

การจำแนกความแตกต่างของไรฝุ่นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในประเทศไทยด้วย
เทคนิค PCR-RFLP และผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายต่อไรฝุ่น,
Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart)

IDENTIFICATION OF IMPORTANT HOUSE DUST MITE SPECIES OF
THAILAND BY PCR-RFLP TECHNIQUE AND EFFECTIVENESS OF
BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ALGAE ON HOUSE DUST MITE
Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะศิลปศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตรกรรม

คณะเทคโนโลยีเกษตรกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMITL-2010-AG-M-401-066

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจำแนกความแตกต่างของไรฝุ่นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในประเทศไทยด้วย
เทคนิค PCR-RFLP และผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายต่อไรฝุ่น,

Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart)

IDENTIFICATION OF IMPORTANT HOUSE DUST MITE SPECIES OF
THAILAND BY PCR-RFLP TECHNIQUE AND EFFECTIVENESS OF
BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ALGAE ON HOUSE DUST MITE

Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart)



T117076

อภิญา สโมสร

APINYA SAMOSORN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วันเดือนปี.....

117076

23 ส.ย. 2554

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
KMITL-2010-AG-M-101-066

**IDENTIFICATION OF IMPORTANT HOUSE DUST MITE SPECIES OF
THAILAND BY PCR-RFLP TECHNIQUE AND EFFECTIVENESS OF
BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ALGAE ON HOUSE DUST MITE**

Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart)



APINYA SAMOSORN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในเท่านั้น กรุณาอย่าให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2010-AG-M-101-066



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณี **COPYRIGHT 2010** มิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การจำแนกความแตกต่างของไรฝุ่นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR-RFLP และผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายต่อไรฝุ่น, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart)

นักศึกษา

นางสาวอภิญา สโมสร

รหัสประจำตัว

51065808

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

พ. ศ.

2553

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผศ.ดร.อำมร อินทร์สังข์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รศ.นพ.ดร.เผด็จ สิริยะเสถียร

บทคัดย่อ

การจำแนกไรฝุ่นที่พบมากในประเทศไทย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart), *D. faninae* (Hughes) และ *Bromia tropicalis* (Bronswijk) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมบริเวณ Cytochrome Oxidase I (COI) อาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) หลังจากการทำปฏิกิริยาโพลิเมอเรส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์มีขนาดเดียวในสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. faninae* คือ 1500 bp แต่ *B. tropicalis* ไม่พบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาโพลิเมอเรสเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกัน จากข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ของ *D. pteronyssinus* และ *D. faninae* ที่ได้พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AluI* สามารถจำแนกไรฝุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้โดยให้รูปแบบ RFLP ที่แตกต่างกัน และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย 15 สกุล ที่สกัดด้วย methanol, hexane และ dichloromethane เพื่อควบคุมไรฝุ่น *D. pteronyssinus* พบว่าสารสกัดที่สกัดโดย methanol ออกฤทธิ์ในการฆ่าไรฝุ่นได้ดีที่สุด โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Sargassum* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina platensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และข้อมูลอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(animal feed), *S. platensis* (food grade) และ *Ulva intestinalis* มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้ดีคือ สามารถฆ่าไรฝุ่นตายมากกว่า 70% โดยที่ *Oscillatoria* sp. มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุดคือ $99.0 \pm 1.0\%$ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ *Phormidium* sp. และจากการนำสาหร่าย *Oscillatoria* sp. และ *Phormidium* sp. มาเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11ที่มีการผันแปรปริมาณไนโตรเจนและ ฟอสฟอรัส พบว่าสารสกัดจาก *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงในอาหารลด K_2HPO_4 เป็น 1/2 เท่า มี ประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุด แต่สารสกัดจาก *Phormidium* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตรปกติมี ประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และดัดแปลงอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Identification of important house dust mite species of Thailand by PCR-RFLP technique and effectiveness of bioactive compounds from algae on house dust mite, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart)
Student	Miss Apinya Samosorn
Student ID.	51065808
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2010
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Suneerat Ruangsomboon
Thesis Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Ammorn Insung
Thesis Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Padet Siriyasatien

ABSTRACT

Identification of three house dust mite (HDM) species found mostly in Thailand (*Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart), *D. farinae* (Hughes) and *Bromia tropicalis* (Bronswijk) by using the application of cytochrome oxidase I (COI) with Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique was investigated. The PCR yielded a single 1500 bp-sized amplicon in *D. pteronyssinus* and *D. farinae*, but did not appear in *B. Tropicalis*. *AluI* restriction enzyme predicted from the sequencing data provided different RFLP profiles among these two species. Effectiveness of bioactive compounds from 15 algae against *D. pteronyssinus* was also evaluated. All algae were extracted with methanol, hexane and dichloromethane. The result indicated that methanolic extract had the highest effectiveness on HDM. As extracts of *Sargassum* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade) and *Ulva intestinalis* could control HDM over 70%. *Oscillatoria* sp. had the greatest acaricidal effect of 99.0±1.0% mortality, which was not significantly different with *Phormidium* sp. ($p < 0.05$). Influence of nitrogen and phosphorus in culture medium

BG-11 of *Oscillatoria* sp. and *Phormidium* sp. for their expression of bioactive compounds in controlling HDM was performed. It indicated that extract of *Oscillatoria* sp. cultured in BG-11 media, which decreased K_2HPO_4 had the highest acaricidal efficacy. Whereas, as extracts of *Phormidium* sp. which was cultured in BG-11 had the highest acaricidal efficacy.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และตั้งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. สุนีรัตน์เรื่องสมบูรณ์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมงคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม คือ ผศ. ดร. อัมร อินทร์สังข์ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ รศ. นพ. ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี อีกทั้งยังตรวจสอบแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. อมรรัตน์ พรหมบุญ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เพื่อความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ประจำปี 2553 จากบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้กับข้าพเจ้า ขอขอบคุณนายจรศักดิ์ พุ่มนวน และนายแพทย์กนก พงุฒิวัดัญญู เป็นอย่างยิ่ง ที่ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับคุณพ่อ และคุณแม่ที่ให้การสนับสนุนเป็นกำลังใจอย่างยิ่งในการศึกษา และทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา ซึ่งประโยชน์และ คุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่านตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไปได้

