นสารที่ใช้ในพีซีอาร์ (PCR)	20
3.4 สภาพที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)	20
4.1 สกุล (Genus) ที่คัดการณ และอัตราการเจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ของเชื้อราในวันที่ 4.....	21
4.2 ไอโซเลทเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหาร Peptone agar + Tween 20 ความเข้มข้น ร้อยละ 1 (PA + TW 20).....	55



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ผักแว่นต้น (Crotalaria medicaginea)	3
2.2 ไฟลัมของอาณาจักรฟังไจ ทั้ง 9 ไฟลัม.....	4
2.3 ลักษณะของโคโลนี (Colony).....	6
2.4 ลักษณะของเส้นใย (Hyphae).....	6
2.5 ฟรุติติงบอดี (Fruiting body)	7
2.6 ลักษณะของรูปร่าง (Shape) และพื้นผิว (Surface) ของสปอร์ หรือโคนิเดีย.....	8
2.7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Aspergillus niger</i>	8
2.8 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Fusarium proliferatum</i>	9
2.9 ขั้นตอนของเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)	14
2.10 ไพรเมอร์ในตำแหน่ง ITS (Internal transcribe spacer) บน rDNA.....	14
4.1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในวันที่ 4 ของเชื้อราเอนโดไฟต์.....	23
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 21-211.....	24
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 21-212.....	25
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 21-215.....	26
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 21-218.....	27
4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 21-219.....	28
4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 21-220.....	29
4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 21-221.....	30
4.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-108.....	31
4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-109.....	32
4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-110.....	33
4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-111.....	34
4.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-112.....	35
4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-113.....	36
4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-114.....	37
4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-115.....	38
4.17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-116.....	39
4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-117.....	40
4.19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-118.....	41
4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-119.....	42

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-120.....	43
4.22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-121.....	44
4.23 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-122.....	45
4.24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-123.....	46
4.25 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-124.....	47
4.26 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-125.....	48
4.27 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-126.....	49
4.28 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-127.....	50
4.29 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-128.....	51
4.30 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-129.....	52
4.31 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท 22-130.....	53
4.32 เปรียบเทียบการเกิดบริเวณการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร.....	54
4.33 ภาพอะกาโรสเจลของเชื้อราไอโซเลท 21-215 และ 22-124.....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันที่มีความเจริญก้าวหน้าทางสังคมส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของประชากรทำให้เกิดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อม หนึ่งในนั้นคือ มลพิษทางน้ำ ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของไขมัน และน้ำมันสูง เมื่อเข้าสู่ระบบบำบัดสามารถส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการบำบัดได้ โดยไขมัน และน้ำมันที่มีความหนาแน่นต่ำที่ลอยอยู่เหนือน้ำทำให้เกิดการขวางกั้นการแลกเปลี่ยนแก๊สออกซิเจนระหว่างน้ำ และอากาศ (กิจจา และ ปธานิน, 2555) และยังทำให้เกิดการอุดตันในระบบบำบัดได้ วิธีที่นิยมใช้ คือ การใช้บ่อดักไขมัน และนำไขมันได้ไปแปรรูปต่อไป แต่ยังมีไขมันบางส่วนที่ไม่สามารถนำไปแปรรูปได้ ซึ่งไขมันเหล่านี้จะถูกนำไปกำจัด ด้วยวิธีการฝังกลบ หรือการเผาทำลาย ที่อาจก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อมของดิน และอากาศได้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2561) การย่อยสลายไขมันโดยการใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ จากองค์ประกอบของไขมัน และน้ำมันที่เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ที่เป็นสารในกลุ่มเอสเทอร์ (Ester) ประกอบด้วยกรดไขมัน (Fatty acid) และกลีเซอรอล (Glycerol) (Ball และคณะ, 2023) เอนไซม์ไลเปสจึงเป็นเอนไซม์ที่เหมาะสม เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) แต่เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในทางการค้ามีข้อเสียในด้านค่าใช้จ่ายที่มีราคาแพง (Rodrigues และคณะ, 2016) โดยเอนไซม์ไลเปสพบได้ในหลายสายพันธุ์ของสัตว์ พืช รวมทั้งจากจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ไม่ว่าเป็นแบคทีเรีย และเชื้อรา นั้นจัดเป็นแหล่งที่มีศักยภาพ หรือมีประสิทธิภาพมากที่สุดของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Messaoudi และคณะ, 2010) รวมทั้งการเพาะเลี้ยงง่าย และการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นมีระยะเวลาในการผลิตที่สั้น ผลิตได้ง่ายและมาก ง่ายต่อการจัดการทางพันธุกรรม การปรับขนาดในการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ ความจำเพาะ และความเสถียร ส่วนการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราเส้นใย (Filamentous fungi) นั้นจัดเป็นแหล่งที่นิยมเนื่องจากในกระบวนการหมัก เพราะสามารถสกัดเอนไซม์ออกมาได้ง่าย ปลอดภัย เนื่องจากมีการผลิตออกมาภายนอกเซลล์ และอาจมีการประยุกต์ใช้ทั้งเซลล์ได้ รวมทั้งกลุ่มราเส้นใยได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นระบบชีวภาพที่สะดวกที่สุดสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่แข็งแรง เช่น *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus niger* และ *Mucor circinelloides* ที่ได้รับการศึกษาในฐานะตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพโดยใช้ทั้งเซลล์ (Rodrigues และคณะ, 2016; Triyaswati และ Ilmi, 2020) เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั้งในดิน (Ayinla และคณะ, 2017) น้ำทะเล (Sadati และคณะ, 2015) รวมทั้งเชื้อราในกลุ่มเอ็นโดไฟต์ (Endophyte) ซึ่งส่วนใหญ่จัดเป็นกลุ่มราเส้นใยที่สามารถแยกได้จากในพืช เช่น การคัดแยกเชื้อราในกลุ่มเอ็นโดไฟต์จากต้นมะตาด (*Dillenia indica*) (Kumar และ Prasher 2022) ต้นมะแว้ง (*Solanum procumbens*) (Manasa และคณะ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะในรูปแบบใด ๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากมีเหตุพิเศษขออนุญาต และต้องขออนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งก่อนนำไปใช้

2021) ต้นกระดังงา (*Cananga odorata*) (Toghueo และคณะ, 2017) และต้นพรหมมิ (*Bacopa monnieri*) (Katoch และคณะ, 2014) เป็นต้น และพบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ไลเปส

ในงานวิจัยนี้สนใจเกี่ยวกับเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยผักแว่นต้นได้มาจากโครงการ "สำรวจความหลากหลายเบื้องต้นของพันธุ์พืช และเชื้อราในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อำเภอต่างข้างจังหวัดสุพรรณบุรี" โดยธนารักษ์ และคณะ (2022) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรรวมอยู่ในตระกูลถั่ว (Leguminosae หรือ Fabaceae) ที่พบเป็นจำนวนมากในอันดับต้น ๆ ของการศึกษา และยังไม่มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส รวมทั้งการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษา เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพาะเลี้ยง และคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

1.2.2 เพื่อระบุสายพันธุ์เชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ที่คัดเลือกได้ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ จากผักแว่นต้นที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ พร้อมทั้งคัดเลือกหาเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และระบุสายพันธุ์เชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ Polymerase chain reaction; PCR) ด้วยคู่ไพรเมอร์ (Primer) ITS5 และ ITS4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือก และระบุสายพันธุ์เชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดไขมันจากน้ำเสียในอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

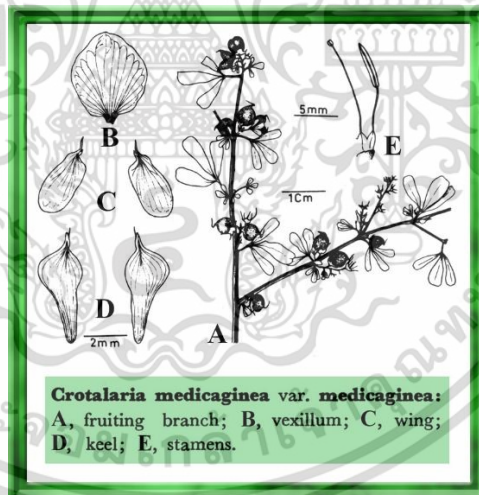
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผักแว่นตัน (*Crotalaria medicaginea* Lam.)

จากฐานข้อมูลของกลุ่มงานพฤกษศาสตร์ป่าไม้ (2018) เป็นพืชล้มลุกที่อยู่ในตระกูลถั่ว (Leguminosae หรือ Fabaceae) ตระกูลย่อย (Papilionoideae) มีความสูงประมาณ 15-50 เซนติเมตร ลำต้นตั้งตรง ใบมีรูปไข่กลับ ขนสีน้ำตาลใต้ใบ ขอบใบเรียบ และมีกลีบดอกสีเหลือง ผักแว่นตันมีสรรพคุณด้านสมุนไพรแก้อาการปวดเมื่อย เม้าค่าง บำรุงกำลัง (รูปที่ 2.1)

และจากโครงการ "สำรวจความหลากหลายเบื้องต้นของพันธุ์พืช และเชื้อราในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี" โดยธนารักษ์ และคณะ (2022) ที่พบว่าผักแว่นตันเป็นหนึ่งในพืชที่น่าสนใจในโครงการนี้ เนื่องจากพบว่าชุมชนได้มีการนำพืชชนิดนี้มาใช้เป็นสมุนไพรบำรุงกำลัง และแก้ปวดเมื่อย และยังเป็นหนึ่งในพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) ที่พบมากที่สุดในพื้นที่ แต่ยังไม่มีการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นตันที่สามารถผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ รวมทั้งเอนไซม์ไลเปส



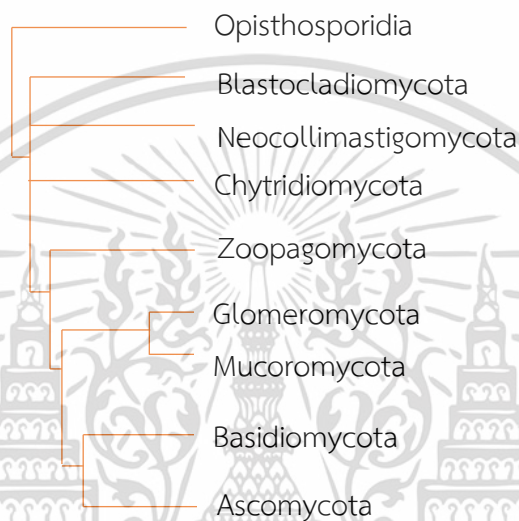
รูปที่ 2.1 ผักแว่นตัน (*Crotalaria medicaginea*)

(ที่มา: http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=53904&flora_id=5)

2.2 เชื้อรา (Fungi)

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการกระจายอย่างกว้างขวางมากที่สุดในโลก เป็นผู้ที่มีบทบาทในชีวธรณีเคมี (Biogeochemistry) อย่างมากในการหมุนเวียนคาร์บอน การตรึงไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และองค์ประกอบทางชีวภาพอื่น ๆ รวมทั้งเชื้อรานั้นมีการอาศัยอยู่ร่วมกัน และส่งเสริมพืชในรูปของเอนโดไฟต์ (Endophyte) และไมคอร์ไรซา (Mycorrhizae) เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต

(Eukaryote) ซึ่งมีออร์แกเนลล์ที่มีผนังหุ้ม และมีนิวเคลียส สามารถแบ่งได้เป็น 9 ไฟลัม (Phylum) (รูปที่ 2.2) ได้แก่ โอปิธสปอริเดีย (Opisthosporida) ไคทริดีโอไมโคตา (Chytridiomycota) นีโอคอลลิมาสติโกไมโคตา (Neocollimastigomycota) บลาสโตคลาติโอไมโคตา (Blastocladiomycota) ซูปาโกไมโคตา (Zoopagomycota) โกลเมโรโรไมโคตา (Glomeromycota) มิวโครโรไมโคตา (Mucoromycota) และเบสิดีโอไมโคตา (Basidiomycota) แอสโคไมโคตา (Ascomycota) (Naranjo-Ortiz และ Gabaldón, 2019)



รูปที่ 2.2 ไฟลัมของอาณาจักรฟังไจ ทั้ง 9 ไฟลัม
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Naranjo-Ortiz และ Gabaldón, 2019)

เชื้อราเอนโดไฟต์ อยู่บริเวณระหว่าง หรือภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อพืช และไม่ก่อโรคในพืช จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้นอกจากนี้ ยังปกป้องพืชที่เป็นโฮสต์จากแบคทีเรีย เชื้อราก่อโรค และช่วยการเจริญเติบโต และต้านความเครียดของพืชจากการผลิตสารเมทาบอลิท์ และเอนไซม์ เชื้อราเอนโดไฟต์เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี รวมทั้งเชื้อราเอนโดไฟต์สามารถผลิตเอนไซม์ไลติกที่หลากหลาย เช่น เซลลูเลส เพคติเนส อะไมเลส ฟอสฟาเทส ไซแลนเนส โปรตีเอส และไลเปส ซึ่งช่วยให้เชื้อราเอนโดไฟต์ยับยั้งการทำงานของเชื้อก่อโรคในพืชได้ และเอนไซม์เหล่านี้มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การแปรรูปอาหาร การผลิตผงซักฟอก การบำบัดเส้นใยพืชสำหรับสิ่งทอ การผลิตพลังงาน และเชื้อเพลิงชีวภาพ (Bhadra และคณะ, 2022; Bogas และคณะ, 2022)

จากงานวิจัยของ Bezerra และคณะ (2015) ที่ได้ทดลองคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จาก *Bauhinia forficata* ซึ่งเป็นพืชในตระกูลถั่วซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับผักแว่นต้น พบว่าสามารถแยกได้ถึง 28 สายพันธุ์ (Species) คือ *Acremonium curvulum*, *Ascotricha chartarum*, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *Cochliobolus australiensis*, *C. lunatus*, *Cladosporium oxysporum*,
เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากไม่มีเหตุแต่สงสัยและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีใบใช้

C. sphaerospermum, *Diplococcium spicatum*, *Gibberella baccata*, *G. fujikuroi*, *Khuskia oryzae*, *Lasmenia balansae*, *Myrmecridium schulzeri*, *Myrothecium verrucaria*, *Nodulisporium Preuss*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. glabrum*, *P. implicatum*, *Phoma putaminum*, *Phomopsis diachenii*, *Pithomyces atro-olivaceus*, *Spegazzinia tessartha*, *Talaromyces funiculosus* และ *Trichoderma piluliferum* พร้อมทั้งนำมาตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และเอนไซม์โปรตีเอส เซลลูเลส ไซแลนเนส และไลเปส

2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เนื่องจากเชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีรูปร่าง และโครงสร้างที่หลากหลาย และมีลักษณะเฉพาะ ดังนั้นการระบุสายพันธุ์เชื้อราจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถสังเกตได้จากลักษณะ ดังต่อไปนี้

2.3.1 ลักษณะของโคโลนี (Colony)

2.3.1.1 ลักษณะรูปร่างของโคโลนี (Whole colony) แบ่งออกเป็น 5 แบบ ได้แก่ รูปร่างเป็นจุดเล็กวงกลม (Punctiform) รูปร่างเป็นวงกลม (Circular) รูปร่างคล้ายราก (Rhizoid) รูปร่างไม่แน่นอน (Irregular) และรูปร่างคล้ายเส้นใย (Filamentous)

2.3.1.2 ลักษณะของขอบโคโลนี (Colony edge) แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ ขอบเรียบ (Entire) ขอบแบบหยักเป็นคลื่น (Undulate) ขอบแบบหยักเป็นแฉก (Lobate) ขอบแบบเป็นเส้นใย (Filamentous) ขอบแบบหยักขนาบกัน (Curled)

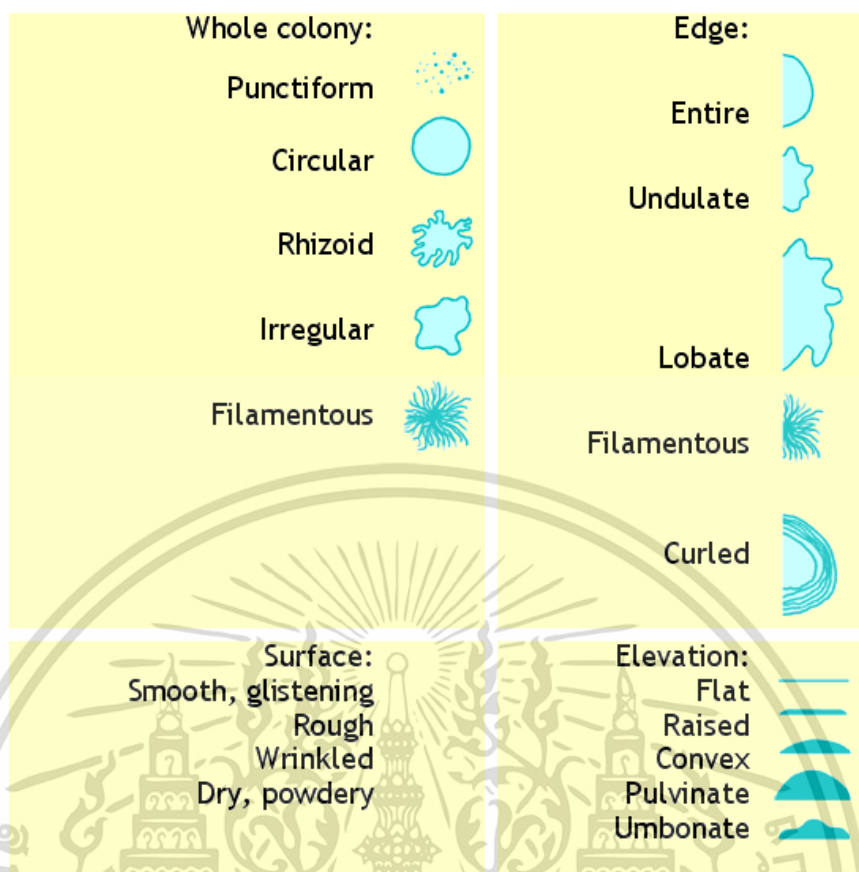
2.3.1.3 ลักษณะของผิวหน้าโคโลนี (Colony surface) แบ่งออกเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ ผิวหน้าแบบเรียบเป็นมันวาว (Smooth, Glistening) ผิวหน้าแบบขรุขระ (Rough) ผิวหน้าแบบย่น (Wrinkle) และผิวหน้าแบบแห้งเป็นผง (Dry, Powdery)

2.3.1.4 ลักษณะของการยกตัว (Colony elevation) แบ่งออกเป็น 4 แบบ ได้แก่ แบบแบนราบ (Flat) แบบยกตัวขึ้นจากผิวหน้าอาหาร (Raise) แบบโค้งนูนขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย (Convex) แบบโค้งนูนขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารมาก (Pulvinate) และแบบโค้งนูนจากผิวหน้าอาหารและมีปุ่มตรงกลาง (Umbonate) (รูปที่ 2.3)

2.3.2 ลักษณะของเส้นใย (Hyphae)

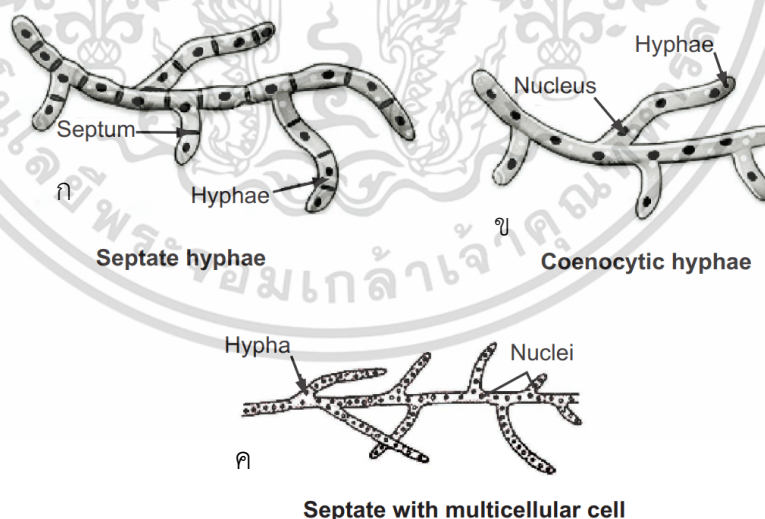
เส้นใยของเชื้อรา แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ แบบไม่มีผนังกัน (Non-septate หรือ Coenocytic hyphae) มีลักษณะเป็นท่อภายในเส้นใยมีไซโทพลาซึม และนิวเคลียสอยู่ แบบมีผนังกันเซลล์เดียว (Septate hyphae) แบบมีผนังกันหลายเซลล์ (Septate with multicellular cell) ที่มีหลายนิวเคลียส (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ลักษณะของโคโลนี (Colony)

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Seeley, HW และ Vandemark, PJ (1962))



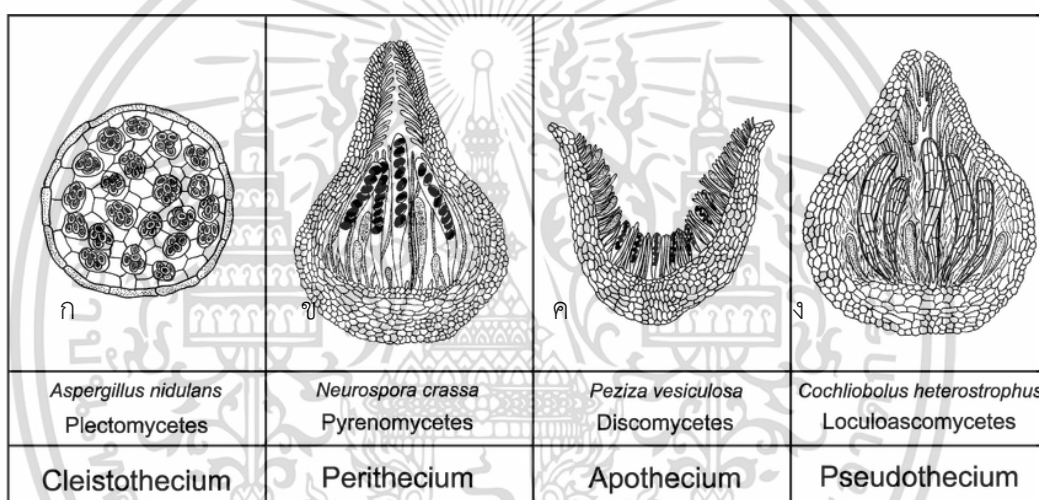
รูปที่ 2.4 ลักษณะของเส้นใย (ก) แบบมีผนังกั้นเซลล์เดียว (Septate hyphae) (ข) แบบไม่มีผนังกั้น (Non-septate hyphae) (ค) แบบมีผนังกั้นหลายเซลล์ (Septate with multicellular hyphae)