อภิัญญา สโมสร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และตัว V อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญรูป.....	X
สารบัญตาราง.....	XII
รายการคำย่อ.....	XIV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	4
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	4
1.4 ระยะเวลาการทำงาน.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ชีวิตวิทยาของไรฝุ่น.....	5
2.2 ไรฝุ่นและความสำคัญทางการแพทย์.....	7
2.3 การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น.....	9
2.4 จีโนมไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome, mitochondrial DNA (mtDNA)).....	12
2.5 ความหลากหลายของจีโนมไมโทคอนเดรีย.....	13
2.6 คุณสมบัติของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียในการศึกษาวิวัฒนาการ.....	14
2.7 เทคนิคสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	15
2.8 การใช้สารเคมียับยั้งไรฝุ่น.....	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่เพื่อเผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และตั้งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds).....	25
2.10 ผลของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อปริมาณสารออกฤทธิ์.....	36
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	39
3.1 ตัวอย่างทดลอง.....	39
3.2 อุปกรณ์.....	39
3.3 สารเคมี (ภาคผนวก).....	40
3.4 วิธีการ.....	41
3.4.1 การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยเทคนิค RFLP-PCR.....	41
3.4.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA).....	41
3.4.1.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน COI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR).....	43
3.4.1.3 Sensitivity ของ <i>D. pteronyssinus</i> และ <i>D. faninae</i> ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR).....	45
3.4.1.4 การสกัดแยก DNA ออกจากอะกาโรสเจลและการทำให้บริสุทธิ์.....	46
3.4.1.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	46
3.4.1.6 การวิเคราะห์ความหลากหลายของไรฝุ่นด้วยวิธี PCR-RFLP.....	47
3.4.1.7 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence).....	48
3.4.2 ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายกลุ่มต่างๆ ในการกำจัดไรฝุ่น	50
3.4.2.1 วิธีการเลี้ยงไรฝุ่น.....	50
3.4.2.2 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย.....	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.2.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	50
3.4.2.4 การสกัดสาหร่าย.....	51
3.4.2.5 ทดสอบคุณสมบัติของการฆ่าไรฝุ่นโดยการสัมผัสในเบื้องต้น.....	51
3.4.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	52
3.4.3 ผลของปริมาณไนเตรตและฟอสฟอรัสต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย.....	52
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	53
4.1 ผลการเพิ่มปริมาณเชื้อยีส COI.....	53
4.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณเชื้อยีส COI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	53
4.1.2 ผล sensitivity ของ <i>D. pteronyssinus</i> และ <i>D. faninae</i> เมื่อ dilution DNA.....	54
4.1.3 ผลการทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้บริสุทธิ์.....	55
4.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายไรฝุ่นด้วยวิธี PCR-RFLP.....	56
4.3 ผลวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมไรฝุ่น.....	59
4.3.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence).....	59
4.3.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ของไรฝุ่น.....	59
4.4 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายต่อไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	61
4.4.1 ปริมาณสารสกัดหยาบ (crude extract) จากสาหร่าย 17 สกุล.....	61
4.4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก methanol ต่อไรฝุ่น.....	61
4.4.3 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก Hexane ต่อไรฝุ่น	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ VIII ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 วิจัยณ์ผลการทดลอง.....	75
5.1 การสกัด DNA จากไรฝุ่น.....	75
5.2 การทำ PCR-RFLP.....	75
5.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายต่อไรฝุ่น, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart).....	76
5.4 ปริมาณไนเตรตและฟอสฟอรัสต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย.....	81
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ.....	83
บรรณานุกรม.....	84
ภาคผนวก.....	91
ประวัติผู้เขียน.....	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และดัดแปลงอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ไรฝุ่นชนิด <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2
1.2	ไรฝุ่นชนิด <i>Dermatophagoides farinae</i>	2
2.1	ลักษณะตัวเต็มวัยของไรฝุ่น	6
2.2	ลักษณะวงจรชีวิตไรฝุ่นตั้งแต่ระยะไข่ถึงระยะตัวเต็มวัย.....	7
2.3	ลักษณะของจีโนมไมโทคอนเดรีย.....	13
2.4	ประกอบไปด้วยขั้นตอน denaturation, annealing และ extension.....	17
2.5	ไซยาโนแบคทีเรีย.....	28
2.6	<i>Oscillatoria</i> sp.....	29
2.7	<i>Phormidium</i> sp.....	29
2.8	<i>Spirulina</i> sp.....	30
2.9	สาหร่ายสีน้ำตาล.....	34
3.1	แสดงตำแหน่งการเกาะของไพรเมอร์.....	44
4.1	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน COI ทำการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel ...	53
4.2	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน COI ของ <i>Bromia tropicalis</i> ทำการตรวจสอบ ด้วย 1.5%.....	54
4.3	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการ dilution DNA บริเวณส่วนยีน COI ของ <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> และ <i>Dermatophagoides farinae</i>	55
4.4	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel.....	56
4.5	ตำแหน่งตัดภายในบริเวณยีน COI ของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides farinae</i> ด้วย เอนไซม์ <i>AluI</i> ที่ ทำนายโดยใช้โปรแกรม NEB Cutter.....	57

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.6	ตำแหน่งตัดภายในบริเวณยีน COI ของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> ด้วยเอนไซม์ <i>AluI</i> ที่ทำนายโดยใช้โปรแกรม NEB Cutter.....	57
4.7	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i> ตรวจสอบด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).....	58
4.8	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนของยีน COI ของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> และ <i>Dermatophagoides farinae</i> โดยบริเวณส่วนต้น 5' และปลาย 3' คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ DERF1 และ DERR2.....	60
4.9ก	เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart) โดยสารสกัดหยาบจากสาหร่าย ที่ความเข้มข้น 1%.....	68
4.9ข	เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart) โดยสารสกัดหยาบจากสาหร่าย ที่ความเข้มข้น 1%.....	68
4.9ค	เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart) โดยสารสกัดหยาบจากสาหร่าย ที่ความเข้มข้น 1%.....	69

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR.....	44
3.2	ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	45
3.3	แสดง Thermal cycler condition.....	45
3.4	อัตราส่วนของสารในการย่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสด้วย <i>AluI</i>	47
3.5	อัตราส่วนของสารใน 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)..	48
4.1	ขนาดชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด <i>AluI</i> ที่.....	57
4.2	ปริมาณสารสกัดหยาบ (g) ที่ได้จากสาหร่าย 15 สกุล ที่สกัดด้วย methanol, hexane และ dichloromethane (สกัดจากสาหร่าย 200 g).....	64
4.3	เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart) โดยสารสกัด จากสาหร่ายที่สกัดด้วย methanol	65
4.4	เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart) โดยสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วย hexane.....	66
4.5	เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart) โดยสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วย dichloromethane.....	67
4.6	แสดงเปอร์เซ็นต์การตาย และค่า LC ₅₀ ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย 7 สกุล ที่สกัดด้วย methanol ที่ 24 ชั่วโมง.....	71
4.7	น้ำหนักและปริมาณสารสกัดหยาบ (g) ที่ได้จากสาหร่าย <i>Oscillatoria</i> sp. และ <i>Phormidium</i> sp. ที่ผันแปรปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ที่สกัดด้วย methanol (สกัดจากสาหร่าย 100 g).....	72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.8	แสดงเปอร์เซ็นต์การตาย และค่า LC_{50} ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย <i>Oscillatoria</i> sp. ที่ผันแปรปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส สกัดด้วย methanol ที่ 24 ชั่วโมง.....	73
4.9	แสดงเปอร์เซ็นต์การตาย และค่า LC_{50} ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย <i>Phormidium</i> sp. ที่ผันแปรปริมาณไนเตรดและฟอสฟอรัส สกัดด้วย methanol ที่ 24 ชั่วโมง.....	74
5.1	ค่า LC_{50} ของสารสกัดหยาบต่อไรฝุ่น <i>Dermatophagoides. pteronyssinus</i> ด้วยวิธีการสัมผัส.....	78

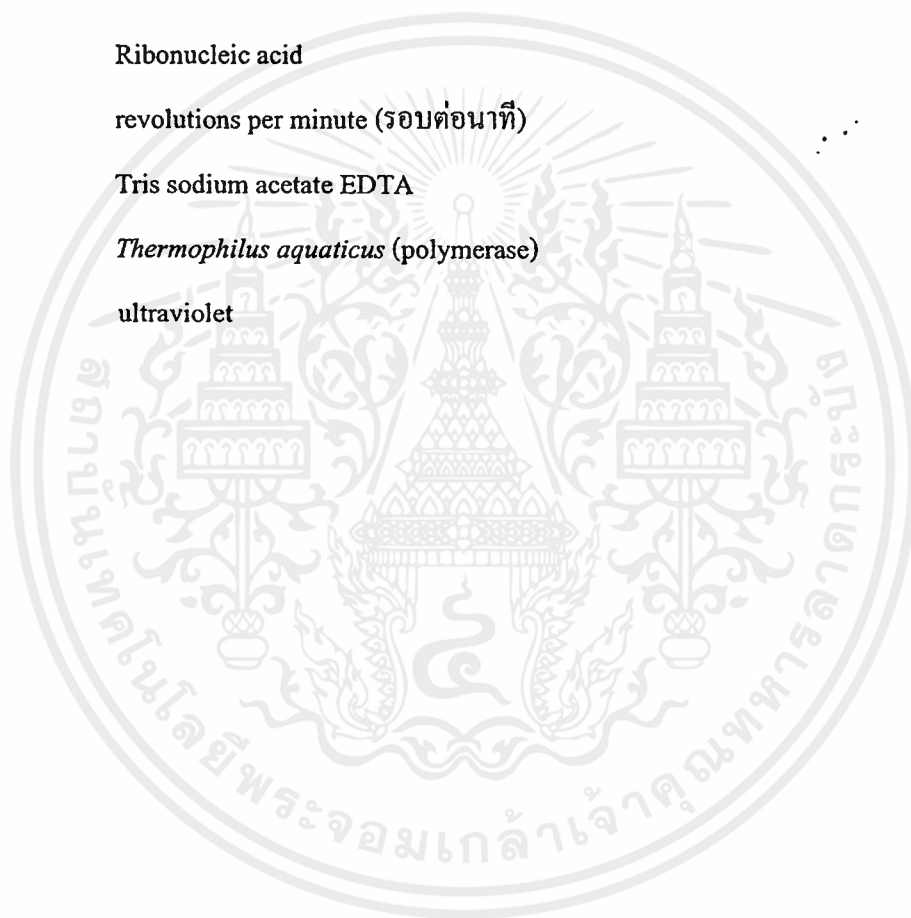
รายการคำย่อ

ตัวย่อ

%	percent (เปอร์เซ็นต์)
ng	nanogram (นาโนกรัม)
µg	microgram (ไมโครกรัม)
µl	microlitre, 10 ⁻⁶ liter (ไมโครลิตร)
bp	base pair (คู่เบส)
cm	centimetre (เซนติเมตร)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
ddH ₂ O	deionized distilled water (น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ)
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
et al.	et. alii (latin), and others
g	grams (กรัม)
L	liter (ลิตร)
mg	milligram (มิลลิกรัม)
ml	milliliter, 10 ⁻³ liter (มิลลิลิตร)
mM	millimolar (มิลลิโมลาร์)
mRNA	messenger RNA
mt DNA	mitochondrial DNA
ng	nanogram, 10 ⁻⁹ gram (นาโนกรัม)
°C	degree celsius (องศาเซลเซียส)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ **XIV** ว่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction (ปฏิกิริยาพีซีอาร์)
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
rDNA	Ribosomal DNA
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute (รอบต่อนาที)
TAE	Tris sodium acetate EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i> (polymerase)
UV	ultraviolet



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ ^{xv}ข้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

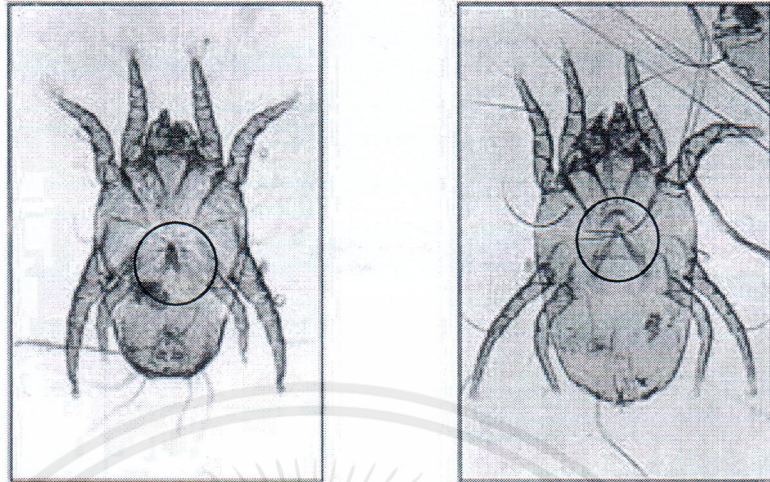
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

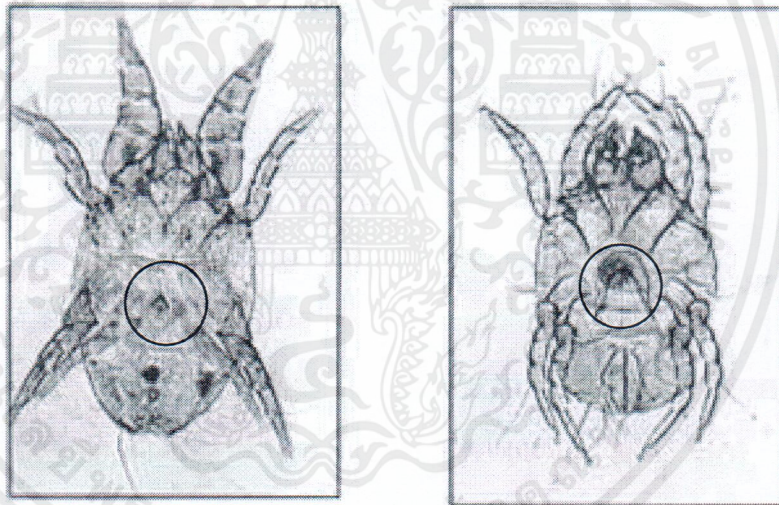
ไรฝุ่น (House dust mite) จัดอยู่ในอยู่ในอาณาจักรของสัตว์ขาข้อ Phylum Arthropoda เช่นเดียวกับแมงมุม แมงป่องและแมลงชนิดต่างๆ ไรฝุ่นมีขนาดเล็ก รูปร่างกลมรี สีขาวขุ่น ขนาดประมาณ 0.1 ถึง 0.3 mm. ตัวเต็มวัยมีขา 4 คู่ ไม่มีตา ไม่มีหนวด ส่วนปากยื่นออกไปทางด้านหน้าของลำตัวมีลักษณะคล้ายกับส่วนหัว ผงงลำตัวของไรทั้งด้านบนหลังและด้านใต้ท้องจะเป็นร่องเล็กๆ ลึกลงไปภายในลำตัว ทำให้เกิดรอยคล้ายลายนิ้วมือมนุษย์ (finger print) ตามลำตัวมีขนยาวติดอยู่หลายเส้น นอกจากนั้นยังมีขนสั้นๆ อีกจำนวนหนึ่ง ที่ปลายส่วนท้องในตัวผู้ยังมีอวัยวะพิเศษใช้ยึดตัวเมียในระหว่างผสมพันธุ์ และมีอวัยวะส่งถ่ายน้ำเชื้อซึ่งตั้งอยู่ระหว่างขาคู่ที่ 4 ไรตัวเมียมีช่องเปิดของไข่อู่อทางด้านล่างของผงงลำตัวเหนือทวารหนัก และมีช่องรับการผสมพันธุ์แยกต่างหากจากช่องวางไข่ (รูปที่ 1.1 และ 1.2) โดยจะพบไรได้หลายชนิดแต่ชนิดที่พบได้แพร่หลายมากที่สุดในประเทศไทย ได้แก่ ไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* และ *Bromia tropicalis* (สุภักษา หอมจันทร์. 2547) ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความสำคัญในการสำรวจการกระจายตัวของประชากรไรฝุ่นในแต่ละพื้นที่เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุม และเพื่อการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุที่ถูกต้องของการเกิดโรคภูมิแพ้ ซึ่งจะช่วยให้การรักษาโรคมีประสิทธิผลมากขึ้นเนื่องจากสารก่อภูมิแพ้ที่เกิดจากไรฝุ่นแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน (Vichyanond. 2002) การจำแนกชนิดของไรฝุ่นยังอาศัยความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยาเป็นหลักซึ่งต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการจำแนก แต่ยังไม่มีการนำเทคนิคทางอณูวิทยามาช่วยจำแนกไรฝุ่นทั้ง 2 ชนิดนี้ ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค PCR-RFLP มาช่วยในการจำแนก งานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ mitochondrial genome บริเวณยีนไซโตโครมออกซิเดสของไรฝุ่นทั้ง 2 สปีชีส์ ร่วมกับการวิเคราะห์ฐานข้อมูลทางชีวภาพด้วยคอมพิวเตอร์ (bioinformatics) มาช่วยในการจำแนกชนิดของไรฝุ่นทั้งสองชนิดนี้ และข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานและคัดแยกไรฝุ่นที่จะมีประโยชน์ในงานการแพทย์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการเกษตรและงานด้านอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.1 ไรฝุ่นชนิด *Dermatophagoides pteronyssinus* (ซ้าย = ตัวผู้ ขวา = ตัวเมีย)