เอกสารนี้ (ที่มา: <https://solutionpharmacy.in/fungi>) ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 ลักษณะของฟรุติงบอดี (Fruiting body) หรือแอสโคคาร์ป (Ascocarp)

ฟรุติงบอดี หรือแอสโคคาร์ปสามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ คลีสโตทีเซียม (Cleistothecium) เพอริทีเซียม (Perithecium) อะพอทีเซียม (Apothecium) และ ซูโดทีเซียม (Pseudothecium) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตแอสคัส (Ascus) และทำหน้าที่เป็นฐานสำหรับติดตัวของสปอร์

คลีสโตทีเซียม คือ ฟรุติงบอดีที่ปิดสนิท เพอริทีเซียม คือ ฟรุติงบอดีที่มีทรงกลม หรือรูปร่างคล้ายฟลาสก์ (Flask) ที่ปิดเล็กน้อย อะพอทีเซียมมีรูปร่างคล้ายถ้วยหรือจานบิน ที่มีไฮมีเนียม (Hymenium) เปิดออกสู่ภายนอกเมื่อเจริญเต็มที่ และซูโดทีเซียมมีรูปร่างใกล้เคียงกับเพอริทีเซียม แต่อวัยวะสืบพันธุ์ (Sexual organ) ของเชื้อราที่สร้างซูโดทีเซียมจะสร้างจากเส้นใยภายในแอสโคคาร์ปที่กำลังเจริญ (รูปที่ 2.5)

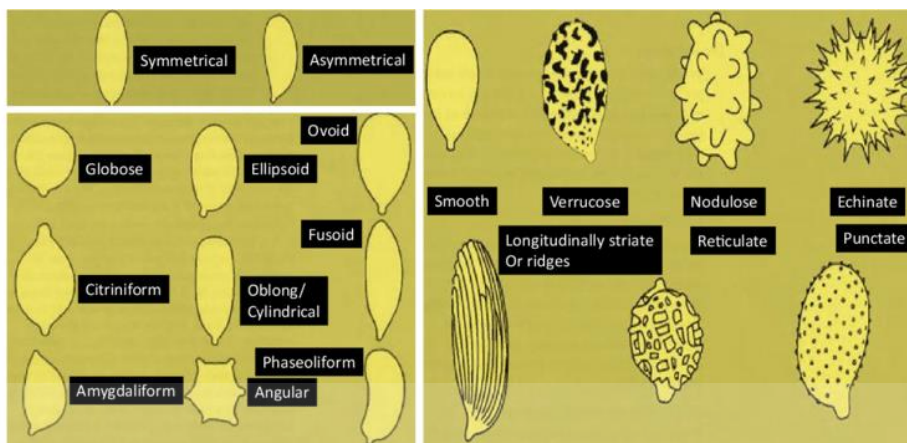


รูปที่ 2.5 ฟรุติงบอดี (Fruiting body) ทั้ง 4 ประเภท (ก) คลีสโตทีเซียม (Cleistothecium) (ข) เพอริทีเซียม (Perithecium) (ค) อะพอทีเซียม (Apothecium) (ง) ซูโดทีเซียม (Pseudothecium) (ที่มา: Pöggeler และคณะ, 2006)

2.3.4 ลักษณะของสปอร์ (Spore) และโคนิเดีย (Conidia)

สปอร์เป็นลักษณะหลักที่ใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา ลักษณะรูปร่าง (Shape) และพื้นผิว (Surface) (รูปที่ 2.6) ของสปอร์สามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราได้ ตัวอย่างของรูปร่างสปอร์ เช่น ความสมมาตรของสปอร์ (Symmetrical) ทรงกลม (Globose) ทรงรี (Elipsoid) รูปไข่ (Ovoid) รูปเหลี่ยม (Angular) ตัวอย่างของลักษณะพื้นผิวของสปอร์ เช่น พื้นผิวเรียบ (Smooth) พื้นผิวเป็นหนาม (Echinate) พื้นผิวมีเป็นตุ่ม (Verrucose) (รูปที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

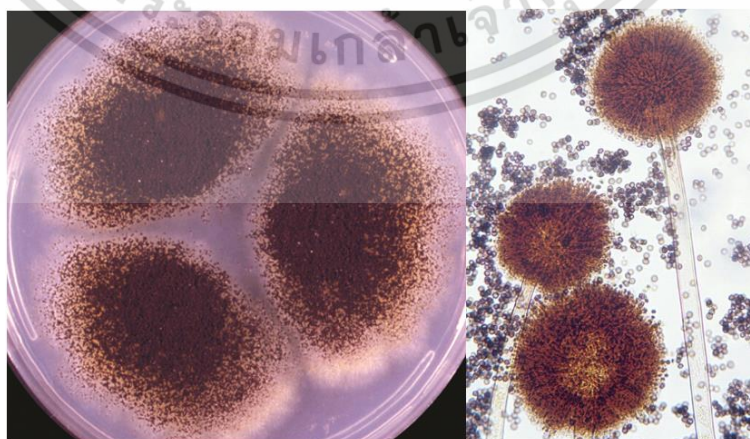


รูปที่ 2.6 ลักษณะของรูปร่าง (Shape) และพื้นผิว (Surface) ของสปอร์หรือโคนิเดีย
(ที่มา: Huey และคณะ, 2020)

2.4 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา

2.4.1 เชื้อราสกุล *Aspergillus niger*

เชื้อราสกุล *Aspergillus* เป็นสกุลที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ ซึ่งเจริญเติบโตได้ทั่วไป รวมทั้งมีบทบาทในด้วยเทคโนโลยีชีวภาพในด้านการผลิตสารเมตาบอไลต์ (Metabolite) เช่น ยาปฏิชีวนะ กรดอินทรีย์ ยาหรือเอนไซม์ หรือตัวทำปฏิกิริยาในอาหารหมักดอง (Samson และคณะ 2014) เชื้อราสกุล *Aspergillus* สามารถพบได้ทั้งในรูปของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) และแบบอาศัยเพศ (Sexual reproduction) การจัดอนุกรมวิธานนั้นจัดเชื้อราสกุล *Aspergillus* อยู่ในไฟลัม Ascomycota ซึ่งมีเส้นใยที่แตกแขนง และมีผนังกัน มีก้านชูสปอร์ (Conidiophore) ที่อาจมีหรือไม่มีผนังกันก็ได้ ซึ่งมีงานวิจัยของ Bezerra และคณะ (2015) Manasa และคณะ (2021) และ Srinivas และคณะ (2013) มีรายงานว่าพบเชื้อราสกุล *Aspergillus* เป็นเชื้อราเอนโดไฟต์

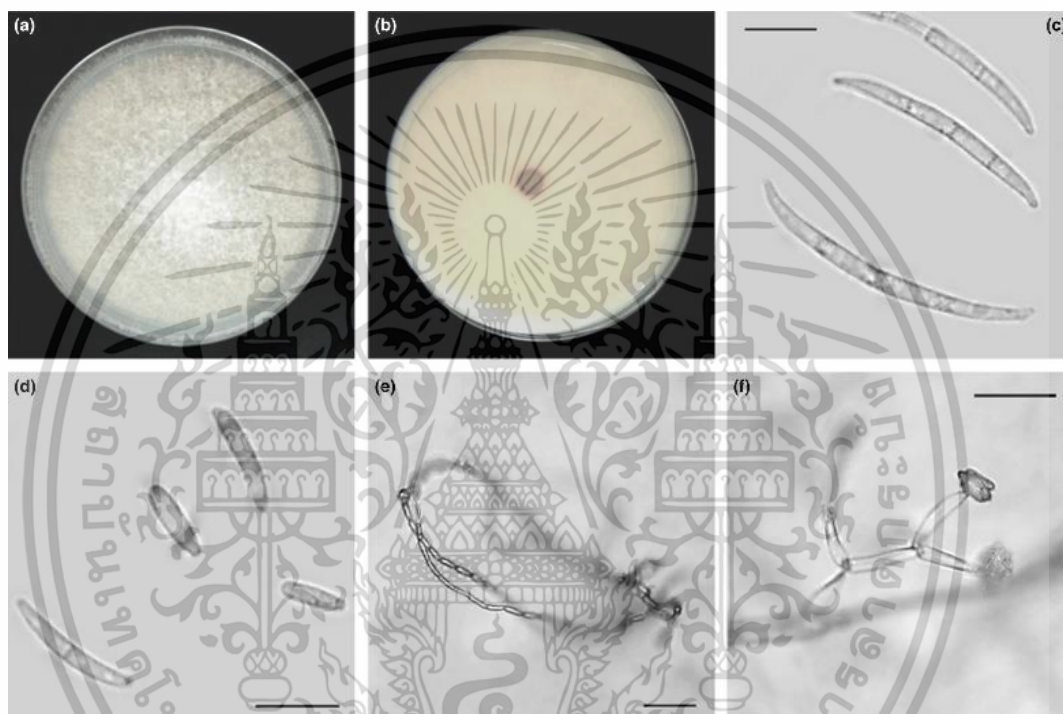


รูปที่ 2.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Aspergillus niger*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
(ที่มา: <https://www.adelaide.edu.au/mycology>)
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุที่บ่งชี้ถึง และต้องยังต้องแจ้งเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 เชื้อราสกุล *Fusarium proliferatum*

เชื้อราสกุล *Fusarium* เป็นเชื้อราที่อาศัยในดิน พบได้ทั่วไปเป็นสาเหตุของโรคพืชที่ทำให้เกิดการทำลายท่อลำเลียงของพืช ทำให้เกิดโรคเน่าในหัว เหง้า และรากพืช เชื้อราในสกุลนี้มีเส้นใยไม่มีสี มีผนังกันเส้นใย และแตกกิ่งเป็นมุมแหลม เช่นเดียวกับเชื้อราสกุล *Aspergillus* แต่จากงานวิจัยของ Katoch และคณะ (2014) และ Toghueo และคณะ (2017) ได้รายงานว่าพบเชื้อราในสกุล *Fusarium* เป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ จากต้นพรหมมิ (*Bacopa monnieri*) หูกระจง (*Terminata ivorensis*) หูกวาง (*Terminalia catappa*) และกระดังงา (*Cananga odorata*) เช่นกัน



รูปที่ 2.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium proliferatum*
(ที่มา: Kee และคณะ, 2020)

2.5 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Lipase) หรือไตรกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (Triglycerol acylhydrolase) (E.C. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส ที่มีส่วนในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะคาร์บอกซิลิกเอสเทอร์ (Carboxylic ester bond) ของไตร-, ได-, และโมนอกลิเซอไรด์ (Tri-, di-, monoglyceride) ได้เป็นกลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) โดยไม่จำเป็นต้องมีโคแฟกเตอร์ (Chandra และคณะ, 2020; Singh และ Mukhopadhyay, 2012) และปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2 ประเภท ได้แก่ ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) ที่สร้างพันธะโคเวเลนต์ระหว่างกรดไขมัน

และแอลกอฮอล์ได้สารผลิตภัณฑ์ คือ เอสเทอร์ และน้ำ และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ขึ้นกับ
เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ชนิดของซัสเตรท ได้แก่ ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ลิซิส เอซิดไลซิส อะมิโนไลซิส และอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มากราณาไปใช้

(Gopinath และคณะ, 2013; Walker และ Sandoval, 2012) โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความครอบคลุมขอบเขตของซีสเตรมากกว่าเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase) ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยจะมีความจำเพาะกับซีสเตรที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (Insoluble) และละลายได้เล็กน้อย (Emulsion) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับพื้นที่ของซีสเตร แต่ไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของซีสเตร (Fojan และคณะ 2000)

เอนไซม์ไลเปสมีการใช้งานทั้งในอุตสาหกรรมเภสัชกรรม, ไบโอดีเซล, ผงซักฟอก และน้ำยาขจัดคราบไขมัน และใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (Chandra และคณะ 2020) เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตในทุกอาณาจักร (Fojan และคณะ 2000) สำหรับเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมักพบในสิ่งแวดล้อม ทั้งจากน้ำทะเล (Sadati และคณะ 2015) ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน (Ayinla และคณะ 2017) และคราบน้ำมันดิบ (Mohammed Al Fayaad, Husein, และ Khudhair 2020) ของเสียจากโรงงานผลิตครีมเทียม (Triyaswati และ Ilmi, 2020) และโรงงานน้ำมันปาล์ม ของเสียจากน้ำมันพืช อุตสาหกรรมนม ัญพืช และอาหารที่เน่าเสีย (Singh และ Mukhopadhyay, 2012)

2.5.1 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Gel diffusion assay โดยใช้ซีสเตรที่เป็นไขมันผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การคัดเลือกเชื้อราด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่าย และช่วยป้องกันการถูกยับยั้งจากอินดิเคเตอร์ที่ใช้สำหรับการทดสอบ (Lanka และ Latha, 2015; Zanotto และคณะ, 2009) การทดสอบด้วยวิธีนี้จะอาศัยการเกิดโซนใส หรือการเกิดตะกอนบริเวณโดยรอบโคโลนี

การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมไตรบิวทีริน ซึ่งเป็นซีสเตรที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (Geoffry และ Achur, 2017) เมื่อไตรบิวทีรินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสแล้วจะเกิดผลิตภัณฑ์ คือ ไตรบิวทีริน มอนอบิวทีริน กลีเซอรอล และกรดบิวทีริก ที่สามารถละลายน้ำได้ทำให้เกิดเป็นบริเวณที่มีความใส (Zanotto และคณะ 2009) การใช้ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีนี้ยังไม่สามารถยืนยันผลได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเอนไซม์ไลเปสจริง จึงต้องทำร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเป็นซีสเตรร่วมกับการใช้โรดามีนบีเป็นอินดิเคเตอร์ (Geoffry และ Achur, 2017; Lanka และ Latha, 2015)

การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้อาหารที่มีส่วนผสมของ Tween 20 และ Tween 80 ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของสารกลุ่มพอลิซอร์บิแทน (Polysorbitan) ที่สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีขั้วที่ประกอบด้วยเอสเทอร์ของกรดไขมันของพอลิเอทอกซีซอร์บิแทน (Polyethoxy sorbitan) จากการที่ Tween 20 มีส่วนประกอบหลักเป็นพอลิซอร์บิแทนมอนอลอเรต (Polysorbitan monolaurate) ซึ่งเป็นเอสเทอร์ของกรดลอริก (Ramnath และคณะ 2017) และ Tween 80 มีส่วนประกอบหลัก คือ เอสเทอร์ของกรดโอเลอิก (Oleic acid) (Ayorinde และคณะ 2000) การคัดเลือกด้วยวิธีนี้จะอาศัยการสังเกตตะกอนที่อยู่บริเวณรอบโคโลนีที่เกิดจากการย่อยของสารประกอบ Tween ของเอนไซม์ไลเปส ทำให้ได้กรดไขมันอิสระที่มาจับตัวกับไอออนของแคลเซียม

ที่เกิดจากแคลเซียมของแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นตะกอนสีขาวที่ไม่ละลายน้ำ (Lanka และ Latha, 2015; Ramnath และคณะ, 2017) โดยจากงานวิจัยของ Srinivas และคณะ (2013) ที่ได้ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพร 4 สายพันธุ์ และ Ungcharoenwivat และ Sakayaroj ในปี (2022) จากป่าชายเลน โดยใช้อาหารเปปโทนที่มีส่วนประกอบของ Tween 20 เข้มข้นร้อยละ 1 พบว่ามีการเกิดบริเวณของตะกอนสีขาวโดยรอบโคโลนีของเชื้อรา

2.5.2 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Gel diffusion assay โดยใช้สีของอินดิเคเตอร์เป็นตัวบ่งชี้

การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Gel-diffusion assay โดยใช้สีของอินดิเคเตอร์เป็นตัวบ่งชี้ นั้นมีอินดิเคเตอร์ที่นิยมใช้ 2 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ ฟีนอลเรด (Phenol red) และโรดามีนบี (Rhodamine B) โดยการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยอินดิเคเตอร์ฟีนอลเรด นั้นใช้อาหารที่มีฟีนอลเรดเป็นองค์ประกอบ (Triyaswati และ Ilmi, 2020) โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ ในช่วงระหว่าง 6.8 ที่มีสีเหลือง และ 8.2 ที่มีสีชมพู (PubChem, 2023) โดยกรดไขมันอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารลดลง ทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง (Lanka และ Latha, 2015; Triyaswati และ Ilmi, 2020) ข้อได้เปรียบของการคัดเลือกด้วยวิธีนี้ คือ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเอนไซม์ไลเปส และเอสเทอร์เอสได้ เมื่อใช้ซับสเตรทเป็นน้ำมัน และไตรบิวทีริน (Tributylin) โดยเอนไซม์เอสเทอร์เอสให้ผลบวกในอาหารที่ใช้ไตรบิวทีรินเป็นซับสเตรทเท่านั้น แต่เอนไซม์ไลเปสให้ผลบวกทั้งอาหารในที่ใช้ไตรบิวทีริน และน้ำมันเป็นซับสเตรท (Lanka และ Latha 2015)

การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยอินดิเคเตอร์โรดามีนบี (Rhodamine B) ถูกใช้ในการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นครั้งแรกโดย Kouker และ Jaeger (1987) นิยมใช้น้ำมันเป็นซับสเตรท จากงานวิจัยของ El Aamri และคณะ 2020 ที่ใช้อาหารแข็งโรดามีนบี ในหลุมขนาด 6 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ก่อนที่จะนำไปวางไว้ใต้แสงยูวี (UV) (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) เกิดเป็นบริเวณสีส้มใสเรืองแสง และจากงานวิจัยของ Peraza-Jiménez และคณะ (2022) Narasimhan และ Valentin (2015) และ Geoffry และ Achur (2017) ที่ใช้ซับสเตรทเป็นน้ำมันมะกอก และงานวิจัยของ Ungcharoenwivat และ Sakayaroj (2022) ที่ใช้น้ำมันปาล์มในจานเพาะเลี้ยงซึ่งได้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน โดยเกิดเป็นสีส้มใสที่เรืองแสงภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ซึ่งสีส้มนี้เกิดจากการสร้างพันธะระหว่างโรดามีนบีกับกรดไขมันอิสระที่เป็นผลผลิตจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เรืองแสงสีส้ม (El Aamri และคณะ 2020) การคัดเลือกเชื้อราด้วยโรดามีนบีจะไม่มีผลที่ยับยั้งการเจริญเติบโต และไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของจุลินทรีย์ (Lanka และ Latha, 2015) โดยการคัดเลือกเชื้อรา

ด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผสมโรตารีนบีสามารถใช้ควบคู่ กับการคัดเลือกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ไตรบิวทีริน เพื่อยืนยันผลจากการคัดเลือกด้วยไตรบิวทีริน (Geoffry และ Achur, 2017; Lanka และ Latha, 2015)

2.6 การระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต (Eukaryotic organism) ที่พบในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย และเป็นส่วนหนึ่งของระบบนิเวศ เช่น เป็นผู้ย่อยสลาย ภาวะพึ่งพาอาศัย ภาวะอิงอาศัย และเป็นเชื้อก่อโรค ประกอบด้วยวงจรชีวิตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย และพบเชื้อราเจริญเติบโตได้ในซับสเตรท (Substrate) ที่หลากหลาย เช่น ดิน น้ำ และเนื้อเยื่อพืช แม้ว่าเชื้อราเหล่านี้ส่วนมากจะเจริญโดยที่ไม่มีการผลิตสปอร์สำหรับสืบพันธุ์ หรือลักษณะที่จำแนกได้ชัดเจนเมื่อทำการเพาะเลี้ยง (Wingfield และ Atcharawiriyakul 2021) ปัญหาจากการเกิดไฮบริดไดเซชัน (Hybridization) สายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายกัน (Cryptic speciation) และการวิวัฒนาการแบบเบนเข้า (Convergent evolution) การสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศของเชื้อราที่ส่วนใหญ่นั้นมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันซึ่งทำให้เกิดความสับสนได้ นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในการจัดจำแนกที่ไม่สามารถจัดจำแนกในสายพันธุ์ได้ (Raja และคณะ 2017) ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ควบคู่ไปกับลักษณะสัณฐานวิทยา เพื่อใช้ในการระบุสายพันธุ์

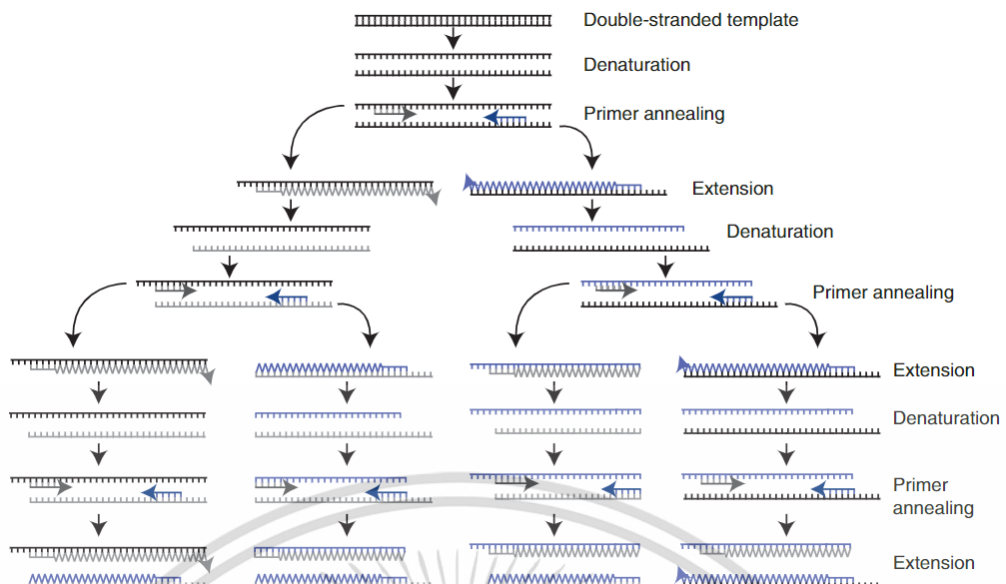
ในการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อราโดยทั่วไปแล้วประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราแตก และการสกัดและทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (ปิยวรรณ และคณะ, 2557; Wingfield และ Atcharawiriyakul, 2021) การทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราแตกสามารถทำได้โดยการนำเส้นใยของเชื้อรา หรือสปอร์ของเชื้อรามาแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการสกัด และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งวิธีที่นิยมใช้กัน คือ การสกัดด้วยบัฟเฟอร์ซีทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (Cetyl trimethyl bromide, CTAB) (Doyle และ Doyle, 1987) และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (Chloroform) : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamyl) (24 : 1) และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการทำให้ตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล (Isopropanol) หรือเอทานอล (Ethanol) นำมาละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE buffer) และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction (PCR)) ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) และการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) (รูปที่ 2.9) โดยในขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกันเป็นการใช้ความร้อนสลายพันธะระหว่างเบสคู่สม ที่อุณหภูมิประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที โดยมีการให้ความร้อนก่อนเริ่มปฏิกิริยารอบแรก (Initial denaturation) เพื่อให้มีการคลายเกลียวอย่างสมบูรณ์ก่อน 5 นาที ขั้นตอนต่อมาคือ การจับของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) เกิด