ที่มา: <http://www.jcc2u.com/ChemicalControlCourse/CCC-06.htm>



รูปที่ 1.2 ไรฝุ่นชนิด *Dermatophagoides farinae* (ซ้าย = ตัวผู้ ขวา = ตัวเมีย)

ที่มา : <http://www.jcc2u.com/ChemicalControlCourse/CCC-06.htm>

สถานการณ์ปัจจุบันทั่วโลกมีอัตราผู้ป่วยโรคภูมิแพ้มากขึ้นทุกซึ่งกว่า 80% ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้มีสาเหตุมาจากการสูดสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นซึ่งปะปนอยู่ในอากาศเข้าไป สิ่งสำคัญในผงฝุ่นที่

ทำให้เกิดภูมิแพ้คือมูลที่เกิดจากการขับถ่ายของไรฝุ่นซึ่งพบอยู่ในเฟอร์นิเจอร์ต่าง ๆ ภายในบ้านโดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าเฉพาะที่นอน ไรฝุ่นก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ เช่น ผื่นหนังอักเสบ ภูมิแพ้ที่ผิวหนังที่ผิวหนังอ่อนแอ นำมูกไหล ไม่ว่าจะฉีดยาทั้งสั้น ออกทั้งหุ้มมี เหตุผลเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงใจของเอกสารทุกครั้งทบทวนไป

คันตา ไอ จาม โพรงจมูกอักเสบ เป็นโรคหืด หรือหลอดลมตีบตันทำให้เสียชีวิตได้ ในประเทศไทยมีผู้ป่วยเป็นโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นแล้วประมาณ 10 ล้านคน และมีแนวโน้มผู้ป่วยมากขึ้นทุกปีเช่นกัน ความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นค่ารักษาถึง 36,000 ล้านบาทต่อปี (มนตรี ผู้จินดา. 2526) ในต่างประเทศประชาชนได้ให้ความสนใจในการป้องกันตนเองจากไรฝุ่นโดยวิธีต่าง ๆ เช่น ใช้สารเพื่อกำจัดไรฝุ่นจากเฟอร์นิเจอร์ในบ้านตนเอง แต่พบว่าการใช้สารเคมีเพื่อฉีดฆ่าไรฝุ่นนั้นแม้ประสิทธิภาพในการฆ่าจะสูงแต่ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากวิธีการนี้ยังไม่มีรายงานยืนยันถึงความปลอดภัยในการใช้ระยะยาวจึงมีความเสี่ยงจากพิษตกค้างรวมทั้งความเสี่ยงที่จะใช้สารเคมี ในประเทศไทยสารบางชนิดต้องนำเข้าจากต่างประเทศทั้งในรูปของสารเข้มข้นและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป โดยในปี 2530-2536 มีการนำเข้าสารกำจัดแมลงเป็นมูลค่า 6,524 ตัน มูลค่า 288 ล้านบาท (ไพฑูรย์ พิศุทธิสินธุ์. 2536) จากปัญหาดังกล่าวทำให้นักวิจัยหันมาพัฒนาการควบคุมไรฝุ่นโดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติ (bioactive compounds) เช่นการใช้สารสกัดจากสมุนไพร พืช เป็นต้น ซึ่งมีข้อดี คือ สารสกัดจากธรรมชาติมีการสลายตัวเร็วในสภาพแวดล้อม และส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ค่อนข้างเฉพาะเจาะจง และมีพิษต่อสัตว์เลื้อยคุดต่ำ แต่สารสกัดจากพืชยังมีข้อจำกัดทางการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในแง่ที่ต้องใช้พื้นที่เพาะปลูกขนาดใหญ่ ใช้เวลาในการเพาะปลูกนานเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย นอกจากนี้ยังไม่สามารถควบคุมการผลิตที่เหมาะสมได้ เนื่องจากการเจริญเติบโตของพืชขึ้นอยู่กับองค์ประกอบด้านต่างๆ เช่น สภาพดินฟ้าอากาศ เป็นต้น สาหร่ายจึงเป็นวัตถุดิบอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในการนำสารสกัดมาใช้ประโยชน์ เพราะมีอยู่ตามธรรมชาติ โดยสาหร่ายสีน้ำตาลทั่วโลกมีผลผลิตที่ให้เก็บเกี่ยวได้สูงถึงประมาณ 16 ล้านตัน ส่วนสาหร่ายสีแดงมีประมาณ 2.6 ล้านตัน (Schiewer and Volesky. 2000) และแม้หากต้องทำการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตสาหร่ายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ สาหร่ายก็มีข้อดีกว่าพืชชั้นสูงอื่น ๆ คือใช้พื้นที่ขนาดเล็ก มีวงจรการเจริญเติบโตที่สั้นเพียง 1-2 สัปดาห์ ได้ผลผลิตที่มากและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเป็นทั้งสารต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดแมลง ฯลฯ ซึ่งหากมีการนำมาใช้ประโยชน์ที่เหมาะสมจะเป็นการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้อย่างคุ้มค่าไม่ทิ้งให้เปล่าประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของไรฝุ่นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR-RFLP

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายกลุ่มต่าง ๆ ในการกำจัดไรฝุ่น

1.2.3 เพื่อหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายที่ทำหน้าที่กำจัดไรฝุ่น เพื่อการนำไปพัฒนาและปรับใช้ผลิตสารกำจัดไรฝุ่นในเชิงพาณิชย์

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการเพลงก่ตอน ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการพืชวิทยา ห้องปฏิบัติการไรฝุ่น ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.3 ห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน

ใช้ระยะเวลารวมทั้งสิ้น 18 เดือน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของไรฝุ่นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในประเทศไทยจากลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทคนิค PCR-RFLP

1.5.2 ทราบชนิดของสาหร่ายที่มีฤทธิ์ในการฆ่าไรฝุ่น

1.5.3 ทราบถึงปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายที่ทำหน้าที่กำจัดไรฝุ่น เพื่อการนำไปพัฒนาและปรับใช้ผลิตสารกำจัดไรฝุ่นในเชิงพาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวิตวิทยาของไรฝุ่น

ไรฝุ่น (House dust mite) มีขนาดเล็ก รูปร่างกลมรี สีขาวขุ่น ขนาดประมาณ 0.1- 0.3 mm ตัวเต็มวัยมีขา 4 คู่ จัดอยู่ใน

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Class	: Arachnida
Order	: Acariformes
Suborder	: Astigmata
Superfamily	: Acaroidia
Family	: Piroglyphidae
Common name	: House dust mite

2.1.1 รูปร่างลักษณะและวงจรชีวิต

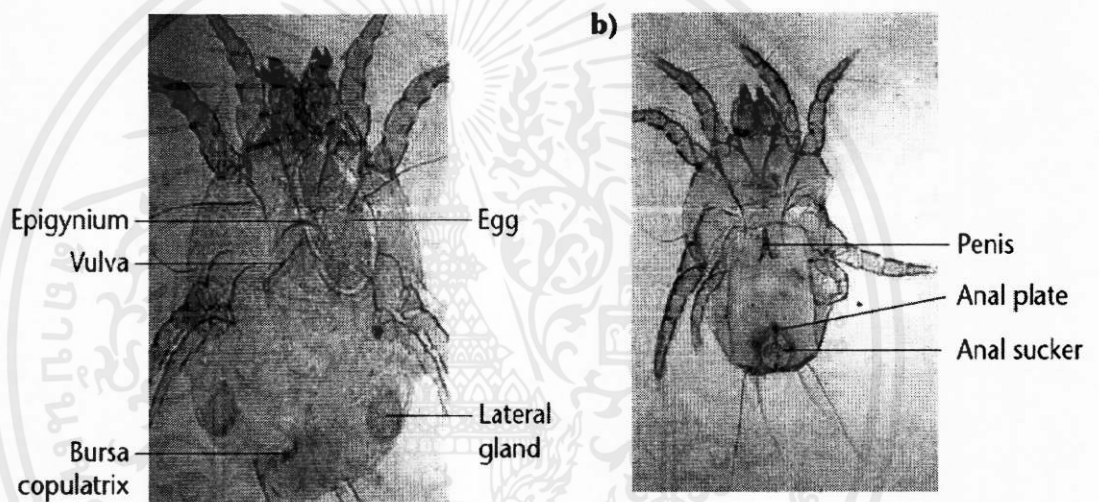
ไรฝุ่นไม่ชอบแสงสว่าง จึงอาศัยหลบซ่อนตัวตามซอกมุมมืดต่างๆ ในบ้าน เช่น ห้องนอน ที่นอน หมอน ผ้าห่ม โซฟา พรม และเฟอร์นิเจอร์ที่บุด้วยวัสดุเส้นใยที่สามารถสะสมฝุ่นได้ดี ไรฝุ่น กินเศษผิวหนังและรังแคของคนและสัตว์ สปอร์ของเชื้อราและสารอินทรีย์ต่างๆ ในฝุ่นเป็นอาหาร นอกจากอาหารแล้วปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของไรฝุ่น ได้แก่ อุณหภูมิและความชื้น จากการศึกษาวิจัยพบว่าสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไรฝุ่น คือ ที่อุณหภูมิระหว่าง 25-28°C และความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น จึงมีสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของไรฝุ่นเป็นอย่างดี ไรฝุ่นมีการเจริญเติบโตแบบไม่สมบูรณ์ การเจริญเติบโตของไรฝุ่นประกอบด้วยระยะต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะไข่ ไข่ไรฝุ่นมีลักษณะเป็นวงรี สีขาวขุ่น และมีสารเหนียวห่อหุ้มภายนอก เพื่อช่วยให้ยึดเกาะกับเศษซากต่างๆ ได้ง่ายขึ้น

ระยะตัวอ่อน 6 ขา และระยะตัวอ่อน 8 ขา ตัวอ่อนของไรฝุ่นมีสีขาวใส

ระยะตัวเต็มวัย ไรฝุ่นใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากระยะไข่จนเป็นตัวเต็มวัย ประมาณ 19-30 วัน ขึ้นกับอุณหภูมิและความชื้น ตัวเต็มวัยมีอายุขัยประมาณ 1-2 เดือน และสามารถผสมพันธุ์กันได้หลายครั้ง ไรฝุ่นตัวเมียวางไข่ 1-3 ใบต่อวัน เฉลี่ยแล้วไรฝุ่นหนึ่งตัววางไข่ได้ประมาณ 40-80 ฟอง (Collof. 2009) (รูปที่ 2.1 และ 2.2)

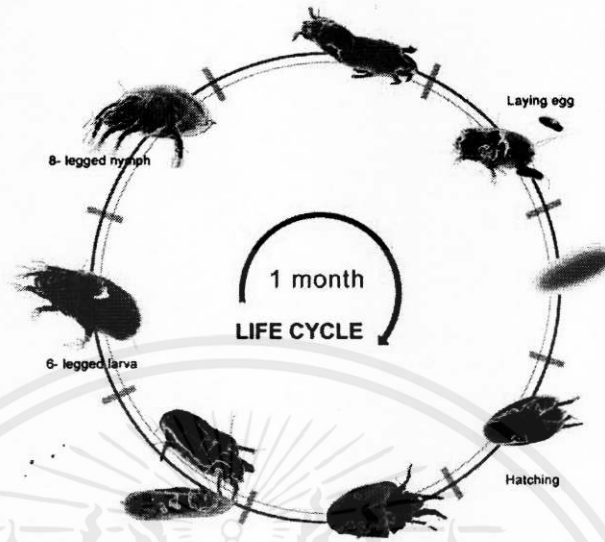


รูปที่ 2.1 ลักษณะตัวเต็มวัยของไรฝุ่น

ที่มา: Collof. 2009

จากการสำรวจในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2530-2534 พบว่าไรฝุ่นชนิด *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* แพร่กระจายตามบ้านเรือนมากที่สุด (98% ของบ้านที่สำรวจทั้งหมด) โดยเฉพาะในกรุงเทพมหานคร สามารถพบไรฝุ่นได้ในปริมาณตั้งแต่ 100-10,000 ตัว ในฝุ่น 1 กรัม นอกจากนั้นแล้วยังพบว่า 90% ของที่อยู่อาศัยมีสารก่อภูมิแพ้ของไรฝุ่นในระดับที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะของโรคภูมิแพ้ได้ (สุภักษา หอมจันทร์. 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ลักษณะวงจรชีวิตไรฝุ่นตั้งแต่ระยะไข่ถึงระยะตัวเต็มวัย
ที่มา : http://www.bscepest.com/site/ipm_manor_pests_dustmite.htm

2.2 ไรฝุ่นและความสำคัญทางการแพทย์

2.2.1 ไรฝุ่นก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ได้อย่างไร

โรคภูมิแพ้ เป็นอาการที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายแสดงปฏิกิริยาตอบสนองที่ไวกว่าบุคคลทั่วไปต่อสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า “สารก่อภูมิแพ้” หรือ “allergen” อาการของโรคภูมิแพ้ ได้แก่ จมูกอักเสบจากภูมิแพ้ (allergic rhinitis) เยื่อบุตาอักเสบจากภูมิแพ้ (allergic conjunctivitis) หืดภูมิแพ้ (atopic asthma) และผื่นแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis) อย่างไรก็ตามการเกิดอาการของโรคภูมิแพ้นั้น ไม่ได้เกิดขึ้นกับทุกคน แต่เกิดขึ้นเฉพาะกับบุคคลที่มีภูมิไวเกิน (hypersensitivity) ต่อสารก่อภูมิแพ้เท่านั้น จากการศึกษาในกลุ่มประชากรเด็กไทยพบว่า ประมาณร้อยละ 30 ของประชากรเด็กที่ทำการศึกษาภาวะของโรคภูมิแพ้ นอกจากปัจจัยด้านพันธุกรรมแล้วสันนิษฐานว่าการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและความเป็นอยู่ในปัจจุบัน เป็นปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่ชักนำให้เป็น โรคภูมิแพ้ได้ ผลจากการศึกษาวิจัยในหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยพบว่า ประมาณ 70 – 80% ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ แสดงการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นมากกว่าสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ (Arlan *et al.* 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 สารก่อภูมิแพ้