การจับกันระหว่างไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ ที่อุณหภูมิประมาณ 50-58 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที ถึง 2 นาที และขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ เอนไซม์ดีเอ็นเอ-พอลิเมอเรส (DNA polymerase) ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 60-90 วินาที โดยกระบวนการทั้ง 3 ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นซ้ำประมาณ 30 รอบ ได้ดีเอ็นเอต้นฉบับประมาณ 10^5 ซ้ำ (Green และ Sambrook 2019; Maheaswari, Kshirsagar, และ Lavanya 2016) และยังคงที่ในอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ขั้นตอนนี้อีก 5-10 นาที (Kadri 2020; Wingfield และ Atcharawiriyakul 2021) เพื่อให้เกิดผลผลิตจากพีซีอาร์อย่างสมบูรณ์ (Final extention) (Green และ Sambrook, 2019)

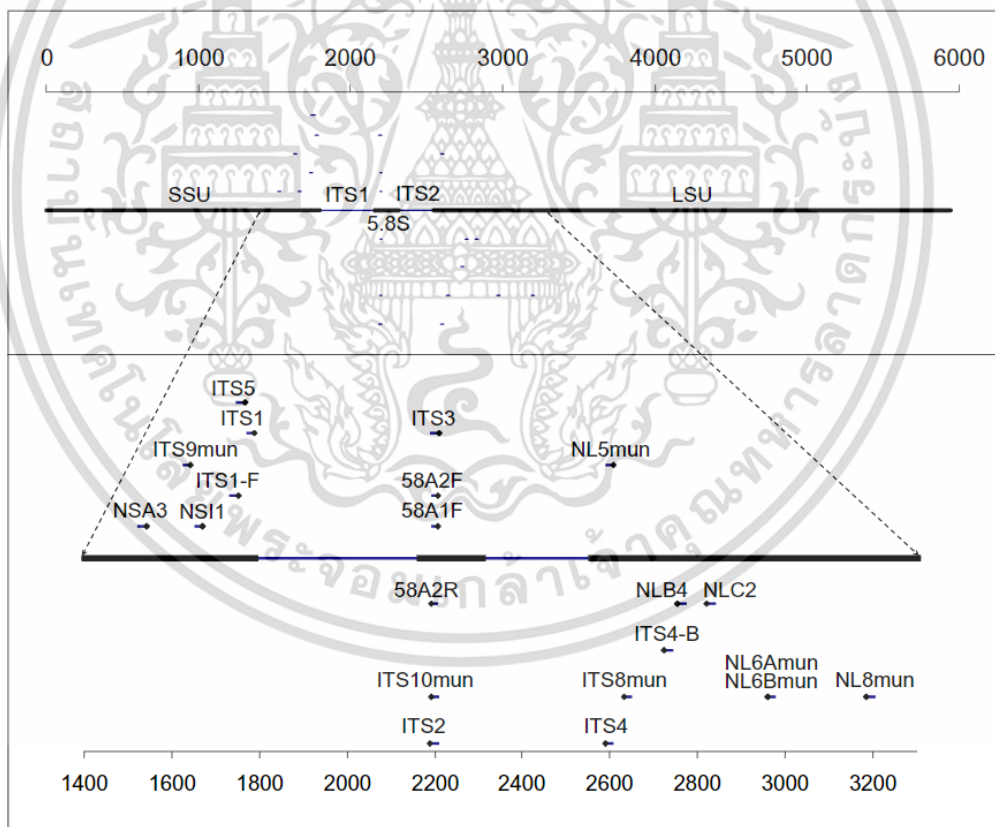
ในปัจจุบันมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา นั้น มีได้หลายตำแหน่ง หรือ บริเวณ (Region) ซึ่งดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งนั้นมีการมีวิวัฒนาการในอัตราที่ต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการคัดแยกต่างกัน โดยการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนิยมใช้ดีเอ็นเอไรโบโซม (Ribosomal DNA) ที่เป็นยีนที่ใช้กำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอไรโบโซม (Ribosomal RNA) เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ (Organelle) ที่พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกันแม้ว่าเซลล์จะมีไรโบโซมหลายชุด แต่ทุกชุดจะมีวิวัฒนาการเช่นเดียวกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไรโบโซมจะมีทั้งบริเวณอนุรักษ์ที่มีการวิวัฒนาการน้อย และบริเวณผันแปรที่มีวิวัฒนาการมาก ซึ่งสามารถใช้เป็นจุดอ้างอิงสำหรับเทียบความแตกต่างบริเวณผันแปรได้ (ปิยวรรณ และคณะ, 2557) โดยบริเวณที่มีการใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราอย่างแพร่หลายคือ บริเวณ Internal Transcribe Sequence (ITS) (Op De Beeck และคณะ 2014) เนื่องจากมีช่วงการทำงานที่ครอบคลุมกว่ายีนอื่น ๆ และมีการวิวัฒนาการรวดเร็ว และพบได้ในเชื้อราที่หลากหลาย (Raja และคณะ 2017) โดยมีความยาวในช่วง 500-600 คู่เบส เฉลี่ยประมาณ 600 คู่เบส มีบริเวณครอบคลุมตั้งแต่ยีน ITS1 ถึง ITS2 คั่นด้วยยีน 5.8S และอยู่ระหว่างยีน 18S (SSU) และ 28S (LSU) ในดีเอ็นเอไรโบโซมนิวเคลียส (Nuclear ribosomal DNA (nrDNA)) (Bellemain และคณะ 2010) (รูปที่ 2.10) จากงานวิจัยของ Mohsin และคณะ (2016) ที่ใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4 เป็นไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคใบจุดสีม่วงในต้นหอม พบว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และสามารถระบุสายพันธุ์ของเชื้อราได้ในระดับสกุลคือ เชื้อราในสกุล *Alternaria* และ *Toghueo* และคณะ (2017) ได้ทำการคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากต้นกระดังงา หูกวาง และทุกระจง ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ไลเปส และแลคเคส รวมทั้งสามารถระบุสายพันธุ์โดยใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ขั้นตอนของเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

(ที่มา: Green และ Sambrook 2019)



รูปที่ 2.10 โพรเมอร์ในตำแหน่ง ITS (Internal transcribe spacer) บน rDNA (Ribosomal DNA)

ลูกศรแสดงทิศทางของการสังเคราะห์ของดีเอ็นเอ

(ที่มา: Martin และ Rygiewicz 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างเชื้อรา

ได้รับอนุเคราะห์เชื้อราเอนโดไฟต์ (Endophyte) จาก ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ ทั้งหมด 30 ไอโซเลท (Isolate) ที่แยกได้จากผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.) จากพื้นที่สถาบันเทคโนโลยี-พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อำเภอต่างข้าง จังหวัดสุพรรณบุรี (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 รหัสไอโซเลท (Isolate) และสายพันธุ์พืชหรือโฮสต์ (Host) ที่คัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์

ลำดับ	ไอโซเลท	สายพันธุ์พืช/โฮสต์ (Host)
1	21-211	
2	21-212	
3	21-215	
4	21-218	ผักแว่นต้น (<i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.)
5	21-219	พุ่มสูง
6	21-220	
7	21-221	
8	22-108	
9	22-109	
10	22-110	
11	22-111	
12	22-112	
13	22-113	
14	22-114	ผักแว่นต้น (<i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.)
15	22-115	พุ่มเตี้ย
16	22-116	
17	22-117	
18	22-118	
19	22-119	
20	22-120	
21	22-121	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 รหัสไอโซเลท (Isolate) และสายพันธุ์พืชหรือโฮสต์ (Host) ที่คัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	สายพันธุ์พืช/โฮสต์ (Host)
22	22-122	
23	22-123	
24	22-124	
25	22-125	
26	22-126	ผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย
27	22-127	
28	22-128	
29	22-129	
30	22-130	

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

- 3.2.1.1 กระจกบอทวง (Cylinder)
- 3.2.1.2 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิดหัวตั้ง (Up-light microscope)
- 3.2.1.3 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereomicroscope)
- 3.2.1.4 ขวดแก้วใสสาร (Duran bottle)
- 3.2.1.5 เข็มเย็บเย็บ (Needle)
- 3.2.1.6 เครื่องฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 3.2.1.7 เครื่องชั่งสารแบบดิจิตอล (Electronics balance scale)
- 3.2.1.8 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture plate)
- 3.2.1.9 ดิจิตอลเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Digital Vernier caliper)
- 3.2.1.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- 3.2.1.11 ตะแกรงหลอดทดลอง (Rack)
- 3.2.1.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet)
- 3.2.1.13 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.2.1.14 ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer) เบอร์ 2 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร)
- 3.2.1.15 แท่งแก้วคนสาร (Glass rod)
- 3.2.1.16 สไลด์ (Slide) และแผ่นปิดสไลด์ (Cover slip)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ

3.2.2.1 เครื่องอุ่นหลอดการทดลอง (Heating block)

3.2.2.2 ตู้แช่เย็น (Freezer) -80 องศาเซลเซียส

3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

3.2.3.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

3.5.3.2 เครื่องวิเคราะห์ภาพเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transillminator)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อรา

3.3.1.1 Potato dextrose agar (PDA)

3.3.2 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

3.3.2.1 Nutrient agar (NA)

3.3.2.2 Nutrient broth (NB)

3.3.3 อาหารเลี้ยงยีสต์

3.3.3.1 Yeast malt agar (YM agar)

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

3.4.1.1 แลคโตฟินอล (Lactophenol)

3.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.4.2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ทริสกรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก (Tris-ethylene diamine tetra acetic acid; TE buffer)

3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์

3.4.3.1 ดิวอกซีนิวคลีโอไซด์ (2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (100 mM dNTPs) บริษัท Invitrogen (สหรัฐอเมริกา)

3.4.3.2 น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Deionized water)

3.4.3.3 ไพรมเมอร์ (Primer)

3.4.3.4 สารละลายบัฟเฟอร์พีซีอาร์ ความเข้มข้น 10 เท่า (10× Standard *Taq* reaction buffer)

3.4.3.5 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase บริษัท New England BioLabs (สหราชอาณาจักร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) (Bruns และคณะ, 1990)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาดเบส (คู่เบส)
ฟอร์เวิร์สไพรเมอร์ ITS 5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	22
รีเวิร์สไพรเมอร์: ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	20

3.4.4 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.4.4.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอ ขนาด 100 คู่เบส (DNA ladder VC 100 bp) บริษัท Vivantis (สาธารณรัฐมาเลเซีย)

3.4.4.2 สารละลายบัฟเฟอร์ทริสบอเรตกรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก (Tris-borate ethylene diamine tetra acetic acid; TBE buffer)

3.4.4.3 สีย้อมดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 3 เท่า (3× Gel loading dye) บริษัท New England BioLab (สหราชอาณาจักร)

3.4.4.4 อะกาโรสเจล (Agarose gel) บริษัท Vivantis (สาธารณรัฐมาเลเซีย)

3.4.4.5 เอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide, $C_{21}H_{20}BrN_3$)

3.5 การศึกษาการเจริญเติบโต และการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั้ง 30 ไอโซเลท โดยเจาะเส้นใยด้วยจุกคอร์ค ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวาง 1 ชิ้นวุ้นต่อจานเพาะเลี้ยง ทำทั้งหมด 3 จ้า เลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ทำการบันทึกการเจริญเติบโตของเชื้อราในวันที่ 1, 2, 4, 6 และ 7 โดยใช้ดิจิทัลเวอร์เนียร์คาลิเปอร์วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Colony) ในแนวแกน X และแกน Y จากนั้นสังเกต และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา เช่น รูปร่างโคโลนี (Colony form) สีของโคโลนี (Colony colour) การยกตัวของโคโลนี (Colony elevation) ขอบโคโลนี (Colony margin) รวมทั้งสังเกต และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มองเห็นวัตถุจากด้านบน เช่น รูปร่าง (Shape) และขนาด (Size) ของสปอร์ (Spore) ลักษณะเส้นใย เป็นต้น

3.6 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตไลเปส (Ramnath และคณะ 2017)

ทดสอบอาหาร และคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้วิธีการทดลองของ Ramnath และคณะ, (2017) เตรียมเชื้อราเอนโดไฟต์เริ่มต้น โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเจาะเส้นใยเชื้อราด้วยจุกคอร์คย้ายชิ้นวุ้นลงบนอาหารเลี้ยง PA + TW 20 โดยวาง 1 ชิ้นวุ้น ต่อจานเพาะเลี้ยง ทำทั้งหมด 3 จ้า และในการทดลองมีชุดควบคุม คือ ยีสต์เอกลานนี้ และแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา) จากนั้นไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำจานเพาะเลี้ยงไปเลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน โดยบันทึกการเจริญเติบโตด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแนวแกน X และแกน Y โดยใช้ดิจิทัลเวอร์เนียคาลิเปอร์ในวันที่ 1, 2, 4, 6 และ 7 และในวันที่ 7 บันทึกการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดตะกอนในแนวแกน X และแกน Y โดยใช้ดิจิทัลเวอร์เนียคาลิเปอร์ และคำนวณหาค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากสมการของค่าดัชนีเอนไซม์ (Amaral, Ferreira, และ Silva Bentes 2022; AP. และคณะ 2021; Chamekh และคณะ 2019) โดยอ้างอิงจากเกณฑ์ของ Amaral และคณะ (2022) ที่แบ่งกลุ่มของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ได้ตามค่าดัชนีเอนไซม์ เป็นผู้ผลิตที่ดี (Good producer) (ค่าดัชนีเอนไซม์มากกว่า 2) ผู้ผลิตทั่วไป (Moderate producer) (ค่าดัชนีเอนไซม์อยู่ระหว่าง 1-2) และผู้ผลิตที่แย่ (Weak producer) (ค่าดัชนีเอนไซม์น้อยกว่า 1) โดยคัดเลือกเอาเชื้อราที่มีค่าดัชนีเอนไซม์สูงที่สุด และรองลงมา (2 ลำดับ) เพื่อใช้ในการระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

$$\text{ค่าดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณตะกอน}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี}}$$

3.7 การระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอโดย Rapid method (Tangthirasunun และ Poeaim, 2022)

เพาะเลี้ยงเชื้อราบนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นขูดเส้นใยลงในหลอดปั่นเหวี่ยง 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำหลอดไปแช่ที่ตู้แช่เย็น -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification) ต่อไป

3.7.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราบนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ด้วยคูไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (ตารางที่ 3.2) (Bruns และคณะ, 1990) ซึ่งมีสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.3 (Tangthirasunun และคณะ, 2014) และมีสภาวะที่ใช้ในการทำเทคนิคพีซีอาร์ ดังตาราง 3.4 ซึ่งดัดแปลงจากสภาวะของ Viebahn และคณะ (2005) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่เจลอะกาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 1 และมี DNA ladder VC 100 คู่เบส เพื่อใช้เปรียบเทียบขนาด จากนั้นรันเจลโดยใช้บัฟเฟอร์ TE ความเข้มข้น 0.5x แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) และนำเจลอะกาโรสที่ได้ไปอ่านผลที่วิเคราะห์ภาพ

ใต้เครื่องวิเคราะห์ภาพเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ที่บริษัท CELEMICS, Inc. (สาธารณรัฐเกาหลี) จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไป BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เทียบกับฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ระบุสกุลของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 การเตรียมความเข้มข้นสารที่ใช้ในพีซีอาร์ (PCR) (Tangthirasunun และคณะ, 2014)

สารที่ใช้	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ			2.0
Standard <i>Taq</i> reaction buffer	10 เท่า	1 เท่า	0.2
dNTPs	100 มิลลิโมลาร์	200 ไมโครโมลาร์	4.0
ไพรเมอร์ Forward	20 พิโคโมล	0.8 พิโคโมล	1.0
ไพรเมอร์ Reverse	20 พิโคโมล	0.8 พิโคโมล	1.0
<i>Taq</i> DNA polymerase	5000 หน่วย/มิลลิลิตร	1 หน่วย	0.2
น้ำกลั่นบริสุทธิ์			14.3
ปริมาตรสุทธิ			25

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	5
Denaturation	94	1
Annealing	50	1
Extension	72	1.30
Final extension	72	10
Cool down	4	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโต และการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) สามารถคาดการณ์สกุล (Genus) ได้เพียง 8 ไอโซเลทจากเชื้อราทั้งหมด 30 ไอโซเลท ซึ่งพบว่ามีสกุล *Aspergillus* จำนวนไอโซเลทมากที่สุด คือ 6 ไอโซเลท (21-211, 21-212, 22-221, 22-108, 22-114 และ 22-120) รองลงมา คือ เชื้อราสกุล *Fusarium* มีจำนวนไอโซเลททั้งหมด 2 ไอโซเลท (22-219 และ 22-126) และที่ไม่สามารถระบุ หรือคาดการณ์สกุลได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลท คือ 22-109, 22-112, 21-215, 21-218, 21-220, 22-121, 22-110, 22-111, 22-113, 22-115, 22-116, 22-117, 22-118, 22-119, 22-122, 22-123, 22-124, 22-125, 22-127, 22-128, 22-129 และ 22-130 (ตารางที่ 4.1) และผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA ของเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมด ในวันที่ 4 พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. ไอโซเลท 22-114 มีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตเร็วที่สุด คือ 83.53 ± 0.90 มิลลิเมตร ซึ่งมีอัตราการเจริญเฉลี่ยอยู่ที่ 25.35 มิลลิเมตร/วัน และเชื้อรา *Periconia* sp. ไอโซเลท 21-215 มีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตช้าที่สุด คือ 15.55 ± 0.10 มิลลิเมตร ซึ่งมีอัตราการเจริญเฉลี่ยอยู่ที่ 2.43 มิลลิเมตร/วัน (ตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 สกุล (Genus) ที่คาดการณ์ และอัตราการเจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ของเชื้อราในวันที่ 4

ไอโซเลท	สกุลที่คาดการณ์	ค่าเฉลี่ยการเจริญ (มิลลิเมตร)	อัตราการเจริญเฉลี่ย (มิลลิเมตร/วัน)
21-211	<i>Aspergillus</i> sp. ¹	79.22±3.41	22.55
21-212		69.12±2.23	19.27
21-221		28.50±0.39	6.52
22-108		68.12±1.18	21.01
22-114		83.53±0.90	25.35
22-120		65.98±0.48	18.23
21-219	<i>Fusarium</i> sp. ¹	23.00±1.95	6.05
22-126		58.58±1.13	15.95
21-215	<i>Periconia</i> sp. ²	15.55±0.10	2.43
22-124	<i>Xylaria</i> sp. ²	29.70±1.88	7.96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

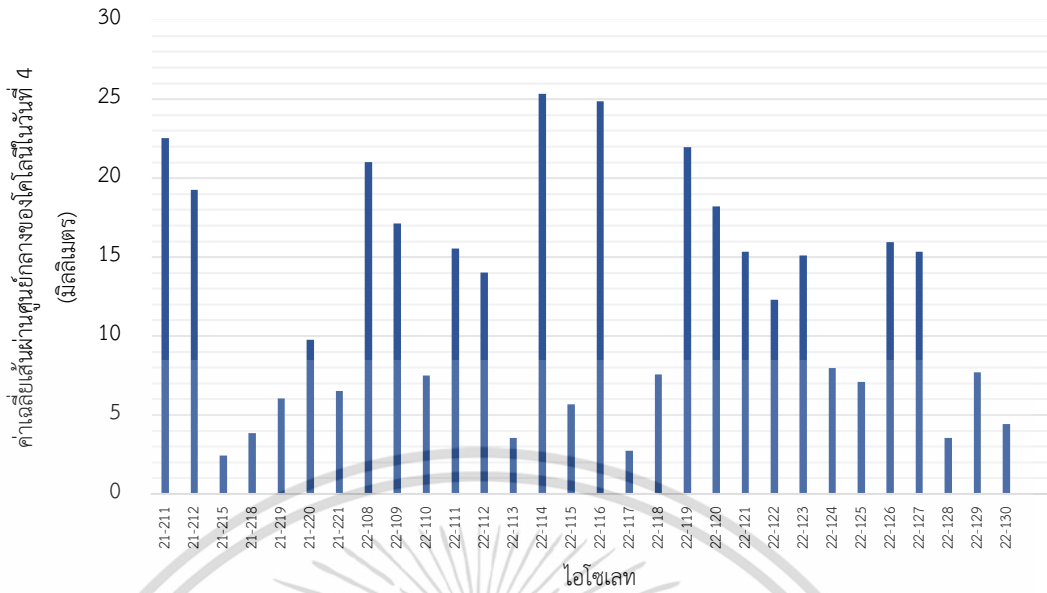
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 สกุล (Genus) ที่คาดการณ์ และอัตราการเจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ของเชื้อราในวันที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลข	สกุลที่คาดการณ์	ค่าเฉลี่ยการเจริญ (มิลลิเมตร)	อัตราการเจริญเฉลี่ย (มิลลิเมตร/วัน)
21-218	ไม่สามารถระบุได้	22.17±0.37	3.86
21-220	ไม่สามารถระบุได้	42.00±0.69	9.75
22-109	ไม่สามารถระบุได้	56.73±1.52	17.14
22-110	ไม่สามารถระบุได้	28.33±0.43	7.49
22-111	ไม่สามารถระบุได้	59.32±0.46	15.55
22-112	ไม่สามารถระบุได้	54.08±1.57	14.02
22-113	ไม่สามารถระบุได้	16.85±0.61	3.56
22-115	ไม่สามารถระบุได้	22.48±0.38	5.66
22-116	ไม่สามารถระบุได้	81.40±0.98	24.86
22-117	ไม่สามารถระบุได้	13.62±0.28	2.73
22-118	ไม่สามารถระบุได้	32.58±0.20	7.56
22-119	ไม่สามารถระบุได้	81.17±0.76	21.98
22-121	ไม่สามารถระบุได้	55.28±1.23	15.33
22-122	ไม่สามารถระบุได้	42.72±0.52	12.29
22-123	ไม่สามารถระบุได้	55.28±2.34	15.10
22-125	ไม่สามารถระบุได้	28.00±1.29	7.11
22-127	ไม่สามารถระบุได้	53.25±2.41	15.35
22-128	ไม่สามารถระบุได้	17.30±1.05	3.56
22-129	ไม่สามารถระบุได้	30.55±0.41	7.69
22-130	ไม่สามารถระบุได้	19.22±0.88	4.43

หมายเหตุ : ¹ ระบุสายพันธุ์โดยการคาดการณ์จากลักษณะสัณฐานวิทยา, ² ระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนิในวันที่ 4 ของเชื้อราเอนโดไฟต์

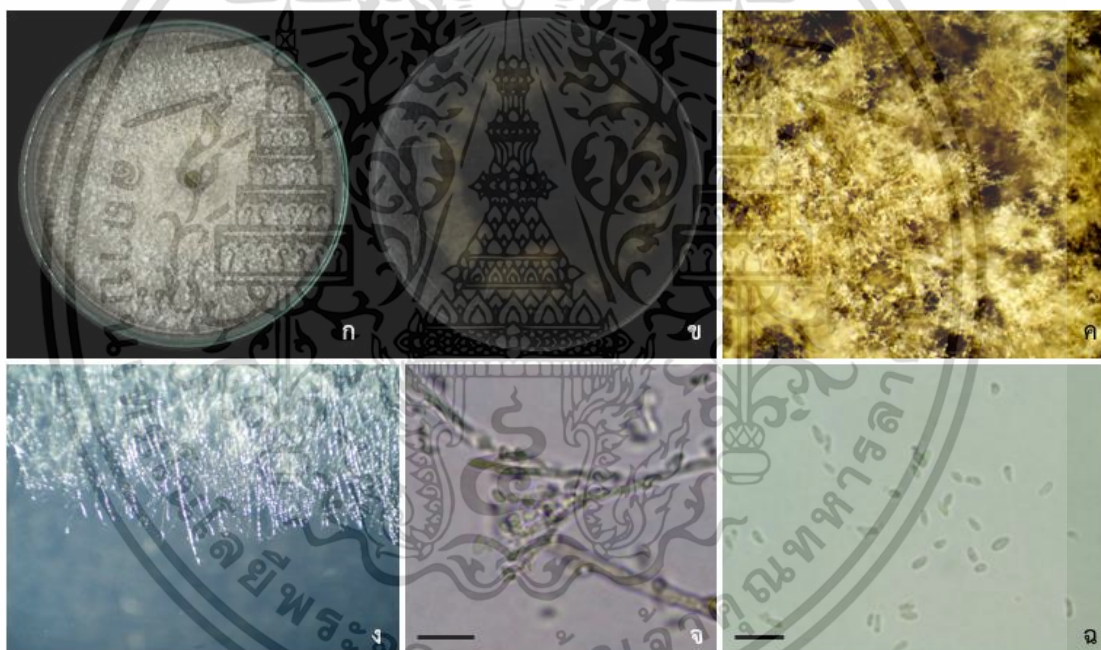
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 21-211 (สกุลที่คาดการณ์ คือ *Aspergillus* sp.)

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนี (Colony surface) มีลักษณะเรียบ (Smooth) การยกตัวของโคโลนี (Colony elevation) มีลักษณะยกขึ้นจากผิวหน้าอาหาร (Raised) รูปร่างโคโลนี (Colony form) มีลักษณะกลม (Circular) ขอบโคโลนี (Colony margin) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereomicroscope) มีลักษณะขอบเป็นเส้นสาย (Filamentous) พบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีดำ

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง (Up-light microscope) พบโคนิดีโอพอร์ (Conidiopores) และพบโคนิเดีย (Conidia) สีเขียวโปร่งใส รูปทรงรี (Ellipsoidal) ดังรูปที่ 4.2 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าเชื้อรานี้มีสกุล *Aspergillus* sp.

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 79.22 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.2 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 21-211 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) โคนิดีโอพอร์ และ (ฉ) สปอร์

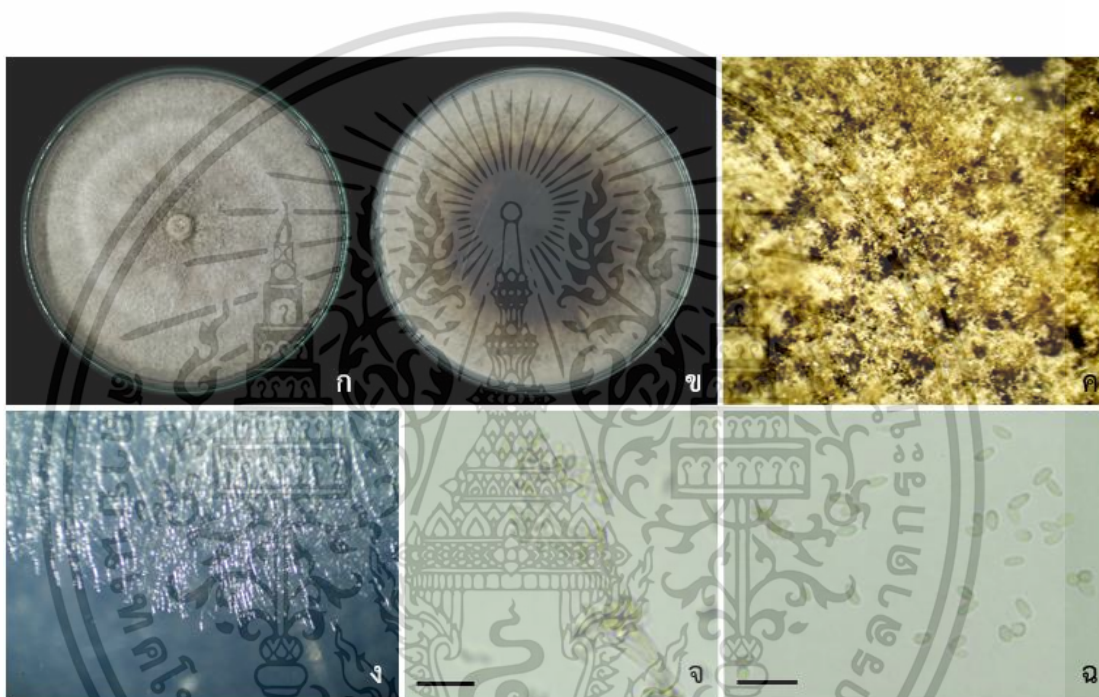
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 21-212 (สกุลที่คาดการณ์ คือ *Aspergillus* sp.)

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะยกขึ้นจากผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ มีลักษณะขอบเป็นเส้นสาย

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบโคนิดีโอฟอร์ และพบโคนิเดีย สีเขียวโปร่งใส รูปทรงรี ดังรูปที่ 4.3 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าเชื้อรานี้มีสกุล *Aspergillus* sp.

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 69.12 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.3 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 21-212 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) โคนิดีโอฟอร์ (ฉ) สปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 21-215

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร และมีปุ่มตรงกลาง (Umbonate) รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ (Erose) กลุ่มเส้นใยมีสีขาว และพบการเปลี่ยนของสีอาหารเป็นสีเหลือง

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบกลุ่มเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.4 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 15.55 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.4 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 21-215 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย

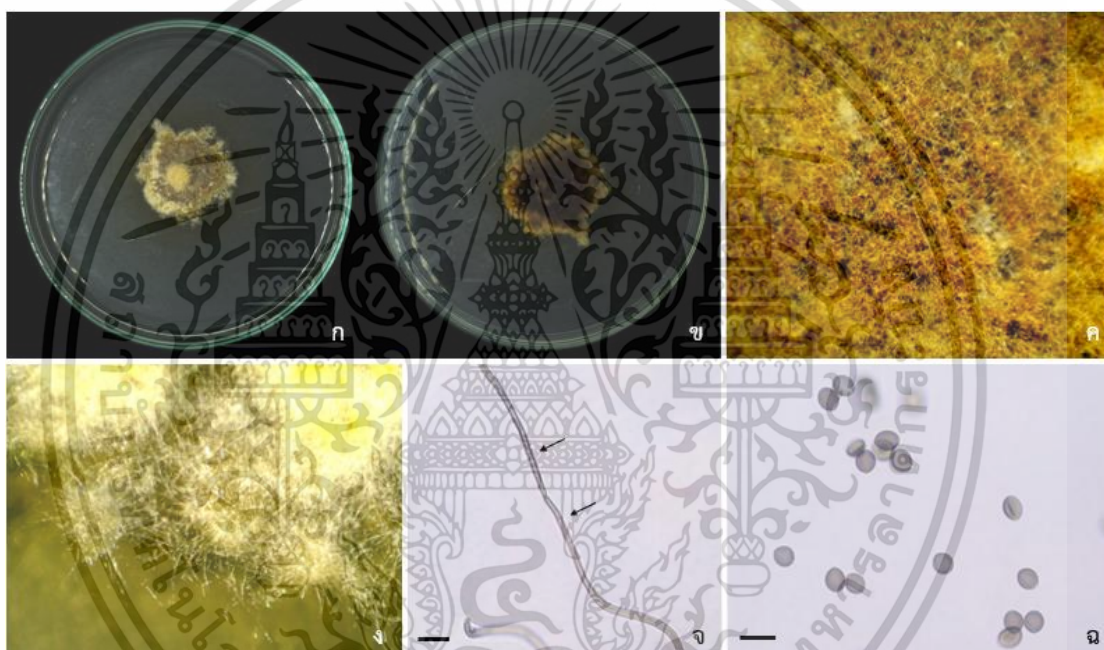
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 21-218

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าเหี่ยวยุ่น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบโค้งเว้ามาก กลุ่มเส้นใยมีสีน้ำตาล ขาว และพบการเปลี่ยนของสีอาหารเป็นสีเหลือง

เมื่อนำโคโลนี PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบผนังกันเส้นใย (Spptate hypha) และพบสปอร์รูปไข่ (Ovate) ดังรูปที่ 4.5 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 22.17 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



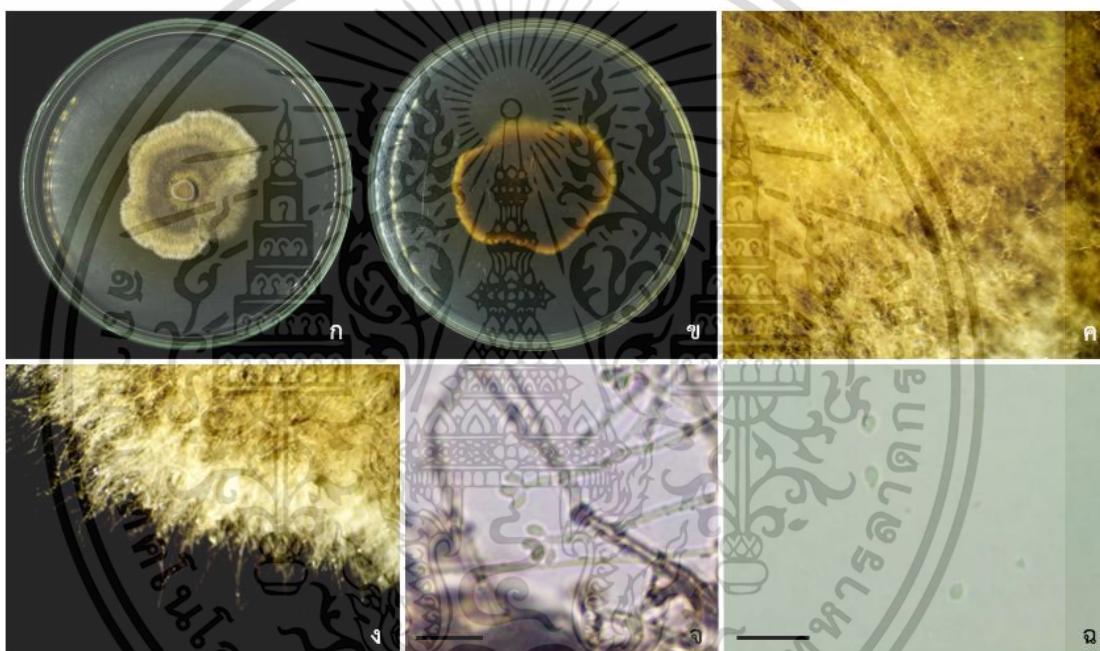
รูปที่ 4.5 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 21-218 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) เส้นใยมีผนังกัน (ฉ) สปอร์

ไอโซเลท 21-219 (สกุลที่คาดการณ์ คือ *Fusarium* sp.)

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ มีลักษณะคล้ายราก (Rhizoid) กลุ่มเส้นใยมีสีน้ำตาล และพบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาลไปถึงเหลือ

เมื่อนำโคโลนี PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบโคนิดิโอฟอร์ และพบโคนิเดีย ดังรูปที่ 4.6 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าเชื้อรานี้มีสกุล *Fusarium* sp.

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 23.00 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



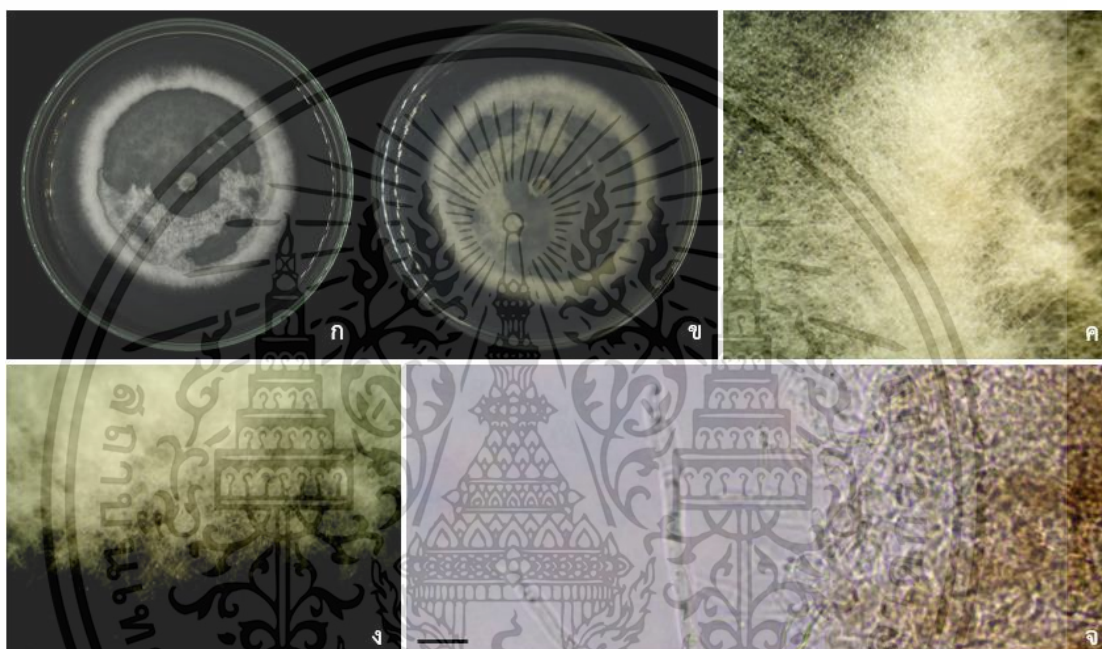
รูปที่ 4.6 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 21-219 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) โคนิดิโอฟอร์ (ฉ) สปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 21-220

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะยกขึ้นจากผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีขาว

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบกลุ่มเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.7 จากลักษณะสัณฐานวิทยานี้ไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 42.00 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.7 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 21-220 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย

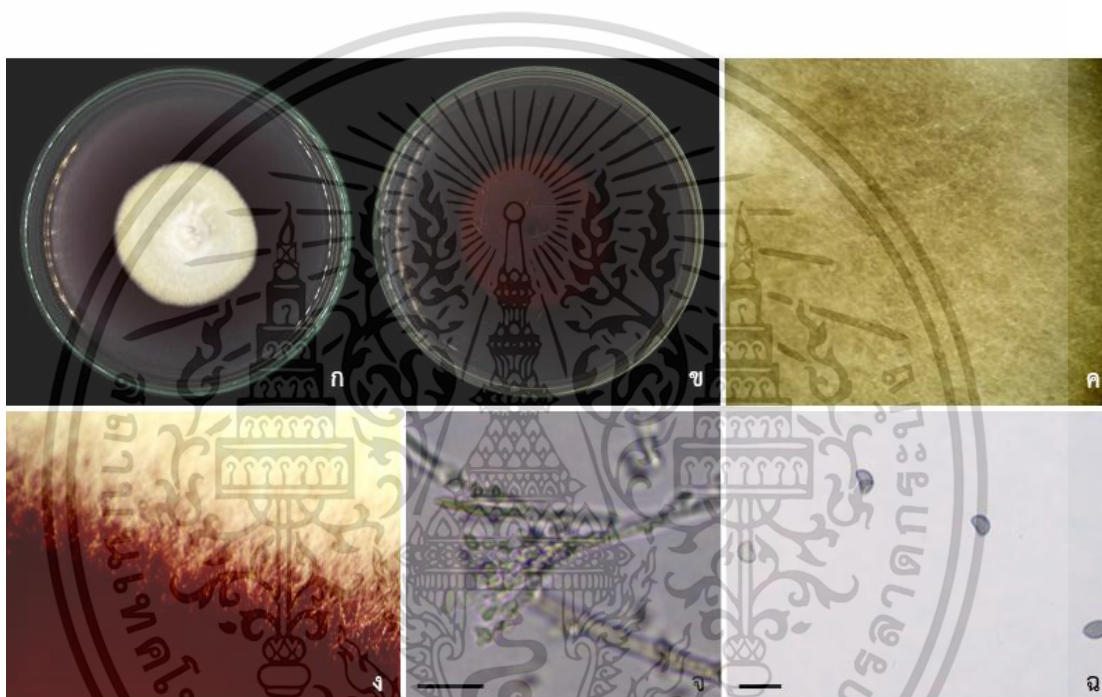
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 21-221 (สกุลที่คาดการณ์ คือ *Aspergillus* sp.)

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าแบบเรียบ การยักตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ มีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีขาว และพบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีม่วง

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบโคนิดิโอฟอร์ และพบโคนิเดีย สีเขียวโปร่งใส รูปทรงถั่ว (Reniform) ดังรูปที่ 4.8 จากลักษณะสัณฐานวิทยานี้สามารถคาดการณ์ได้ว่าเชื้อรานี้มีสกุล *Aspergillus* sp.

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 28.50 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



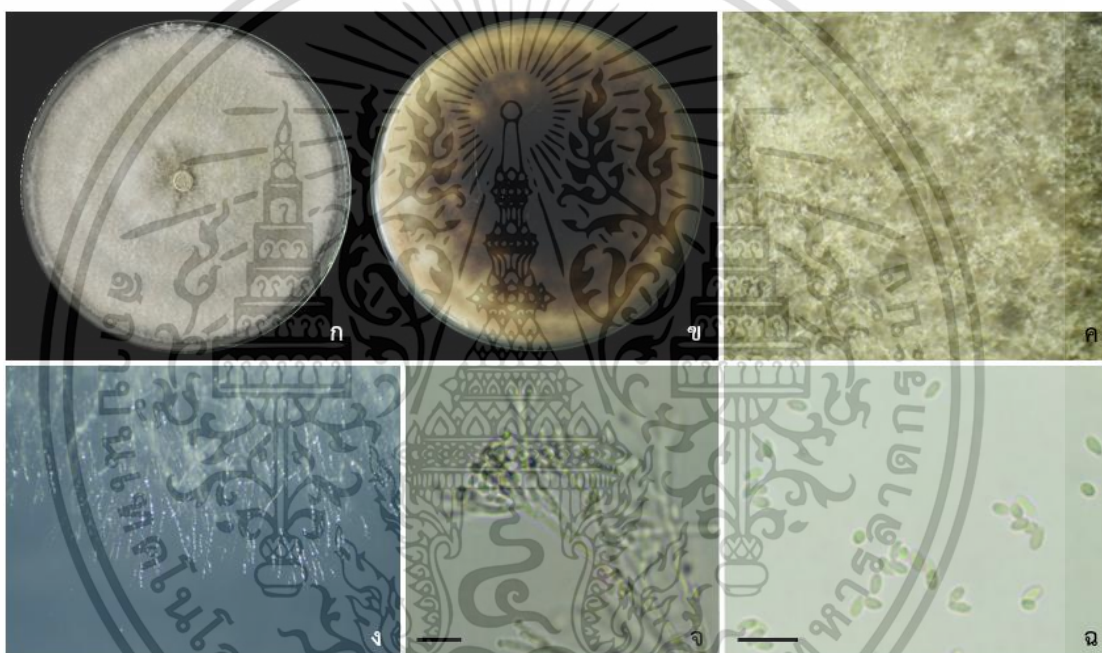
รูปที่ 4.8 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 21-221 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) โคนิดิโอฟอร์ (ฉ) สปอร์

ไอโซเลข 22-108 (สกุลที่คาดการณ์ คือ *Aspergillus* sp.)

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะยกตัวขึ้นจากผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีเขียวไปถึงขาว และพบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีดำ

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบโคนิดิโอฟอร์และพบโคนิเดีย สีเขียวโปร่งใส รูปทรงรี ดังรูปที่ 4.9 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าเชื้อรานี้มีสกุล *Aspergillus* sp.