ไรฝุ่นเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญกับสุขภาพของมนุษย์มาก เนื่องจากเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดสารก่อภูมิแพ้ โดยสารก่อภูมิแพ้หลักที่ไรฝุ่นสามารถผลิตออกได้มี 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ group 1 allergens พบมากในมูลของไรฝุ่น และ group 2 allergens พบได้มากในผนังลำตัว ซึ่งสารก่อภูมิแพ้เหล่านี้จะถูกย่อยและขับออกมาให้อยู่ในรูปมูลของไรฝุ่นซึ่งมีขนาดเล็กเพียง 10-40 μm เนื่องจากมูลของไรฝุ่นมีขนาดเล็กมาก จึงสามารถลอยปะปนอยู่ในอากาศ จากการศึกษพบว่าไรฝุ่นกว่า 90-100% อาศัยอยู่ตามเตียงนอน หมอน ผ้าห่ม และ 70-95% พบตามเฟอร์นิเจอร์ที่บรรจุด้วยเส้นใยต่างๆ และพรม ซึ่งทั้งหมดล้วนเป็นบริเวณที่อยู่ใกล้ตัว เมื่อคนที่ภูมิไวต่อสารก่อภูมิแพ้ สูดดมเอามูลของไรฝุ่นเข้าไปในหลอดลมและปอด จะเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้แสดงอาการน้ำมูกน้ำตาไหล ไอ จาม โพรงจมูกอักเสบ หรืออาจส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดโรคหืดอย่างรุนแรง หรือหลอดลมตีบตันถึงขั้นเสียชีวิตได้ สำหรับสารก่อภูมิแพ้ของไรฝุ่น มักอยู่ในรูปของมูลและคราบของไรฝุ่นที่มีน้ำหนักรวม สามารถลอยปะปนในอากาศและสูดดมเข้าไปได้ โดยองค์การอนามัยโลกได้กำหนดระดับสารก่อภูมิแพ้ไว้ที่ 2 $\mu\text{g}/\text{ฝุ่น 1 g}$ หรือไรฝุ่น 100 - 500 ตัว/ฝุ่น 1 g เป็นระดับมาตรฐานที่สามารถกระตุ้นให้เกิดอาการ หืดหอบในผู้ป่วยภูมิแพ้ได้ ทว่าในประเทศไทยกลับตรวจพบสารก่อภูมิแพ้เฉลี่ยถึง 11 $\mu\text{g}/\text{ฝุ่น 1 g}$ และในกรุงเทพฯ พบปริมาณของสารก่อภูมิแพ้เฉลี่ย 5 $\mu\text{g}/\text{ฝุ่น 1 g}$ (สุภักษา หอมจันทร์. 2547)

สารก่อภูมิแพ้มีด้วยกัน 13 กลุ่ม แต่สารหลักที่ทำให้เกิดภูมิแพ้มี 2 กลุ่ม คือ group 1 allergen และ group 2 allergen สำหรับ group 1 allergen เป็น cystine proteases เช่น *Der p 1*, *Der f 1* ละลายน้ำได้ดี และสลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิ 75 °C group 2 allergen มีคุณสมบัติเป็น N - terminal amino acid sequences ที่ทนความร้อนและสารเคมีได้ เช่น *Der p 2*, *Der f 2* เป็นต้น จากการสำรวจฝุ่นในบ้านเรือนในประเทศไทย พบว่าปริมาณของ group 1 allergen เฉลี่ย 11 $\mu\text{g}/\text{ฝุ่น 1 g}$ และในกรุงเทพฯ พบปริมาณของ group 1 allergen เฉลี่ย 5 $\mu\text{g}/\text{ฝุ่น 1 g}$ (Platts-Milis and chapman. 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น

2.3.1 การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Mophology)

เป็นการบอกความแตกต่างของไรฝุ่นโดยใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้มีการศึกษามาอย่างกว้างขวาง โดยดูจากวงจรชีวิต และลักษณะของตัวเต็มวัย Denmark and Cromroy (2003) ได้ทำการศึกษาชีววิทยาของไร *D. pteronyssinus* พบว่ามีการเจริญเติบโต 5 ระยะ คือ ระยะไข่ ตัวอ่อน วัฏรุ่นที่ 1 วัฏรุ่นที่ 3 (ข้ามระยะวัฏรุ่นที่ 2) และตัวเต็มวัย ไรตัวเต็มวัยเพศเมียมี genital opening อยู่ระหว่างขาคู่ที่ 3 และ 4 และมี bursa copulatrix เป็นช่องเปิดอยู่ใกล้กับทวารหนัก bursa copulatrix สามารถใช้จำแนกชนิดของไรชนิดนี้ได้ Suggars (1987) รายงานว่าเพศผู้และเพศเมียของไรฝุ่น *D. pteronyssinus* มีรูปร่างทรงกลมลำตัวมีสีครีมขาว และผิวขาว ไรเพศผู้มี sucker ติดอยู่ด้านบน ventral posterior ของ idosoma ใช้จับเพศเมียระหว่างผสมพันธุ์ Voorhorst (1969) รายงานว่าไร *D. pteronyssinus* เพศผู้ขนาดเล็กกว่าเพศเมีย นอกจากพื้นที่บริเวณขั้วและแผ่นแข็งบน propodosoma ส่วนมากจะมีลักษณะเหมือนเพศเมีย ขาคู่ที่ 1 และ 4 จะทำงานเป็นอิสระ ส่วนขาคู่ที่ 2 และ 3 จะเชื่อมติดกันโดย apodemes ของขาคู่ที่ 3 จะมีลักษณะโค้งงอ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะตั้งอยู่ระหว่าง coxa ของขาคู่ที่ 4 ไรเพศผู้มีขาคู่ที่ 1 และ 2 ยาวใกล้เคียงกัน ส่วนขาคู่ที่ 3 จะมีขนาดใหญ่กว่าขาคู่ที่ 4 อวัยวะขับถ่ายจะแคบเป็นวงแหวนรูปวงรี โดยด้านข้างจะขนานไปด้วย anal sucker ไรเพศเมียมีแผ่นปิดอวัยวะสืบพันธุ์ (epigynial shield) ทางด้าน dorsal ของ opitosoma ไปทางด้านฐานของลำตัวมี bursa copulatrix รูปร่างคล้ายดอกไม้ สำหรับใช้ในการรับน้ำเชื้อจากเพศผู้ และสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของไรชนิดนี้ได้

B. tropicalis มี 5 ระยะเช่นกัน คือ ระยะรังไข่ ระยะตัวอ่อน ระยะวัฏรุ่นที่ 1 ระยะวัฏรุ่นที่ 3 และตัวเต็มวัย ไข่มีสีขาว ก่อนข้างกลม ระยะตัวอ่อนมี 6 ขา gnathosoma มีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับลำตัว ระยะวัฏรุ่นที่ 1 มีขา 8 ขา เส้นขนลำดับที่ a3 ทางด้าน ventral มีลักษณะเรียบ ระยะวัฏรุ่นที่ 3 มี genital และ papillae อยู่ระหว่างขาคู่ที่ 4 มีเส้นขน 3 คู่ ตรง anal และเส้นขนลำดับที่ a3 มีลักษณะ pectinate ระยะตัวเต็มวัยเพศเมียทางด้าน dorsum ด้านล่างสุดจะมี copulatory tube เส้นตามลำตัวมี

เอกสารนี้ถึงลักษณะ pectinate ตัวเต็มวัยเพศผู้มี genital opening อยู่ระหว่าง coxa ของขาคู่ที่ 3 และ 4 ส่วน genital ถ้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

papillae มีขนาดเล็กลักษณะเป็น disc-shape และมีเส้นขน 3 คู่ ติดอยู่บริเวณ anus (Bronswijk *et al.* 1978)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไรจะดูตั้งแต่ความแตกต่างรูปร่างของไข่ พัฒนาการของปาก ขา และในตัวเต็มวัยจะดูลักษณะของเส้นขน รูปร่างของ coxa ลักษณะของ spine บริเวณ tarsus (Coloff. 2009) การตรวจสอบลักษณะนี้มักจะเกิดขึ้นจากสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผลได้ผิดพลาด และต้องมีวิธีในการบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ (phenotype) ที่ตรวจสอบได้ ซึ่งในการจำแนกไรฝุ่นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นจำเป็นต้องอาศัยนักกีฏวิทยาที่มีประสบการณ์และความชำนาญสูง และหากเกิดกรณีที่ไรฝุ่นอยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ก็อาจจะส่งผลให้การจำแนกคลาดเคลื่อนได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เพียงอย่างเดียว

2.3.2 การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นโดยเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular markers)