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 68.12 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.9 ลักษณะเชื้อราไอโซเลข 22-108 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) โคนิดิโอฟอร์ (ฉ) สปอร์

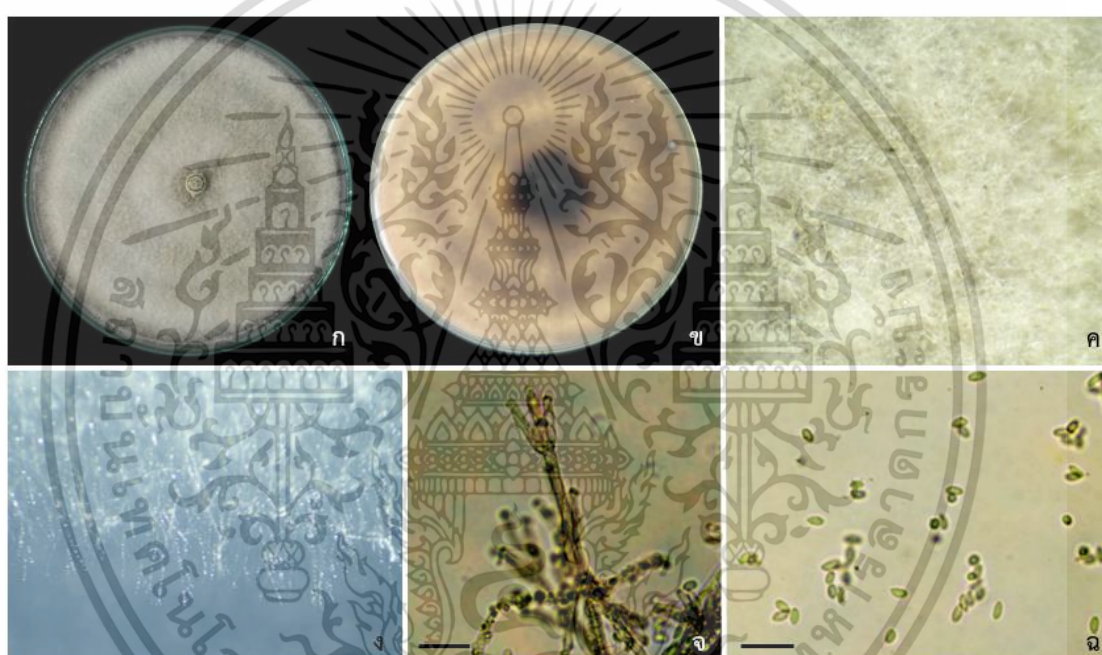
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-109

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าเป็นแบบเรียบ การยกดตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างเป็นเส้นสาย ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะเป็นกลีบ กลุ่มเส้นใยมีสีเขียวไปถึงขาว และพบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีดำ

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบโคนิไดโอฟอร์ และพบโคนิเดีย สีเขียวโปร่งใส รูปทรงรี ดังรูปที่ 4.10 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 56.73 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)

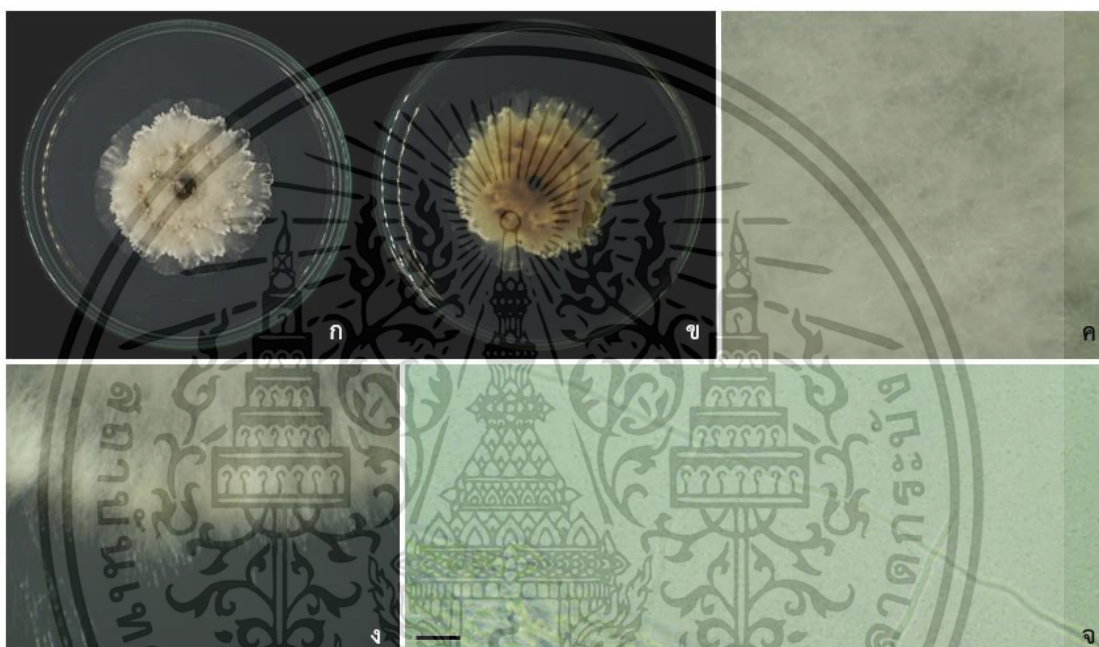


รูปที่ 4.10 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-109 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) โคนิไดโอฟอร์ (ฉ) สปอร์

ไอโซเลท 22-110

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าขรุขระ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะยกขึ้นกับผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีขาวไปถึงน้ำตาล

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบกลุ่มเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.11 จากลักษณะสัณฐานวิทยานี้ไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 28.33 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.11 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-110 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-111

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งนูนขึ้นจากอาหารเล็กน้อย (Convex) รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีเทาถึงขาว และพบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีดำ

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบผนังกันเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.12 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 59.32 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



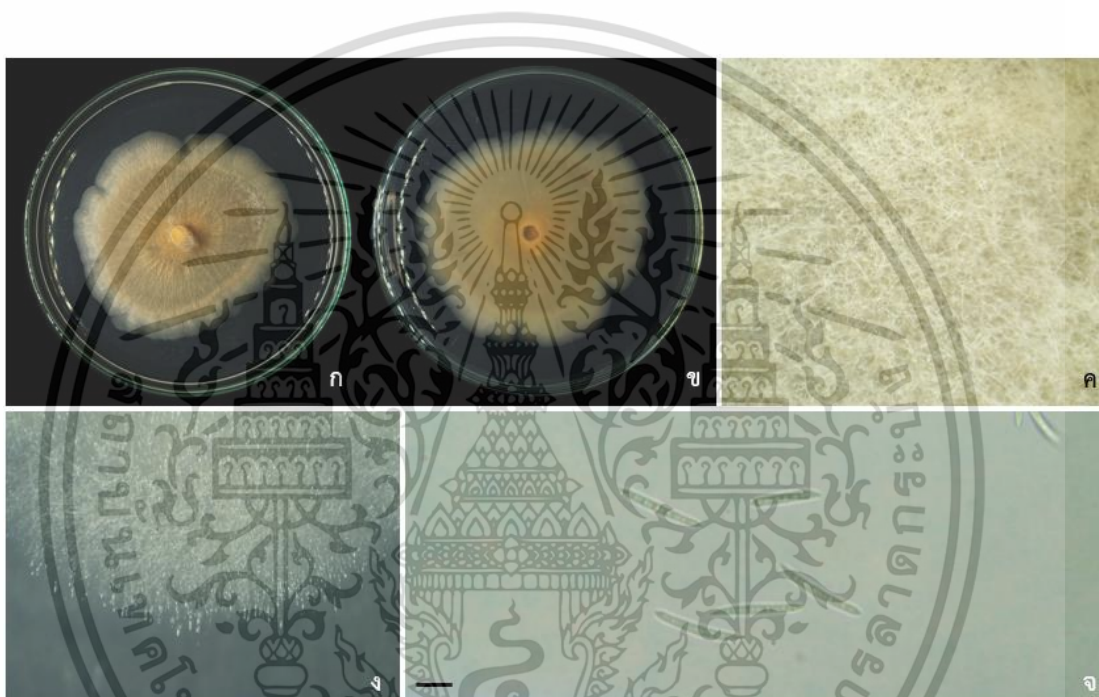
รูปที่ 4.12 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-111 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) เส้นใยมีผนังกัน

ไอโซเลท 22-112

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งนูนขึ้นจากอาหารเล็กน้อย รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีส้มถึงชมพู

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบสปอร์รูปทรงพระจันทร์เสี้ยว (Lunate) ดังรูปที่ 4.13 จากลักษณะสัณฐานวิทยานี้ไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 54.08 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



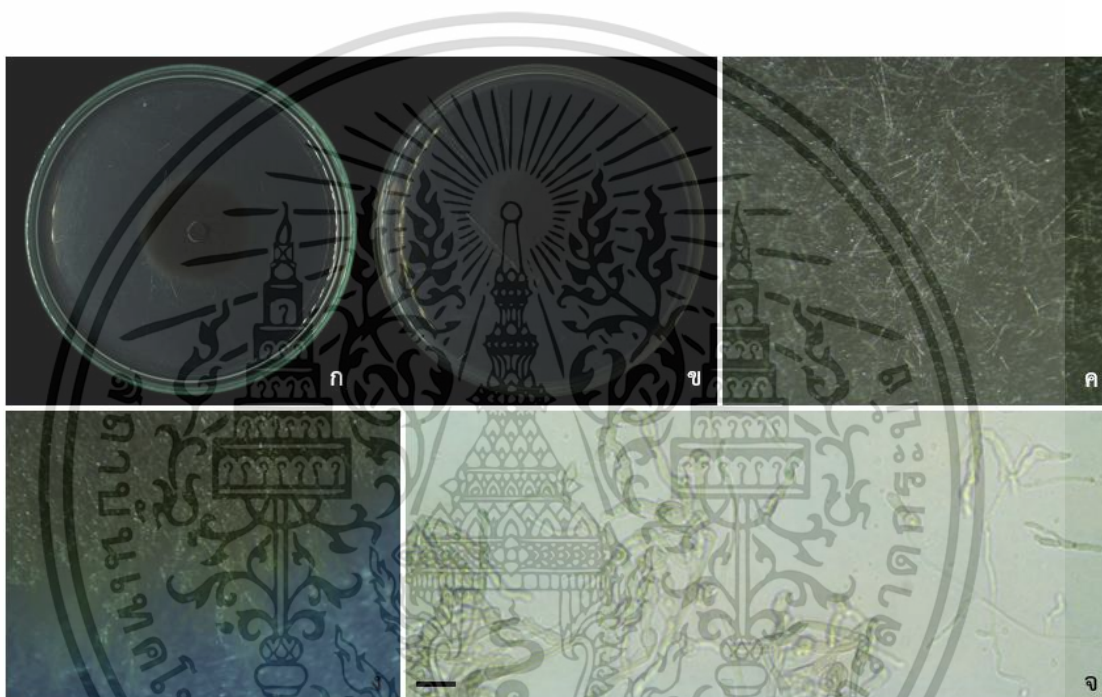
รูปที่ 4.13 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-112 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) สปอร์

ไอโซเลท 22-113

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีเขียวเข้ม

เมื่อนำ โคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบกลุ่มเส้นใยสีเขียวโปร่งใส และไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.14 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 16.85 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



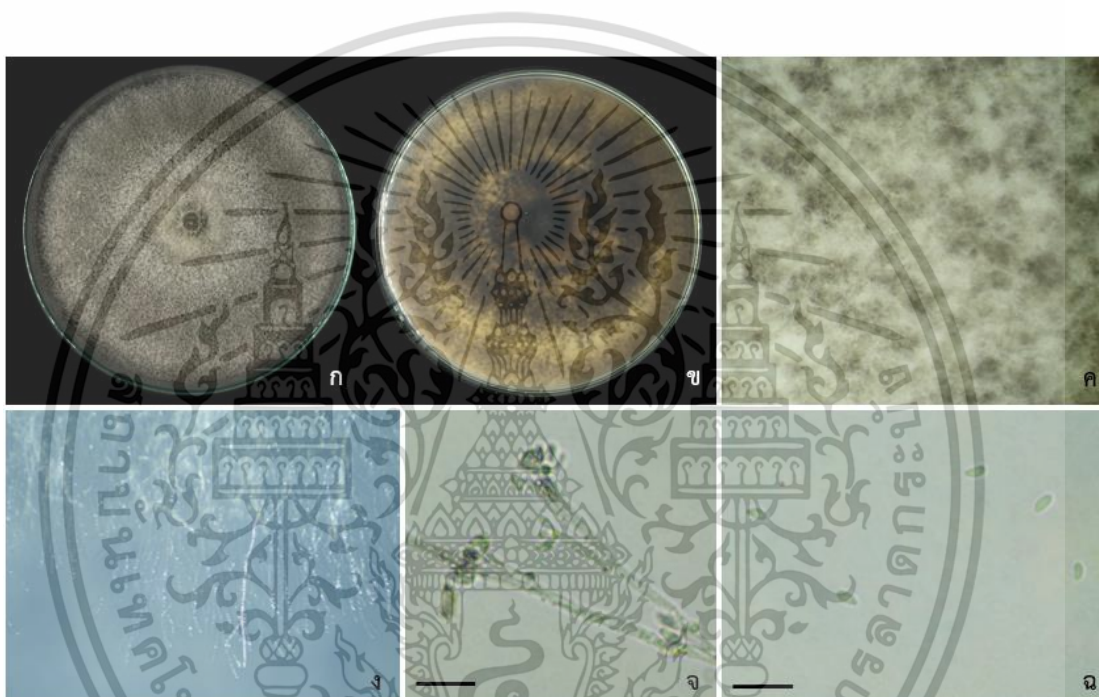
รูปที่ 4.14 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-113 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย

ไอโซเลท 22-114 (สกุลที่คาดการณ์ คือ *Aspergillus* sp.)

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ มีลักษณะขอบขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีเขียวเข้ม

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบโคนิดิโอฟอร์ และ พบโคนิเดีย สีเขียวโปร่งใส รูปทรงไข่ ดังรูปที่ 4.15 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าเชื้อรานี้มีสกุล *Aspergillus* sp.

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 83.53 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



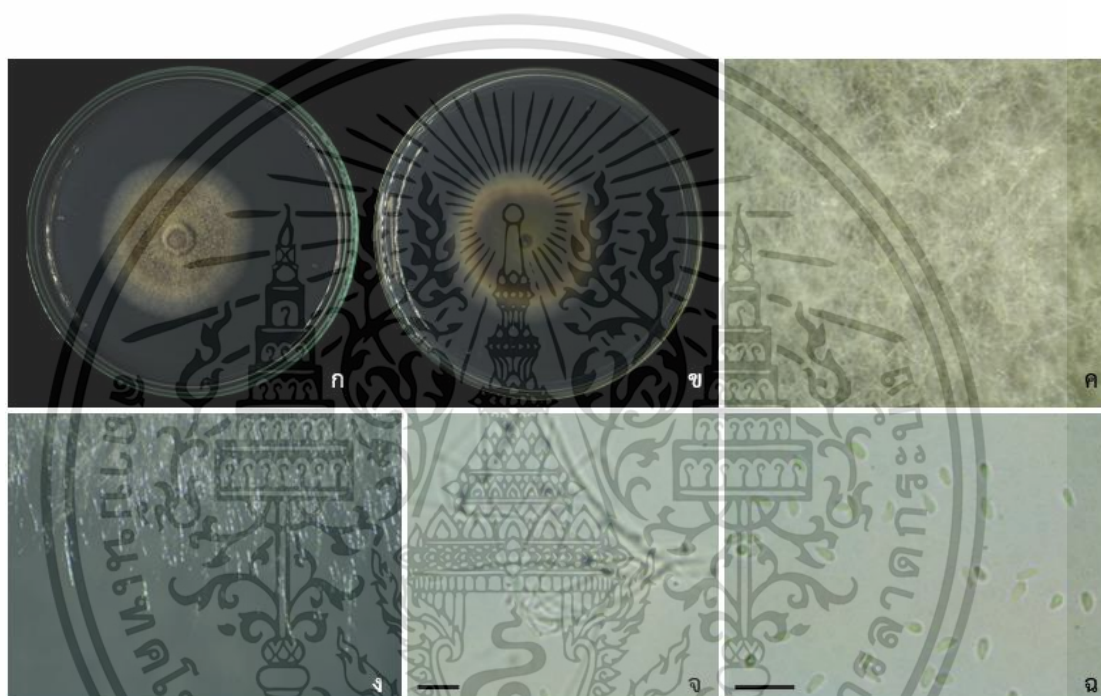
รูปที่ 4.15 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-114 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) โคนิดิโอฟอร์ (ฉ) สปอร์

ไอโซเลท 22-115

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนี มีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ มีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีเขียวถึงน้ำตาล

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบกลุ่มเส้นใยและพบสปอร์สีเขียวโปร่งแสง รูปทรงรี ดังรูปที่ 4.16 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 22.48 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)

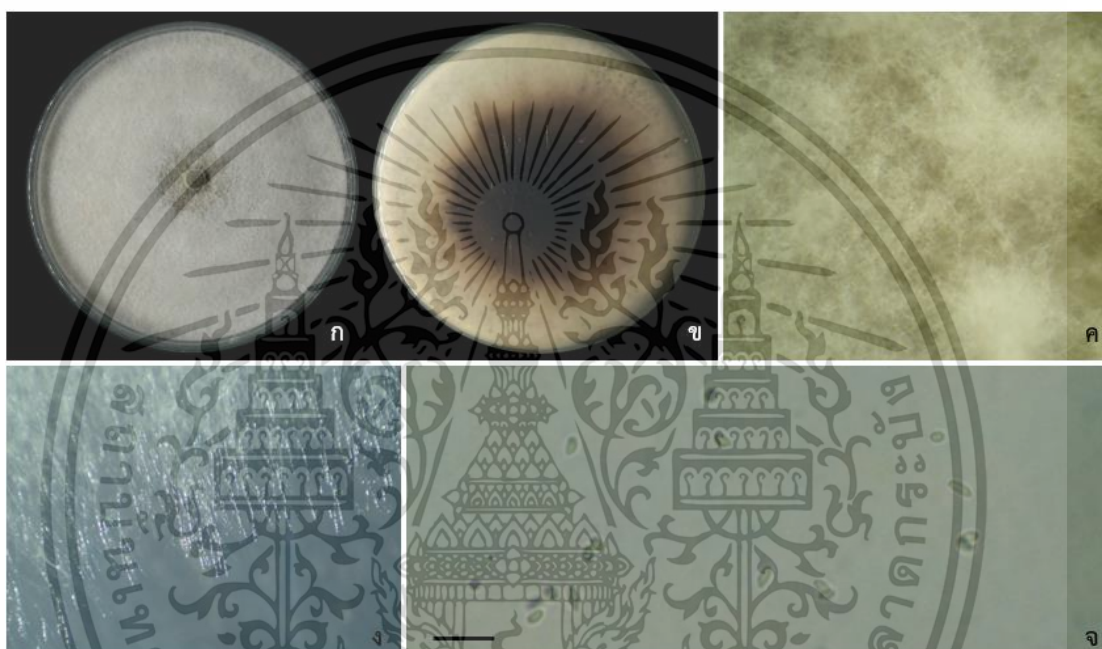


รูปที่ 4.16 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-115 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย (ฉ) สปอร์

ไอโซเลท 22-116

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะยกขึ้นจากผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีน้ำตาลไปถึงดำ

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบโคโคนิดี สีเขียวโปร่งใส รูปทรงไข่ ดังรูปที่ 4.17 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 81.40 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



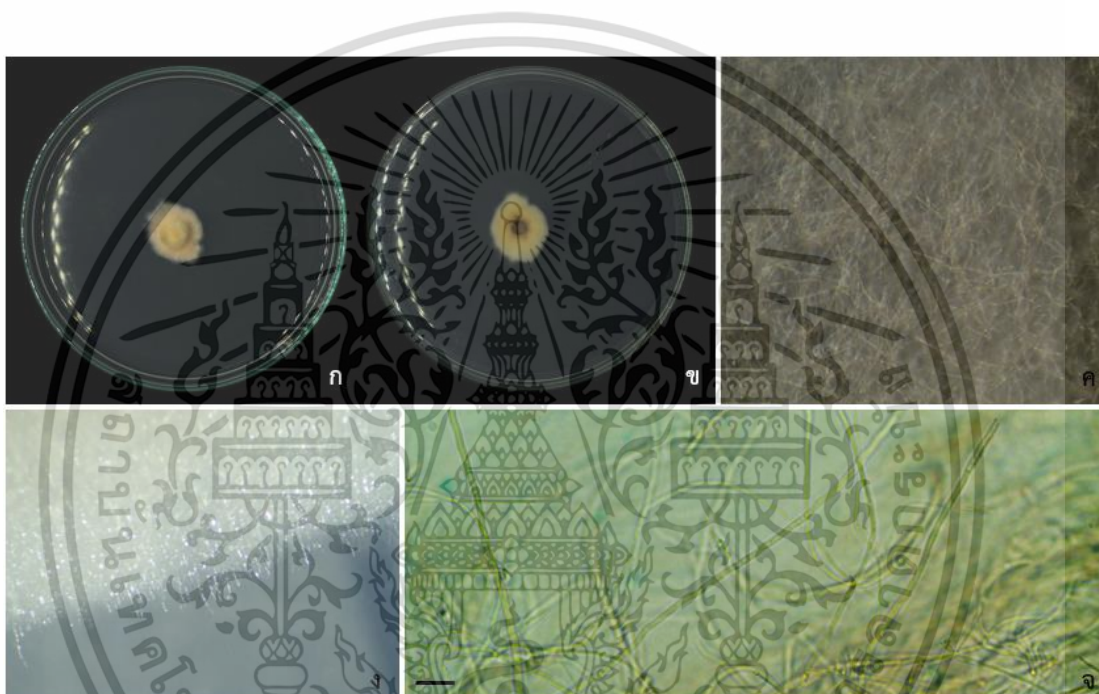
รูปที่ 4.17 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-116 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) สปอร์

ไอโซเลท 22-117

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหารและมีปุ่มตรงกลาง รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน (Irregular) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีน้ำตาลไปถึงดำ

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้งพบกลุ่มเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.18 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 13.62 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