สุรินทร์ ปิระโชคณากุล (2545) กล่าวว่า เครื่องหมายทางโมเลกุลหรือ marker มีที่มาเพื่อบ่งชี้ความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต ทั้งทางปริมาณและคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่างและภายในสายพันธุ์ (between and within populations) หรือระหว่างแต่ละตัว (between individuals) ก็ได้ เครื่องหมายที่บ่งชี้ความแตกต่างนี้มีสองประเภท คือ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Mophology) และ เครื่องหมายทาง โมเลกุล (molecular marker)

2.3.2.1 เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่ระดับโมเลกุลของโปรตีนต่างๆ และระดับ DNA ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน DNA

2.3.2.1.1 เครื่องหมายโปรตีน

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน ใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังนิยมตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิด หรือ ไอโซไซม์ต่างๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีนคือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือ

ไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแฉวโปรตีนแบบโฮโมโลกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์ คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนและไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้

2.3.2.1.2 เครื่องหมาย DNA (DNA marker)

เครื่องหมาย DNA (DNA marker) หมายถึง DNA ที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง หรือในต่างสายพันธุ์ เป็น DNA ที่อยู่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือ DNA ในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ DNA เป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของ DNA หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของ DNA

การตรวจสอบในระดับ DNA มีข้อดีว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของ DNA มีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ และเนื่องจาก DNA เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบ DNA จากเนื้อเยื่อต่างๆ ทุกระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาได้โดยไม่ต้องขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบ DNA จากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่ต้อง ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมาย DNA แบบต่างๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ DNA เป็นเครื่องหมายทำได้กว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้ไม่จำกัด

2.3.3 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น

ปัจจุบันความรู้ทางด้านอนุชีววิทยามีการพัฒนาไปอย่างมากและได้มีการนำมาประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในงานที่เกี่ยวข้องกับการแพทย์โดยเฉพาะการพิสูจน์บุคคลและหลักฐานทางนิติเวชศาสตร์ ซึ่งข้อดีของการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์คือทำให้สามารถระบุสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและน่าเชื่อถือมากกว่าการระบุสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยชิ้นส่วนไรฟลูนเพียงเล็กน้อยหรืออวัยวะต่างๆที่ไม่สมบูรณ์ก็สามารถนำมาใช้ระบุสายพันธุ์โดยวิธีการทางอนุชีววิทยาได้ และไม่จำเป็นต้องอาศัยนักกีฏวิทยาที่มีประสบการณ์และความชำนาญสูง ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ที่เป็นเครื่องหมาย DNA จัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งสารพันธุกรรมนี้สามารถพบได้ 2 แหล่งภายในเซลล์ คือ nuclear DNA ซึ่งพบอยู่ในนิวเคลียส และ mitochondrial DNA ซึ่งพบอยู่ในไมโทคอนเดรีย โดยสามารถสรุปความสำคัญได้ดังนี้

2.4 จีโนมไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome, mitochondrial DNA (mtDNA))

ลักษณะโดยทั่วไปของจีโนมไมโทคอนเดรียมีการถ่ายทอดทางมารดา จีโนมไมโทคอนเดรียจะอยู่ในไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ในไซโทพลาสซึมเท่านั้น จีโนมไมโทคอนเดรียของไรฟลูนมีขนาด 14203 bp มีลักษณะเป็น double stranded ลอยอยู่ในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรีย โดยที่ในหนึ่งไมโทคอนเดรียจะมีจีโนมไมโทคอนเดรียอยู่ประมาณ 5-10 copies สามารถถอดรหัสให้ยีนทั้งหมด 37 ยีน เป็นยีนที่ถอดรหัสให้ transfer RNA จำนวน 22 ยีน ถอดรหัสให้ ribosomal RNA จำนวน 2 ยีน และถอดรหัสให้โปรตีนจำนวน 13 ยีน โดยที่โปรตีนทั้ง 13 ชนิดนี้เป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนที่ใช้ในกระบวนการ oxidative phosphorylation ที่มีอยู่ 5 ตัว คือ NADH-ubiquinone oxidoreductase, Succinate-ubiquinone oxidoreductase, Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase, Cytochrome oxidase และ ATP synthase

ยีนไมโทคอนเดรียที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 1 (NADH-ubiquinone oxidoreductase) จำนวน 7 ยีน คือ ยีน ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 และ ND6 ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 3 (Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase) จำนวน 1 ยีน คือ ยีน *cytb* ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 4 (Cytochrome oxidase) จำนวน 3 ยีน คือ ยีน COI, COII และ COIII และเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 5 (ATP synthase) จำนวน 2 ยีน คือ ยีน ATP6 และ ATP8 (Anderson, 1981) mtDNA มีโครงสร้างและยีนที่สำคัญแสดงดังรูปที่ 2.3 ได้แก่

Ribosomal RNA (rRNA) เช่น 16S และ 12S ribosomal RNA

ไรโบโซมในไมโทคอนเดรีย มีขนาดเล็กกว่าคาร์ิโอโตและไลโปคาร์ิโอโต คือ ประมาณ 55-70

S ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดใหญ่ 45 S ที่มี rRNA ขนาด 16 S รวมกับโปรตีน และหน่วยย่อยขนาดเล็ก 35 S ที่มี rRNA ขนาด 12 S รวมกับโปรตีน (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์, 2547)

Cytochrome oxidase เป็นบริเวณที่เรียกว่า protein coding region หรือบริเวณ ที่มีการถอดรหัส เป็นโปรตีนซึ่งจะเป็นโปรตีนที่กระตุ้นการออกซิไดซ์ของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการถ่ายเทอิเล็กตรอน จาก cytochrom ไปเป็นโมเลกุลของออกซิเจน ซึ่งจะถูกร่งปฏิกิริยาจากหน่วยย่อย 2 หน่วยคือ cytochrome oxidase subunit I (COI) และ cytochrome oxidase subunit II (COII) (Gennard. 2007) ยีน บริเวณนี้เป็นยีนที่เหมาะสมกับการศึกษาทางวิวัฒนาการ และพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจากยีนส่วนนี้ มีความผันแปรมากทำให้เราทราบถึงสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตแต่ละชีวิตได้

D-loop หรือ displacement loop เป็นส่วนที่ประกอบไปด้วยยีนที่ไม่ทำหน้าที่ใดๆ แต่จะเก็บ ข้อมูลการเกิดมิวเทชัน (mutation) ที่มีอัตราการเกิดอย่างรวดเร็ว บริเวณนี้ใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของ ไมโทคอนเดรียได้ (George. 2007)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของจีโนมไมโทคอนเดรียของไรฝุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่มา: Dermauw et al. (2009)
 ไม่ว่าจะพิมพ์ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ความหลากหลายของจีโนมไมโทคอนเดรีย

จีโนมไมโทคอนเดรียยังมีลักษณะที่แตกต่างจากจีโนมนิวเคลียสหลายประการ คือ

1) ตำแหน่งของจีโนม โดยที่จีโนมนิวเคลียสจะอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ ส่วนจีโนมไมโทคอนเดรียจะอยู่ในส่วนไซโทพลาซึมของเซลล์

2) การถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานของจีโนมนิวเคลียสจะเป็นไปตามทฤษฎีหรือตามกฎของเมนเดล ในขณะที่การถ่ายทอดของจีโนมไมโทคอนเดรียสู่รุ่นลูกหลานจะเป็นการถ่ายทอดทางสายแม่เท่านั้น

3) ลักษณะการจัดรวมตัวกันของสารพันธุกรรมของจีโนมนิวเคลียสจะมีการรวมตัวกันขดแน่นและเกาะติดอยู่กับโปรตีนที่สำคัญคือ histone แต่จีโนมไมโทคอนเดรียจะไม่มี การรวมหรือเกาะติดกับโปรตีนใดๆ จีโนมไมโทคอนเดรียจะลอยอยู่ในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรียอย่างนั้น