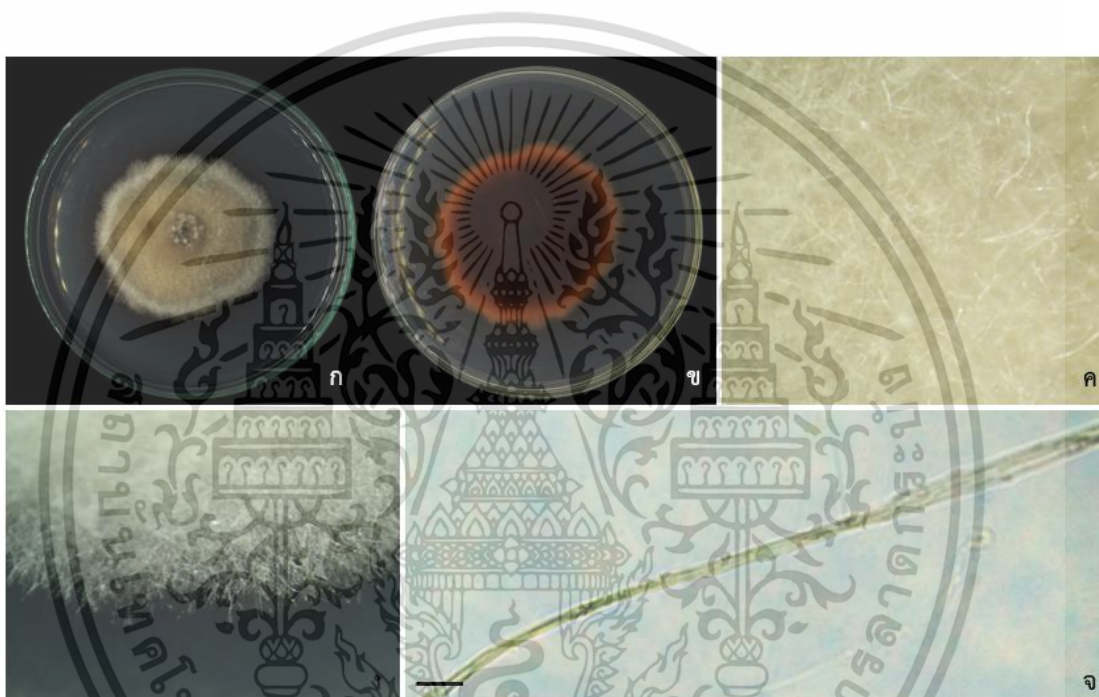
รูปที่ 4.18 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-117 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-118

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น (Concentric) การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งนูนสูงชันจากผิวหน้าอาหาร (Pulvinte) รูปร่างโคโลนีมีลักษณะกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบเป็นเส้นสาย กลุ่มเส้นใยมีสีน้ำตาลไปถึงเทา และพบการเปลี่ยนของสีของอาหารเป็นสีน้ำตาลไปถึงส้ม

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้งพบ กลุ่มเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.19 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 32.58 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)

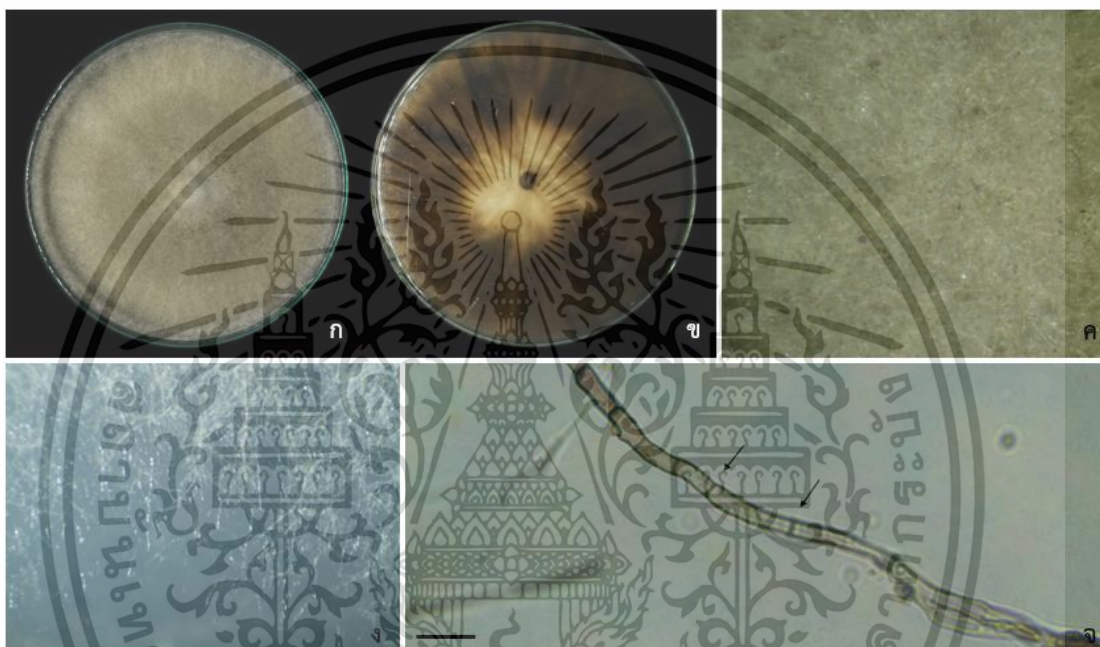


รูปที่ 4.19 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-118 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย

ไอโซเลท 22-119

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะยกขึ้นจากผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีเทา

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้งพบ ผนังกันเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.20 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 81.17 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



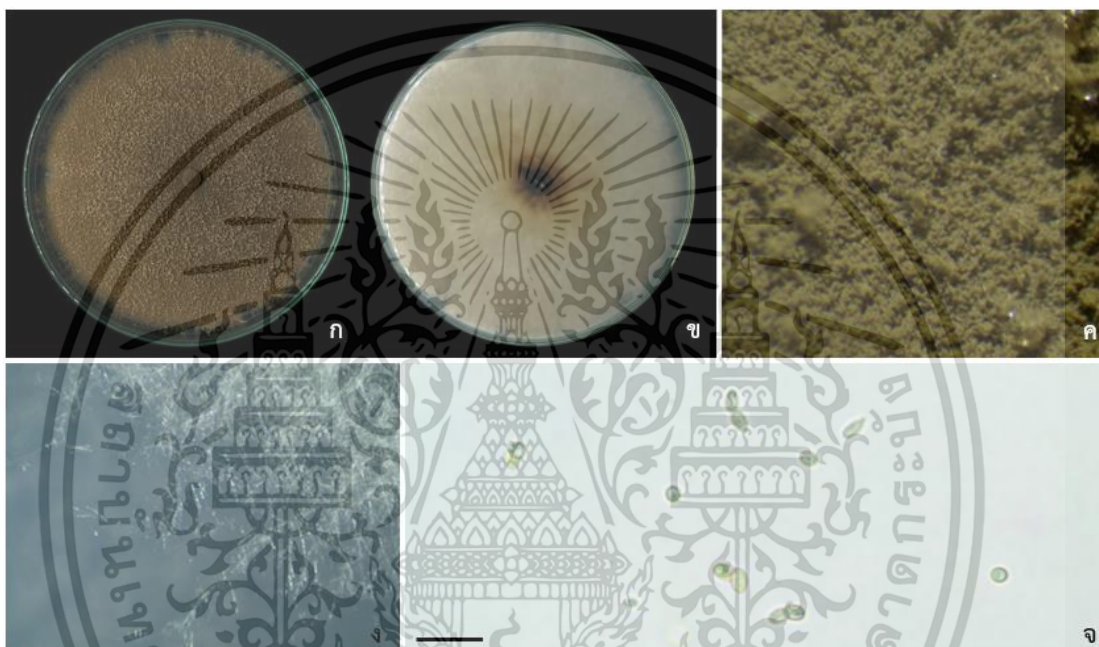
รูปที่ 4.20 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-119 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) ผนังกันเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-120 (สกุลที่คาดการณ์ คือ *Aspergillus* sp.)

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบ (Flat) รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบโค้งเว้ามาก (Lobate) กลุ่มเส้นใยมีสีน้ำตาล

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบสปอร์รูปทรงกลม ดังรูปที่ 4.21 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าเชื้อรานี้มีสกุล *Aspergillus* sp. และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 65.98 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.21 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-120 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) สปอร์

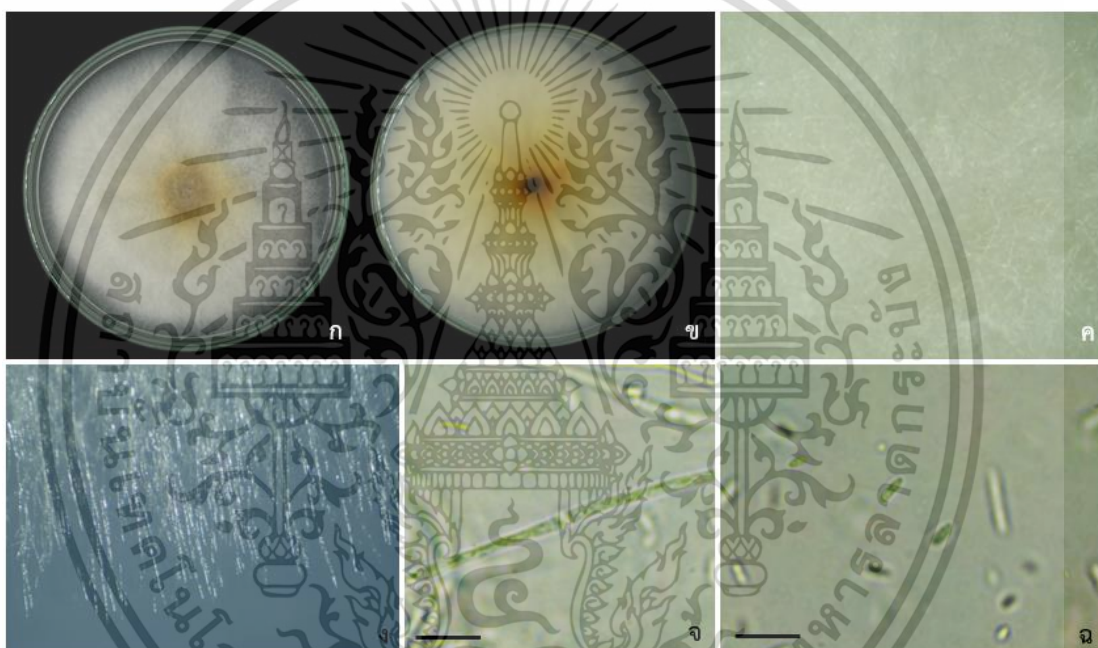
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-121

โคโลนิบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งงอขึ้นจากผิวอาหารเล็กน้อย รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีขาวถึงน้ำตาล

เมื่อนำโคโลนิบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบกลุ่มของเส้นใย และพบสปอร์รูปทรงรี ดังรูปที่ 4.22 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 55.28 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.22 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-121 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย (ฉ) สปอร์

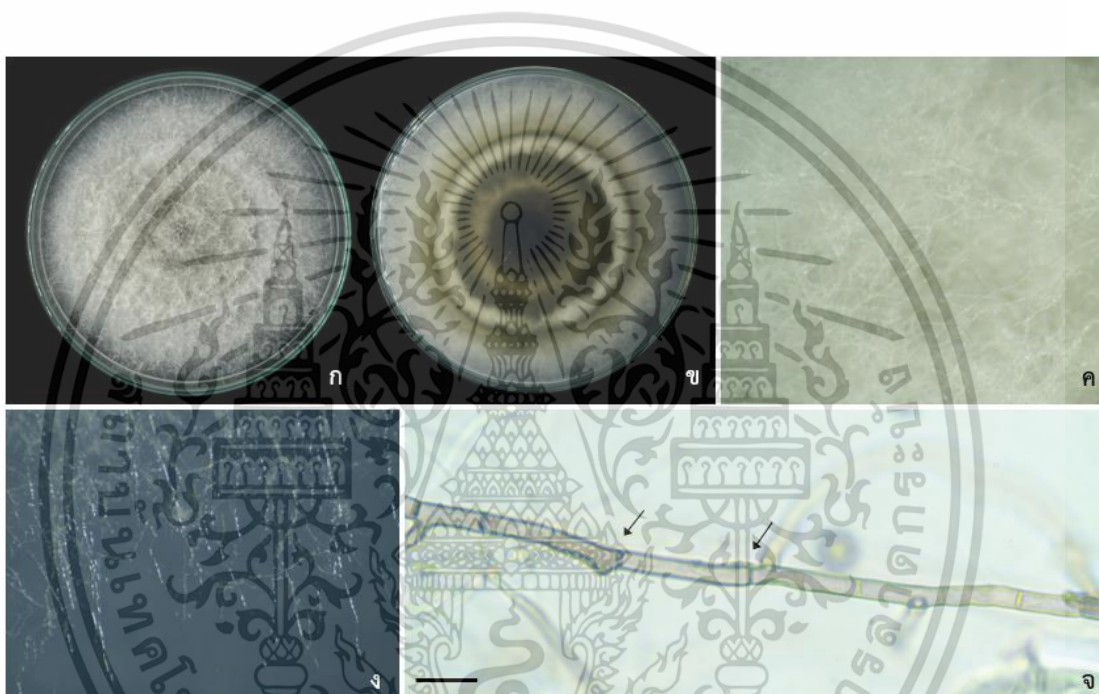
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-122

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะไม่พุ่งกระจาย (Crateriform) รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม (Circular) ลักษณะขอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอกลุ่มเส้นใยมีสีขาวถึงน้ำตาล

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง ไม่พบสปอร์ และพบผนังกันเส้นใย ดังรูปที่ 4.23 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 55.28 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



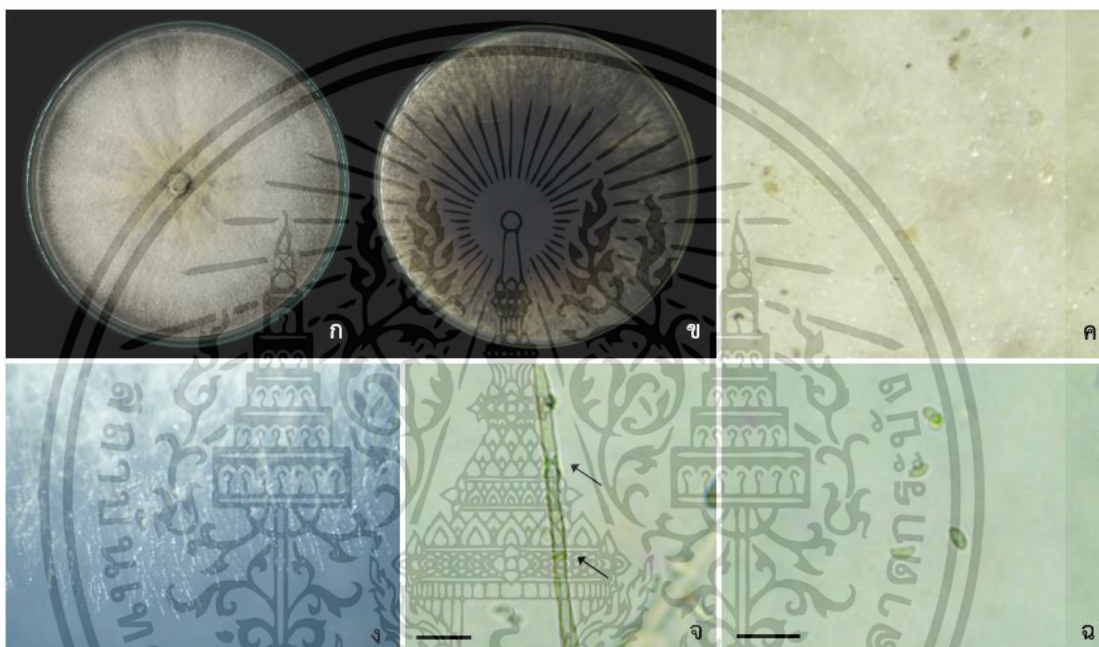
รูปที่ 4.23 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-122 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) ผนังกันเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-123

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีขาวถึงน้ำตาล

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบผนังกันเส้นใยและพบสปอร์รูปทรงรี ดังรูปที่ 4.24 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 85.87 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.24 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-123 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) ผนังกันเส้นใย (ฉ) สปอร์

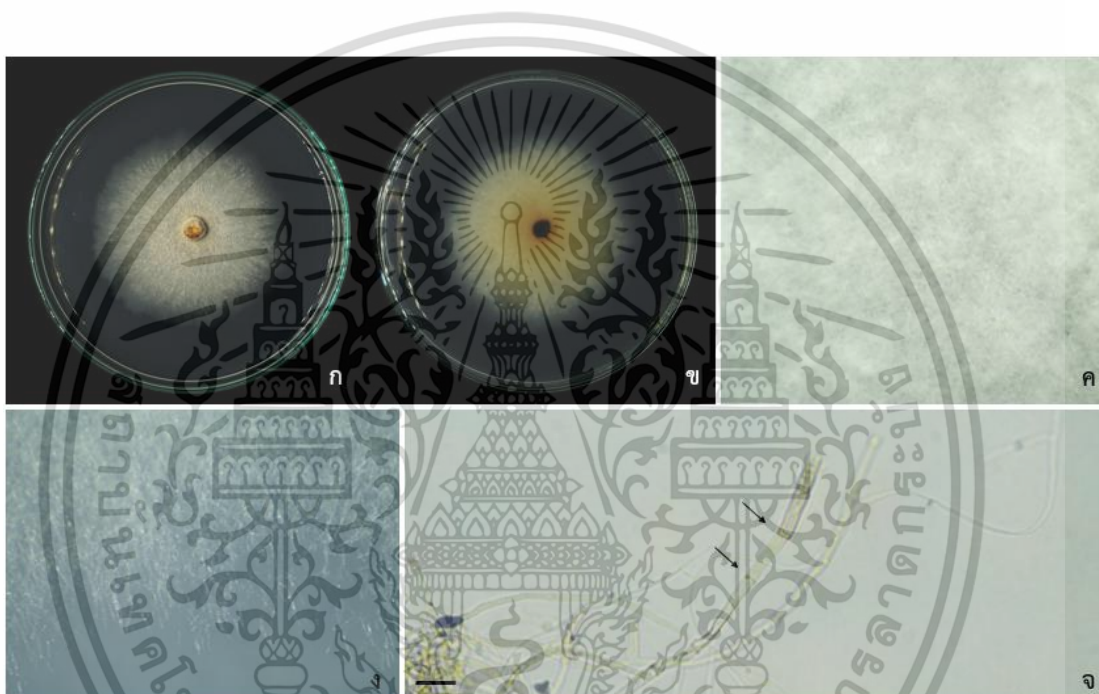
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-124

โคโลนีสบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นผิวหน้าแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ มีลักษณะขอบหยักและโค้งเว้าเล็กน้อย กลุ่มเส้นใยมีสีขาว และพบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาล

เมื่อนำโคโลนีสบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบผนังกันเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.25 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 29.70 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



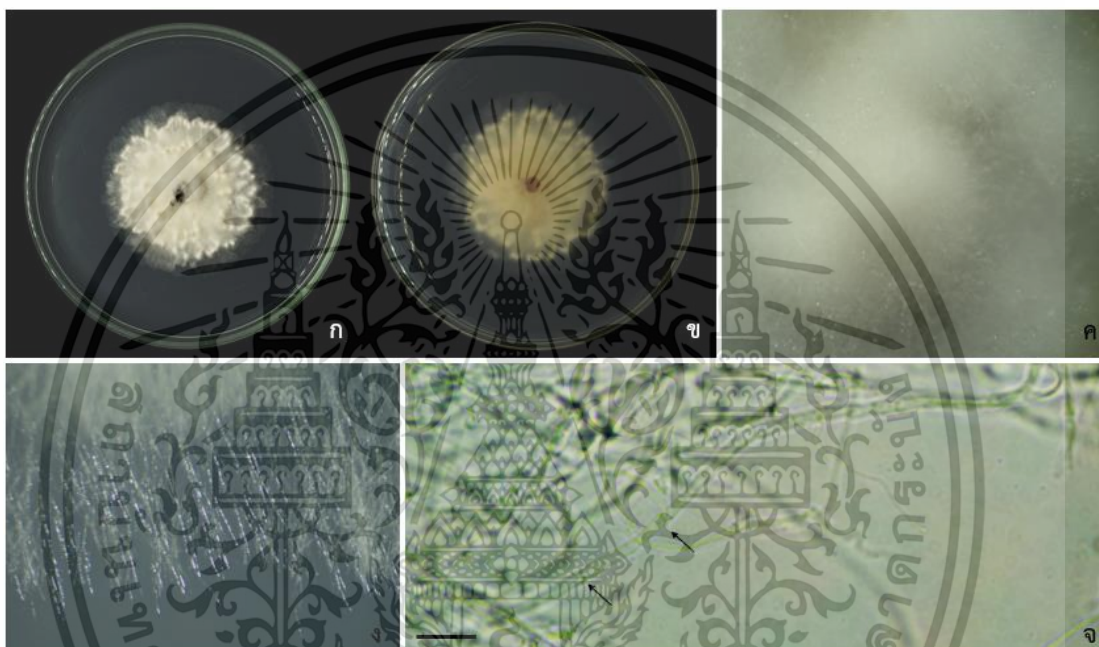
รูปที่ 4.25 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-124 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) เส้นใยมีผนังกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-125

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีผิวหน้าเกลี้ยงแต่เป็นลูกคลื่น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะยกขึ้นจากผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักขนาบกัน (Curled) กลุ่มเส้นใยมีสีขาว

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบผนังกันเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.26 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 28.00 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.26 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-125 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) เส้นใยมีผนังกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-126 (สกุลที่คาดการณ์ คือ *Fusarium* sp.)

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งงูขึ้นจากผิวหน้าอาหาร และมีปุ่มตรงกลาง รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบเป็นเส้นสาย กลุ่มเส้นใยมีสีขาวไปถึงเหลือง

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบสปอร์รูปทรงพระจันทร์เสี้ยว ดังรูปที่ 4.27 จากลักษณะสัณฐานวิทยานี้สามารถคาดการณ์ได้ว่าเชื้อรานี้มีสกุล *Fusarium* sp.

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 58.58 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



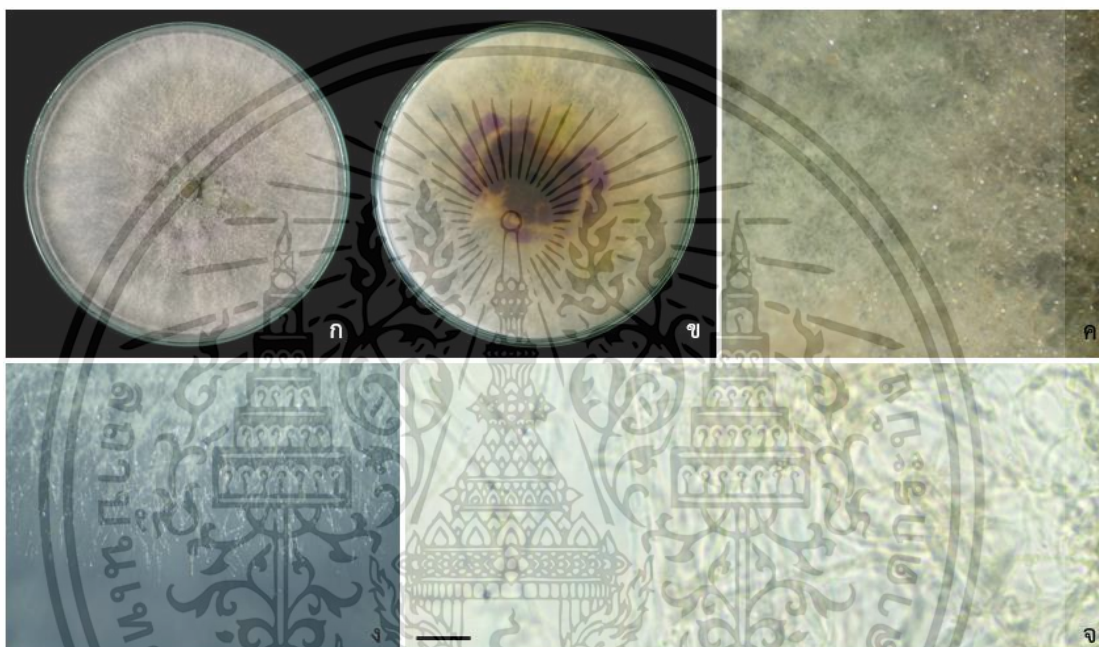
รูปที่ 4.27 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-126 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) สปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-127

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีผิวหน้าแบบเรียบ การยกตัวของโคโลนี มีลักษณะแบนราบ รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างเป็นเส้นสาย ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบคล้ายราก กลุ่มเส้นใยมีสีม่วง เชี่ยวไปถึงขาว

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบกลุ่มเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.28 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 53.25 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.28 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-127 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) กลุ่มของเส้นใย

ไอโซเลท 22-128

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร และมีปุ่มตรงกลาง รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีน้ำตาลไปถึงขาว

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบผนังกันเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.29 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 17.30 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



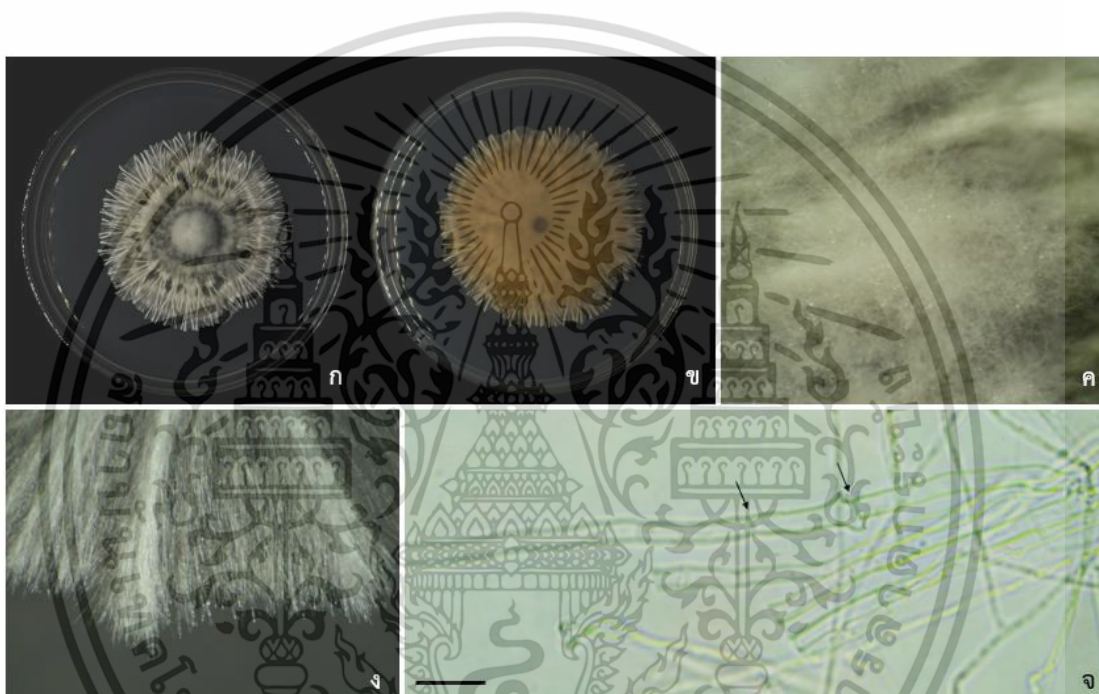
รูปที่ 4.29 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-128 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) เส้นใยมีผนังกัน

ไอโซเลท 22-129

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะโค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร และมีปุ่มตรงกลาง รูปร่างโคโลนี มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ มีลักษณะขอบหยัก และโค้งเว้าเล็กน้อย (Undulate) กลุ่มเส้นใยมีสีขาวไปถึงสีดำ

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบผนังกันเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.30 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้

และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 30.55 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)



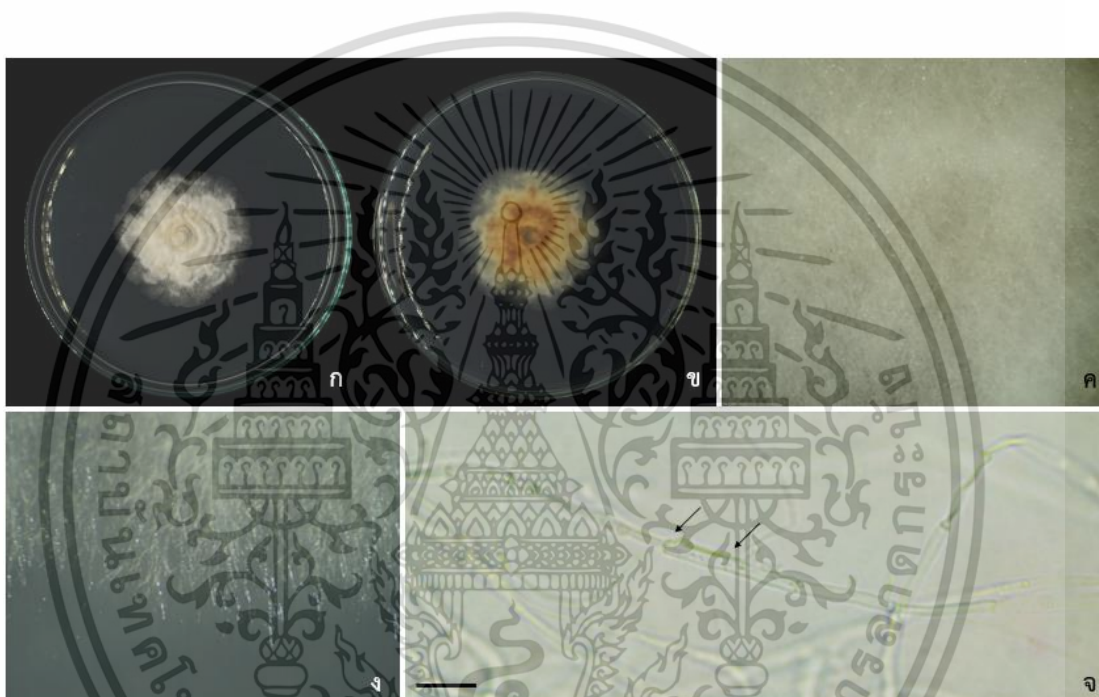
รูปที่ 4.30 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-129 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) เส้นใยมีผนังกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท 22-130

โคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีผิวหน้าเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น และขรุขระ (Rough) การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะยกขึ้นจากอาหารเล็กน้อย รูปร่างโคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ขอบโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีลักษณะขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ กลุ่มเส้นใยมีสีขาว

เมื่อนำโคโลนีบน PDA มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวตั้ง พบผนังกันเส้นใยและไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 4.31 จากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถคาดการณ์สกุลเชื้อราได้ และมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 4 เท่ากับ 19.22 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1)

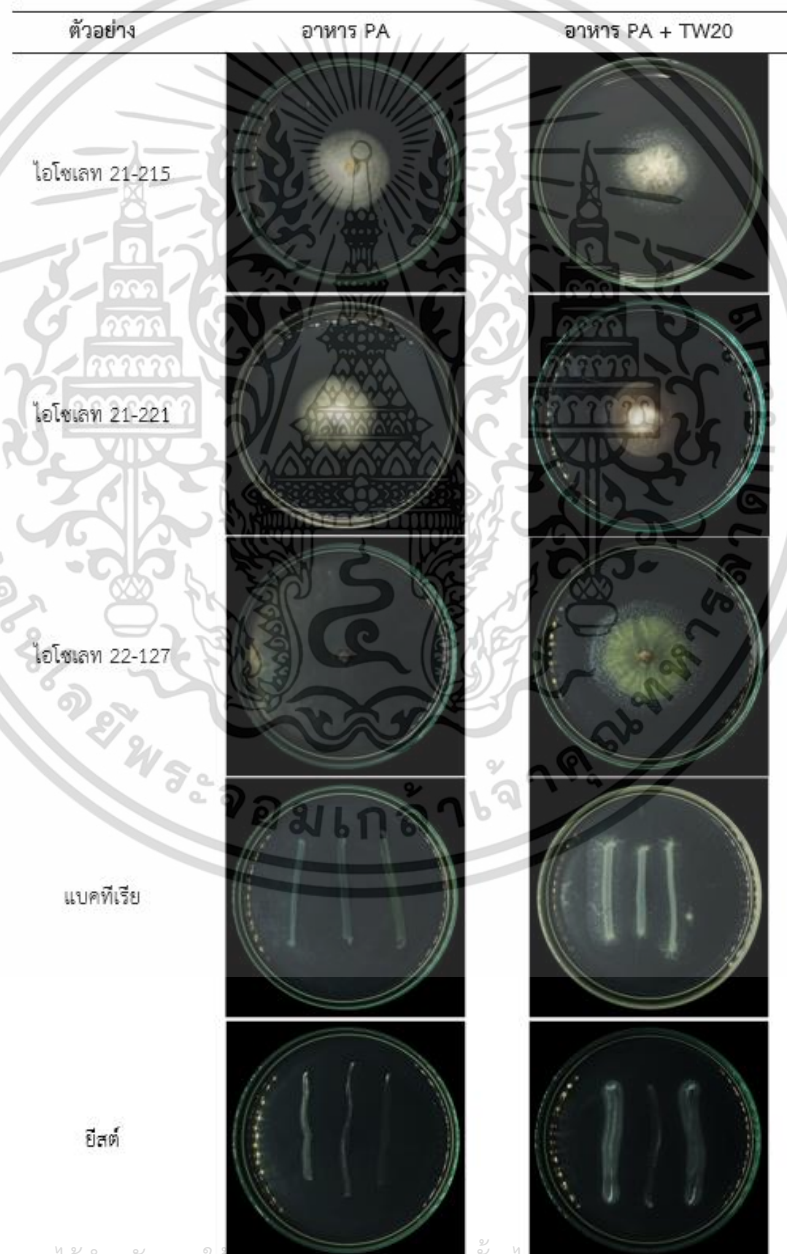


รูปที่ 4.31 ลักษณะเชื้อราไอโซเลท 22-130 (ก-ข) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (ค) ผิวหน้าโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ขอบโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (จ) เส้นใยมีผนังกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตไลเปส

พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Peptone agar + Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (PA + TW 20) จะเกิดการสร้างตะกอนสีขาวบริเวณรอบโคโลนี (รูปที่ 4.32) ซึ่งตะกอนสีขาวนี้เกิดจากเอนไซม์ไลเปสย่อย Tween 20 ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้เป็นเกล็ดของกรดไขมัน ซึ่งเกล็ดของกรดไขมันสามารถเข้าไปจับกับไอออนของแคลเซียมที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มองเห็นเป็นตะกอนสีขาวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Amaral และคณะ (2022) Srinivas และคณะ (2013) และ Toghueo และคณะ (2017) ดังนั้นอาหาร PA + TW 20 จึงมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้คัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 รูปที่ 4.32 เปรียบเทียบการเกิดบริเวณการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น หากพบเห็นผิดเพี้ยนใดๆ กรุณาแจ้งไปยังกองส่งเสริมการนำใบใช้

ผลการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากทั้งหมด 30 ไอโซเลทบนอาหารเพาะเลี้ยงบนอาหาร PA + TW 20 พบว่าในวันที่ 7 นั้นมีการเจริญเติบโตเต็มจานเพาะเลี้ยง (90 มิลลิเมตร) หรือโตเร็วสุดเพียง 2 ไอโซเลท คือ 21-212 และ 22-116 และไอโซเลทที่เจริญเติบโตช้าสุด คือ 22-113 และพบว่ามีเพียง 9 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ คือ 21-215, 21-221, 22-110, 22-111, 22-112, 22-113, 22-124, 22-127 และ 22-128 (ตารางที่ 4.2) และในการศึกษาครั้งนี้เมื่อแบ่งกลุ่มเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสคำนวณตามดัชนีเอนไซม์ของ Amaral และคณะ (2022) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มผู้ผลิตที่แย่ (Weak producer) คือ มีค่าดัชนีเอนไซม์น้อยกว่า 1 มีทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ 21-221, 22-110, 22-111 และ 22-112

กลุ่มผู้ผลิตทั่วไป (Moderate producer) คือ มีค่าดัชนีเอนไซม์อยู่ระหว่าง 1 ถึง 2 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลท คือ 21-215, 22-113, 22-124, 22-127 และ 22-128

ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่พบกลุ่มผู้ผลิตที่ดี (Good producer) คือ มีค่าดัชนีเอนไซม์มากกว่า 2 (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลทที่มีค่าดัชนีเอนไซม์สูงสุดสองลำดับแรก คือ 22-115 และ 22-124 โดยมีค่าเฉลี่ยของดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 1.73 ± 0.05 และ 1.73 ± 0.09 ตามลำดับ ไประบุสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) เนื่องจากว่าเป็นไอโซเลทที่ไม่สามารถคาดการณ์สกุลจากการระบุสายพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นได้

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลทเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหาร Peptone agar + Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (PA + TW 20)

ไอโซเลท	สกุลที่ คาดการณ์	ค่าเฉลี่ยการเจริญ วันที่ 7 (มิลลิเมตร)	บริเวณการเกิดเอนไซม์ ไลเปส (มิลลิเมตร)	ดัชนีเอนไซม์
21-211		83.65±3.77	-	-
21-212		90.00±0.00	-	-
21-221	<i>Aspergillus</i> sp. ¹	37.35±0.46	29.55±0.57	0.79±0.02
22-108		76.88±4.95	-	-
22-114		70.37±6.02	-	-
22-120		50.55±2.94	-	-
21-219	<i>Fusarium</i> sp. ¹	34.25±3.18	-	-
22-126		85.97±1.66	-	-
21-215	<i>Periconia</i> sp. ²	45.60±0.55	26.38±0.46	1.73±0.05
22-124	<i>Xylaria</i> sp. ²	23.92±0.97	41.32±0.45	1.73±0.09

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของสถาบันการศึกษานี้ การนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตให้ถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลทเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหาร Peptone agar + Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (PA + TW 20) (ต่อ)

ไอโซเลท	สกุลที่ คาดการณ์	ค่าเฉลี่ยการเจริญ วันที่ 7 (มิลลิเมตร)	บริเวณการเกิดเอนไซม์ ไลเปส (มิลลิเมตร)	ดัชนีเอนไซม์
21-218	ไม่สามารถระบุได้	59.58±0.90	-	-
21-219	ไม่สามารถระบุได้	34.25±3.18	-	-
21-220	ไม่สามารถระบุได้	31.97±0.84	-	-
22-109	ไม่สามารถระบุได้	79.47±7.64	-	-
22-110	ไม่สามารถระบุได้	38.33±1.10	36.78±3.78	0.96±0.13
22-111	ไม่สามารถระบุได้	56.60±0.49	40.68±0.74	0.72±0.02
22-112	ไม่สามารถระบุได้	84.00±0.56	36.12±1.59	0.43±0.02
22-113	ไม่สามารถระบุได้	11.83±0.08	16.95±1.14	1.43±0.11
22-115	ไม่สามารถระบุได้	23.65±0.57	-	-
22-116	ไม่สามารถระบุได้	90.00±0.00	-	-
22-117	ไม่สามารถระบุได้	19.92±1.23	-	-
22-118	ไม่สามารถระบุได้	59.80±1.04	-	-
22-119	ไม่สามารถระบุได้	73.08±1.82	-	-
22-121	ไม่สามารถระบุได้	84.35±1.45	-	-
22-122	ไม่สามารถระบุได้	77.88±1.49	-	-
22-123	ไม่สามารถระบุได้	85.20±1.15	-	-
22-125	ไม่สามารถระบุได้	51.98±0.12	-	-
22-127	ไม่สามารถระบุได้	36.98±1.76	50.27±0.53	1.36±0.08
22-128	ไม่สามารถระบุได้	19.70±0.13	28.33±0.74	1.44±0.05
22-129	ไม่สามารถระบุได้	44.10±0.09	-	-
22-130	ไม่สามารถระบุได้	25.83±0.98	-	-

หมายเหตุ : ¹ ระบุสายพันธุ์โดยการคาดการณ์จากลักษณะสัณฐานวิทยา, ² ระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

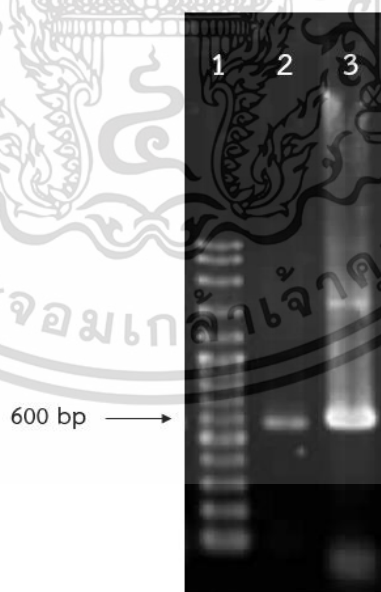
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่ผลิตไลเปส

พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ (Primer) ITS5 และ ITS4 ของเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 ไอโซเลท (21-215 และ 22-124) มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4.33) และเมื่อนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไป BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่าไอโซเลท 21-215 คือ สกุล *Periconia* ที่มีร้อยละความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.83 และไอโซเลท 22-124 คือสกุล *Xylaria* ที่มีร้อยละความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.34

จากงานวิจัยของ Knapp และคณะ (2018) ที่ได้คัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากบริเวณท่งหญ้ากึ่งแห้งแล้ง และพบว่าโปรตีนที่หลั่งออกจากเชื้อรา *Periconia macrospinoso* มีลำดับโปรตีนตรงกับเอนไซม์ไลเปส และขนาดของบริเวณตะกอนสีขาวของเชื้อรา *Periconia* sp. ไอโซเลท 21-215 ที่มีขนาด 26.38 ± 0.46 มิลลิเมตร มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hassan และคณะ (2017) ที่คัดเลือกการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราจากธารน้ำแข็ง และพบว่าเชื้อรา *Periconia* sp. KF907244.สามารถสร้างบริเวณที่เกิดตะกอนสีขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 12 มิลลิเมตร

และจากผลการทดลองของเชื้อราสกุล *Xylaria* ไอโซเลท 22-124 ที่มีดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 1.73 ± 0.09 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรวิรัตน์ และคณะ (2562) ที่แยกเชื้อรา *Xylaria* sp. CfS-02 จากต้นกะเหรี่ยงร่อนปากเปิด (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) มีดัชนีเอนไซม์ของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 1.77 ± 0.06



รูปที่ 4.33 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) บนเจลอะกาโรส โดยช่อง (Lane) ที่ 1 คือ เครื่องหมายโมเลกุลขนาด 100 คู่เบส ช่องที่ 2 คือ ไอโซเลทที่ 21-215 ช่องที่ 3 คือ ไอโซเลทที่ 21-124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นทั้งหมด 30 ไอโซเลท สามารถคาดการณ์สกุล (Genus) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) เบื้องต้น ได้ทั้งหมด 2 สกุล คือ *Aspergillus* และ *Fusarium* และกลุ่มที่ไม่สามารถคาดการณ์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้มี 22 ไอโซเลท และจากการศึกษาการเจริญเติบโตบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ในวันที่ 4 พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* ไอโซเลท 22-114 มีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตเร็วที่สุด และเชื้อรา *Periconia* ไอโซเลท 21-215 มีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตช้าที่สุด

อาหาร Peptone agar + Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (PA + TW 20) นั้นมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้คัดเลือกหาเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ และพบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นทั้ง 30 ไอโซเลทนั้นมีเพียง 9 ไอโซเลท คือ 21-215, 21-221, 22-110, 22-111, 22-112, 22-113, 22-124 และ 22-127 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยในการศึกษานี้พบว่าไอโซเลท 21-215 และไอโซเลท 22-124 มีค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด แต่จัดอยู่ในกลุ่มผู้ผลิตทั่วไป (Moderate producer) และเมื่อนำมาระบุสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า คือ เชื้อราสกุล *Periconia* และ *Xylaria* ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้นควรมีการใช้อาหารสำหรับทดสอบที่มีซับสเตรทชนิดอื่นด้วย เช่น Tween 80 เป็นซับสเตรท หรืออาหารแข็งฟีนอลเรด (Phenol red) ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรทสำหรับเอนไซม์ไลเปส ที่อาศัยการเปลี่ยนสีของฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ในช่วงระหว่าง 6.8 ที่มีสีเหลือง เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับซับสเตรทที่ต่างกัน

5.2.2 ควรนำไอโซเลทที่คัดเลือกมาได้นั้นไปเปรียบเทียบกับเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งอื่น ๆ เช่น คัดแยกเชื้อราจากแหล่งที่มีการสะสมของไขมัน เพื่อคัดเลือกหาไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดี

5.2.3 ควรวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่งอื่น ๆ นอกจากบริเวณ ITS เช่น Beta-tubulin และ Large-subunit (LSU) ribosomal DNA (rDNA) เพื่อระบุเชื้อราในระดับสายพันธุ์ (Species)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. 2561. คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากบ่อดักไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับชุมชน.

กลุ่มงานพฤกษศาสตร์ป่าไม้. 2018. 20. *Crotalaria medicaginea* Lam. <https://botany.dnp.go.th/flora/floraspecies.html?tdcode=07481>

กิจจา จิตรภิมรย์, และ ปธานิน แสงอรุณ. 2555. การตรวจหาแบคทีเรียย่อยไขมันจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม. วารสารทางสาธารณสุขศาสตร์. 42(3): 3–18.

ธนารักษ์ จัทรประสิทธิ์, นฤมล ตั้งธีระสุนันท์, และ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2022. สำนวนความหลากหลายเบื้องต้นของพันธุ์พืช และเชื้อราในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี. <https://wjst.wu.ac.th/index.php/stssp>

ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง, ธีระชัย ธนानันต์, นิรมล ศากยวงศ์, และ สายัณห์ สมฤทธิ์ผล. 2557. การจำแนกราดด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์ และความสามารถในการบำบัดสีรีแอกทีฟ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(5): 683–694.

วรรัตน์ คะหะปะนะ, คทาวุธ โสภากุล, วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์, อัญลักษณ์ วชิรไชยการ, และ ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม. 2562. การแยกและการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ป่า 8 ชนิด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 8(1): 40–53.

Ayinla, Z. A., Ademakinwa, A. N., and Agboola, F. K. 2017. Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus* sp. ZAC3 Isolated from the Contaminated Soil of a Palm Oil Processing Shed. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/jabb.2017.50205>

Ayorinde, F. O., Gelain, S. V., Johnson, J. H., and Wan, L. W. 2000. Analysis of some commercial polysorbate formulations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 14(22): 2116–2124. [https://doi.org/10.1002/1097-0231\(20001130\)14:22<2116::AID-RCM142>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-0231(20001130)14:22<2116::AID-RCM142>3.0.CO;2-1)

Ball, D. W., Hill, J. W., and Scott, R. J. 2023. THE BASICS OF GOB CHEMISTRY LibreTexts. <https://LibreTexts.org>

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., and Kausrud, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/189>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bezerra, J. D. P., Nascimento, C. C. F., Barbosa, R. do N., da Silva, D. C. V., Svedese, V. M., Silva-Nogueira, E. B., Gomes, B. S., Paiva, L. M., and Souza-Motta, C. M. 2015. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(1): 49–57. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130657>

Bhadra, F., Gupta, A., Vasundhara, M., and Reddy, M. S. 2022. Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. *3 Biotech* 12(4): 86. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03145-y>

Bogas, A. C., Cruz, F. P. N., Lacava, P. T., and Sousa, C. P. 2022. Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. *Brazilian Journal of Biology*. 84: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>

Bruns, T. D., Lee, S. B., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics acid phosphatase 315-322. NFSTC lecture View project EPICON View project. <https://www.researchgate.net/publication/262687766>

Chamekh, R., Deniel, F., Donot, C., Jany, J. L., Nodet, P., and Belabid, L. 2019. Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebkh of Oran in Northwestern of Algeria. *Mycobiology*. 47(2): 230–241. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1623979>

Chandra, P., Enespa, Singh, R., and Arora, P. K. 2020. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*. 19: 1-42. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>

de Olivera Amaral, A., e Ferreira, A. F. T. A. F., and da Silva Bentes, J. L. 2022. Fungal endophytic community associated with *Hevea* spp.: diversity, enzymatic activity, and biocontrol potential. *Brazilian Journal of Microbiology*. 53(2): 857–872. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00709-1>

Doyle, J. J., and Doyle Jane L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19(1): 11–15.

El Aamri, L., Hafidi, M., Scordino, F., Krasowska, A., Lebrihi, A., Orlando, M. G., Barresi, C., Criseo, G., Barreca, D., and Romeo, O. 2020. *Arthrographis curvata* and *Rhodospiridium babjevae* as new potential fungal lipase producers for biotechnological

applications. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 63: 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020180444>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบให้ทางโครงการงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้จัดทำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นผู้ใดไม่ได้รับอนุญาตให้เผยแพร่เนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., and Petersen, S. B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*. 82(11): 1033–1041. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01188-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01188-3)

Geoffry, K., and Achur, R. N. 2017. A novel halophilic extracellular lipase with both hydrolytic and synthetic activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12: 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.012>

Gopinath, S. C. B., Anbu, P., LakshmiPriya, T., and Hilda, A. 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Research International* 2013: <https://doi.org/10.1155/2013/154549>

Green, M. R., and Sambrook, J. 2019. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019(6): 436–456. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>

Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., Nadeem, S., Shah, A. A., and Hasan, F. 2017. Potential of psychrotrophic fungi isolated from Siachen glacier, Pakistan, to produce antimicrobial metabolites. *Applied Ecology and Environmental Research*. 15(3): 1157–1171. https://doi.org/10.15666/aeer/1503_11571171

Huey, C. J., Gopinath, S. C. B., Uda, M. N. A., Zulhaimi, H. I., Jaafar, M. N., Kasim, F. H., and Yaakub, A. R. W. 2020. Mycorrhiza: a natural resource assists plant growth under varied soil conditions. *3 Biotech* 10(5): Springer. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02188-3>

Kadri, K. 2020. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>

Katoch, M., Salgotra, A., and Singh, G. 2014. Endophytic fungi found in association with *Bacopa monnieri* as potential producers of industrial enzymes and antimicrobial bioactive compounds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57(5): 714–722. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402502>

Kee, Y. J., Zakaria, L., and Mohd, M. H. 2020. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* species from *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Plant Pathology*. 69(3): 442–454. <https://doi.org/10.1111/ppa.13138>

Knapp, D. G., Németh, J. B., Barry, K., Hainaut, M., Henrissat, B., Johnson, J., Kuo, A., Lim, J. H. P., Lipzen, A., Nolan, M., Ohm, R. A., Tamás, L., Grigoriev, I. V., Spatafora, J. W., Nagy, L. G., and Kovács, G. M. 2018. Comparative genomics provides insights into

the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific Reports*. 8(1): <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24686-4>

Kouker, G., and Jaeger, K.-E. 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 53(1): 211-213.

Kumar, V., and Prasher, I. B. 2012. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166(2): 486–520. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3>

Kumar, V., and Prasher, I. B. 2022. Seasonal variation and tissues specificity of endophytic fungi of *Dillenia indica* L. and their extracellular enzymatic activity. *Archives of Microbiology*. 204(6): 341 <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02933-7>

Lanka, S., and Latha, J. N. L. 2015. A short review on various screening methods to isolate potential lipase producers: Lipases-the present and future enzymes of biotech industry. *International Journal of Biological Chemistry*. 9(5): 207–219. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.207.219>

Maheaswari, R., Kshirsagar, J., and Lavanya, N. 2016. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 20(2): 128. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.176391>

Manasa, A., Moutsis, S., Mendez, D., Kiranmayee, P., and Prasannakumar, M. 2021. Phytochemical distribution, antimicrobial activity, enzyme production of phylogenetically differentiated endophytes from *Solanum violaceum* Ortega fruits. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*. 11(1): 210–229. <https://doi.org/10.5943/cream/11/1/16>

Martin, K. J., and Rygiewicz, P. T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*. 5(1): <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>

Messaoudi, A., Belguith, H., Gram, I., and Hamida, J. Ben. 2010. Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology*. 9(48): 8243–8247. <https://doi.org/10.5897/ajb10.721>

Mohammed Al Fayaad, D. B., Husein, Z. S., and Khudhair, S. H. 2020. Isolation and Screening of Filamentous Fungi and Study Their Ability to Produce Biodiesel. *Biochemical and Cellular Archives*. 20(2): 4653–4658.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mohsin, S., Islam, Md. R., Faruq, A., Nisha, H., Borna, R., and Islam, M. N. 2016. THE GENETIC VARIABILITY OF ALTERNARIA PORRI IN BANGLADESH. ROMANIAN JOURNAL OF BIOLOGY PLANT BIOLOGY. 59–60: 47–57.

Naranjo-Ortiz, M. A., and Gabaldón, T. 2019. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*. 94(6): 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>

Narasimhan, V., and Valentin, B. B. 2015. Screening of Extracellular Lipase releasing Microorganisms Isolated from vegetable oil contaminated soil for Bio-Diesel production SCREENING OF EXTRACELLULAR LIPASE RELEASING MICROORGANISMS ISOLATED FROM SUNFLOWER VEGETABLE OIL CONTAMINATED SOIL FOR BIO-DIESEL PRODUCTION. Article in *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 8(2): 477-430. <https://www.researchgate.net/publication/274050866>

Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., and Colpaert, J. V. 2014. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE*. 9(6): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>

Peraza-Jiménez, K., De la Rosa-García, S., Hujara-Vasconcelos, J. J., Reyes-Estebanez, M., and Gómez-Cornelio, S. 2022. Enzymatic Bioprospecting of Fungi Isolated from a Tropical Rainforest in Mexico. *Journal of Fungi*. 8(1): <https://doi.org/10.3390/jof8010022>

Pöggeler, S., Nowrousian, M., and Kück, U. 2006. Fruiting-Body Development in Ascomycetes. *Growth, Differentiation and Sexuality* Springer-Verlag. 325–355. https://doi.org/10.1007/3-540-28135-5_16

PubChem. 2023. Phenol red C19H14O5S - PubChem.[Online] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol-red>

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products* American Chemical Society. 80(3): 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>

Ramnath, L., Sithole, B., and Govinden, R. 2017. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*. 15: 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.004>

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เมื่อผู้ดูแลระบบได้รับแจ้งให้ทราบ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rodrigues, C., Cassini, S. T. A., Antunes, P. W. P., Pinotti, L. M., de Pinho Keller, R., and Gonçalves, R. F. 2016. Lipase-producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production. *African Journal of Biotechnology*. 15(18): 759– 767. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14666>

Sadati, R., Barghi, A., and Larki, R. A. 2015. Isolation and screening of lipolytic fungi from coastal waters of the southern Caspian sea (North of Iran). *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(4): [https://doi.org/10.5812/jjm.8\(4\)2015.16426](https://doi.org/10.5812/jjm.8(4)2015.16426)

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., and Frisvad, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78(1): 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>

Sunitha, V. H., Devi, D. N., and Srinivas, C. 2013. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. *World Journal of Agricultural Sciences*. 9(1): 1–9. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148>

Tangthirasunun, N., and Poeaim, S. 2022. studies on the Rapid and simple DNA extraction Method, Antibacterial Activity and enzyme Activity involved in Plant Biomass Conversion by *Cookeina sulcipes* and *C. tricholoma* (Cup Fungi). *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 16(4): 2851–2863. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.58>

Tangthirasunun, N., Silar, P., Bhat, D. J., Chukeatirote, E., Nalin Wijayawardene, D. N., Maharachchikumbura, S. S. N., and Hyde, K. D. 2014. Morphology and phylogeny of *Pseudorobillarda eucalypti* sp. nov., from Thailand. *Phytotaxa*. 176(1): 251–259. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.176.1.24>

Toghueo, R. M. K., Zabalgozeazcoa, I., Vázquez de Aldana, B. R., and Boyom, F. F. 2017. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. *South African Journal of Botany*. 109: 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.021>

Triyaswati, D., and Ilmi, M. 2020. Lipase-producing Filamentous Fungi from Non-dairy Creamer Industrial Waste. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 48(2): 167–178. <https://doi.org/10.4014/mbl.1912.12018>

Ungcharoenwivat, P., and Sakayaroj, J. 2022. Species Composition and Hydrolase Enzyme (EC.3) Activity of Fungi Isolated from Thasala Mangroves, Nakhon Si Thammarat

Province, Southern Thailand. *Trends in Sciences*. 19(19): 1672 <https://doi.org/10.48048/tis.2022.6172>

Viebahn, M., Veenman, C., Wernars, K., Van Loon, L. C., Smit, E., and Bakker, P. A. H. M. 2005. Assessment of differences in ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat and potato. *FEMS Microbiology Ecology*. 53(2): 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.12.014>

Walker, J. M., and Sandoval, G. 2012. *Lipases and Phospholipases Methods and Protocols*. <http://www.springer.com/series/7651>

Wingfield, L. K., and Atcharawiriyakul, J. 2021. View of Evaluation of simple and rapid DNA extraction methods for molecular identification of fungi using the ITS regions. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*. 26(02): 1–7.

Zanotto, S. P., Romano, I. P., Lisboa, L. U. S., Duvoisin, S., Martins, M. K., Lima, F. A., Silva, S. F., and Albuquerque, P. M. 2009. Potential Application in Biocatalysis of Mycelium-Bound Lipases from Amazonian Fungi. *J. Braz. Chem. Soc* 20(6):1046-1059

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

ประกอบด้วย

มันฝรั่งหั่นขนาด 1 x 1 x 1 เซนติเมตร	200 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Agar	6 กรัม

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรองเอามันฝรั่งออกปรับปริมาตรน้ำต้มมันฝรั่งให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ Dextrose ลงไปแล้วคนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหาร PDA เติมน้ำตาล ลงไปในอาหาร 15 กรัม

2. อาหาร Peptone agar + Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1

ประกอบด้วย

Peptone	10 กรัม
NaCl	5 กรัม
CaCl ₂	0.1 กรัม
Tween 20	10 มิลลิลิตร
Agar	20 กรัม

ละลาย Peptone, NaCl, CaCl₂ กับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ประมาณ 6.6 โดยใช้ 5N HCl จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที พร้อมกับ Tween 20 สำหรับอาหาร Peptone ไม่ต้องใส่ Tween 20

3. Nutrient agar (NA)

ประกอบด้วย

Nutrient agar สำเร็จรูป	28 กรัม
-------------------------	---------

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient broth (NB)

ประกอบด้วย

Nutrient broth สำเร็จรูป	13 กรัม
--------------------------	---------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ของห้องปฏิบัติการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast Malt medium (YM)

ประกอบด้วย

Yeast extract	3 กรัม
Malt extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Glucose	10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดกับน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. 10 mM TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

1 M Tris-HCl (pH8)	10 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH8)	2 มิลลิลิตร

นำ 1 M Tris-HCl (ปรับค่าความเป็นกรดต่าง 8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 M EDTA (ปรับค่าความเป็นกรดต่าง 8) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA)

ไอโซเลข	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร) บนอาหาร PDA				
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 7
21-211	11.57	25.65	79.22	90.00	90.00
21-212	11.30	26.58	69.12	90.00	90.00
21-215	8.25	12.67	15.55	16.63	16.63
21-218	10.57	19.45	22.17	25.60	30.53
21-219	4.85	6.92	23.00	34.23	37.52
21-220	12.75	23.47	42.00	58.60	67.52
21-221	8.93	13.92	28.50	39.35	45.18
22-108	5.07	19.07	68.12	90.00	90.00
22-109	5.30	14.28	56.73	90.00	90.00
22-110	5.85	13.10	28.33	44.70	51.35
22-111	12.65	27.33	59.32	87.45	90.00
22-112	12.00	26.33	54.08	77.32	85.28
22-113	6.15	9.13	16.85	31.98	35.90
22-114	7.47	25.10	83.53	90.00	90.00
22-115	5.50	9.32	22.48	39.90	45.62
22-116	6.82	21.92	81.40	90.00	90.00
22-117	5.42	7.43	13.62	17.48	19.97
22-118	9.88	18.60	32.58	45.20	52.70
22-119	15.23	34.93	81.17	90.00	90.00
22-120	11.27	26.63	65.98	90.00	90.00
22-121	9.72	24.10	55.28	73.97	84.02
22-122	5.83	14.87	42.72	76.53	90.00
22-123	9.97	21.50	55.28	85.87	90.00
22-124	5.82	10.28	29.70	53.10	61.47
22-125	6.65	13.23	28.00	41.08	50.68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น และไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ต่อ)

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร) บนอาหาร PDA				
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 7
22-126	10.72	26.25	58.58	78.90	90.00
22-127	7.18	15.82	53.25	90.00	90.00
22-128	6.60	9.82	17.30	24.55	26.63
22-129	7.47	12.78	30.55	49.97	58.18
22-130	5.93	8.78	19.22	32.85	38.15



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหาร Peptone agar + Tween 20 ร้อยละ 1 (PA + TW 20)

ไอโซเลข	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร) บนอาหาร PDA				
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 7
21-211	5.80	14.60	36.25	64.87	83.65
21-212	4.68	10.72	41.82	76.32	90.00
21-215	4.92	6.68	15.00	19.57	26.38
21-218	10.58	15.95	33.60	49.70	59.58
21-219	5.58	8.50	14.83	27.03	34.25
21-220	7.83	9.83	14.52	29.17	31.97
22-108	4.97	10.87	35.12	62.23	76.88
22-109	4.72	8.75	31.52	57.53	79.47
22-110	6.30	8.35	18.13	32.67	38.33
22-111	9.15	15.93	33.33	48.02	56.6
22-112	10.63	21.97	47.95	74.00	84.00
22-113	5.67	5.67	7.98	9.58	11.83
22-114	6.97	12.52	35.40	58.40	70.37
22-115	6.62	8.07	15.20	23.00	23.65
22-116	6.70	12.05	44.00	83.60	90.00
22-117	4.70	6.82	11.47	16.67	19.92
22-118	8.22	15.63	35.63	52.40	59.80
22-119	6.48	14.68	39.12	61.38	73.08
22-120	5.28	10.88	25.92	43.48	50.55
22-121	7.25	20.55	46.73	74.43	84.35
22-122	6.42	15.15	42.27	67.83	77.88
22-123	5.23	11.87	40.90	73.40	85.20
22-124	5.07	6.02	13.62	21.30	23.92
22-125	5.20	7.35	24.87	45.12	51.98
22-126	8.82	20.80	48.55	75.5	85.97
22-127	5.30	7.53	21.00	28.73	36.98
22-128	6.83	8.15	13.00	16.23	19.70
22-129	7.52	11.33	23.22	37.72	44.10
22-130	5.78	6.87	15.45	23.70	25.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น มิอนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การระบุสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

1. แสดงผล BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) จากฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อรา 21-215 ซึ่งคาดการณ์ว่าเป็นสายพันธุ์ *Periconia*

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Ascomycota sp. isolate 73i small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Ascomycota sp.	1075	1075	99%	0.0	99.66%	599	MZ270686.1
✓	Periconia sp. TMS-2011 voucher SC13d100p7-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Periconia sp. TM...	1075	1075	99%	0.0	99.66%	599	HQ631028.1
✓	Periconia sp. MYA04S03 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	Periconia sp.	1072	1072	98%	0.0	99.83%	584	LC431564.1
✓	Periconia macrospinoso strain WA0000019135 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Periconia macros...	1072	1072	99%	0.0	99.66%	587	JX981482.1
✓	Ascomycota sp. isolate 72i small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Ascomycota sp.	1072	1072	99%	0.0	99.66%	587	MZ270685.1
✓	Periconia sp. 1 TKPB-2017 strain FeF178a small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Periconia sp. 1 T...	1066	1066	98%	0.0	99.66%	583	MZ492966.1
✓	Periconia sp. strain J1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribo...	Periconia sp.	1064	1160	99%	0.0	99.32%	643	MH383204.1
✓	Periconia sp. strain NW-FVA3085 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Periconia sp.	1064	1160	99%	0.0	99.32%	644	MG098330.1
✓	Uncultured soil fungus clone 133-39 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	uncultured fungus	1062	1062	99%	0.0	99.32%	596	DQ420988.1
✓	Ascomycota sp. isolate 70i small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Ascomycota sp.	1062	1062	99%	0.0	99.32%	596	MZ270684.1

2. แสดงผล BLAST จากฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อรา 22-124 ซึ่งคาดการณ์ว่าเป็นสายพันธุ์ *Xylaria*

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Xylaria badia isolate RS4-S2-02 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	Xylaria badia	1088	1088	98%	0.0	99.34%	605	MN547374.1
✓	Xylaria badia isolate 95070101 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom...	Xylaria badia	1055	1055	96%	0.0	99.15%	586	GU322446.1
✓	Xylaria badia isolate DO26 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal trans...	Xylaria badia	1014	1014	91%	0.0	99.29%	571	KP050581.1
✓	Xylaria badia voucher HMJAU 22890 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Xylaria badia	1013	1013	95%	0.0	97.77%	582	JX256817.1
✓	Xylaria badia isolate A301 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ...	Xylaria badia	985	985	88%	0.0	99.45%	541	MK247679.1
✓	Xylaria badia strain 5351 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcr...	Xylaria badia	985	985	90%	0.0	98.91%	564	JQ862696.1
✓	Xylaria badia isolate YBY-F90 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr...	Xylaria badia	965	965	89%	0.0	98.72%	548	OP704173.1
✓	Xylaria sp. strain 5SA internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe...	Xylaria sp.	959	959	87%	0.0	99.25%	556	MH010588.1
✓	Xylaria acuta strain 5220 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcr...	Xylaria acuta	959	959	87%	0.0	99.25%	560	JQ862676.1
✓	Xylaria badia strain 5256 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcr...	Xylaria badia	957	957	86%	0.0	99.43%	565	JQ862687.1



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 8 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวนริศรา สกุลหงษ์ รหัสประจำตัว 62050504
นายบัญญัติ เลิศพฤกษ์สุกิจ รหัสประจำตัว 62050507

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่า
โครงการพิเศษ เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.) ที่ผลิต
เอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น

Preliminary of lipase production from endophyte fungi from *Crotalaria medicaginea* Lam.

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่น และได้ผ่านการตรวจสอบความ
ซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจาก
เล่มโครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.69%

ลงชื่อ นริศรา สกุลหงษ์
(นางสาวนริศรา สกุลหงษ์)
นักศึกษา

ลงชื่อ บัญญัติ เลิศพฤกษ์สุกิจ
(นายบัญญัติ เลิศพฤกษ์สุกิจ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการ
พิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึง
ลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ นฤมล ตั้งธีระสุนันท์
(ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้