4) ขบวนการถ่ายแบบของจีโนมไมโทคอนเดรียที่เกิดขึ้นใน matrix นั้นไม่มี repairing system ทำให้เกิดความผิดพลาดในการถ่ายแบบสารพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในอัตราที่สูงกว่าในยีนนิวเคลียสซึ่งมี repairing system ที่ดีมาก พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ของจีโนมไมโทคอนเดรียสูงกว่ายีนนิวเคลียส 10-20 เท่า (Pesole *et al.* 1999) อัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าจีโนมนิวเคลียสก็เนื่องจากลักษณะและสิ่งแวดล้อมรอบๆ จีโนมไมโทคอนเดรีย นั่นคือ การที่จีโนมไมโทคอนเดรียอยู่ในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรียทำให้มีโอกาสสัมผัสกับอนุมูลเสรีที่เกิดจากขบวนการ oxidative phosphorylation สูงมากและตลอดเวลา นอกจากนั้นแล้วลักษณะของจีโนมไมโทคอนเดรียเองไม่มี repairing system ที่ดี ไม่มีโปรตีน histone ช่วยปกป้องล้อมรอบ ล้วนเป็นสิ่งที่ส่งเสริมให้จีโนมไมโทคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงดังกล่าวและการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของจีโนมไมโทคอนเดรียเป็นแบบทางสายมารดาที่มีประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการ

2.6 คุณสมบัติของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียในการศึกษาวิวัฒนาการ

ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์สูงมากกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสโดยภาพรวมประมาณ 10 เท่า ด้วยคุณสมบัติข้อนี้ทำให้เมื่อเวลาผ่านไปเท่าๆกัน จีโนมไมโทคอนเดรียจะสามารถสะสมการกลายพันธุ์ใหม่ๆ ได้มากกว่าในจีโนมนิวเคลียสประมาณ 10 เท่าตัวตามไปด้วย การสะสมการกลายพันธุ์ใหม่ในจีโนมไม่ว่าจะเป็นของนิวเคลียสหรือไมโทคอนเดรียย่อมเป็นส่วนสำคัญโดยตรงกับระยะเวลาที่ผ่านไป ในเมื่อจีโนมไมโทคอนเดรียสะสมการกลายพันธุ์ได้มากกว่าในระยะเวลาเท่าๆกันมันจึงเป็นเครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการที่มีทั้งความไวและละเอียดสูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส

ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียพบได้ในเซลล์ที่มีชีวิตทุกๆ เซลล์ของร่างกายโดยมีจำนวน copies ต่อเซลล์อยู่ในหลักพัน ขณะที่ดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีเพียง 2 copies ต่อหนึ่ง somatic cell ด้วยคุณสมบัตินี้ที่ทำให้สามารถตรวจพบและสกัดดีเอ็นเอจากจีโนมไมโทคอนเดรียได้ง่ายกว่าจากจีโนมนิวเคลียส โดยเฉพาะเมื่อเรามีตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อสำหรับการวิเคราะห์ในปริมาณน้อยมาก การที่ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีจำนวน copies มาก และค่อนข้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดยังทำให้มีความเป็นไปได้มากที่ดีเอ็นเอซึ่งยังคงมีสภาพดีอยู่จะยังคงหลงเหลืออยู่ในตัวอย่างนานแล้วได้

การใช้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียในการศึกษาวิวัฒนาการมีข้อจำกัดบางประการ คือ จีโนมไมโทคอนเดรียมีขนาดเล็กคิดเป็นเพียงร้อยละ 0.00006 ของจีโนมในนิวเคลียส ซึ่งเป็นตัวแทนได้ไม่ดีสำหรับวิวัฒนาการโดยภาพรวม ดังนั้นเราควรต้องใช้การศึกษาวิวัฒนาการจีโนมในนิวเคลียสมาช่วยตรวจสอบเทียบเคียงด้วยแม้ว่าวิวัฒนาการของดีเอ็นเอในนิวเคลียสจะสลับซับซ้อนและการวิเคราะห์ทางสถิติกระทำได้ยากกว่ามากกว่า (พัชรีย์ เลิศฤทธิ์, 2552)

2.7 เทคนิคสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค 2 แบบหลัก ได้แก่ การตรวจความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยคุณสมบัติการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (เทคนิค RFLP) และการตรวจสอบลำดับของนิวคลีโอไทด์ (เทคนิค DNA sequencing)

2.7.1 เทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR)

จรรยา ชมวารินทร์ และคณะ (2540) กล่าวว่าเทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนของ DNA เฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง ดังนั้น เทคนิคนี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *in vitro* enzymatic gene amplification วิธีนี้จึงมีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติที่ว่า โดยทั่วไปสาย DNA สายคู่สามารถจับเข้าคู่กันได้เพราะชนิดของเบสคู่สม (complementary) แต่ละสายจะจับเข้าคู่กัน ดังนั้น การสังเคราะห์สาย DNA ชิ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักการเดียวกัน โดยอาศัย DNA เป็นต้นแบบ (template) และอาศัย DNA สายสั้นๆ (primer) ที่สามารถจับกันได้กับ DNA ต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วย

ทำให้สาย DNA ขาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) เข้ามาต่อให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า มีอนุสัญญาให้มาใช้ประโยชน์ เช่น การนำ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเบสคู่สมกับ DNA สายต้นแบบก็จะได้ DNA สายใหม่ขึ้น ดังนั้น ถ้าทำเช่นนี้หลายๆรอบก็จะเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ขึ้นได้

ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่ (double strand) แยกเป็นสายเดี่ยว (single strand) โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C

2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 °C เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับ DNA ต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม คือเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จับคู่ได้กับนิวคลีโอไทด์สายเดิม

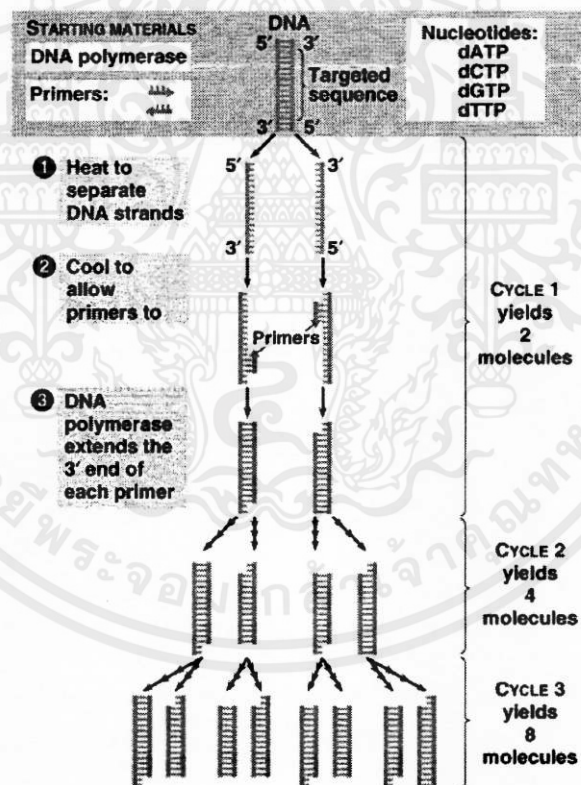
3. ขั้นตอน primer extension หรือ synthesis of new DNA ซึ่งเป็นขั้นตอนการขยายสาย DNA โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของ primer แล้วมีการขยายสาย DNA สายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิในช่วง 70-75 °C ถ้าพิจารณาสาย DNA ที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสาย DNA ต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สาย DNA เป็น 2 คู่ ดังนั้นเมื่อทำเช่นนี้หลายๆรอบของปฏิกิริยา PCR แล้ว DNA ที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบ ดังนั้นถ้าทำปฏิกิริยา PCR จำนวน n รอบผลที่ได้ตามทฤษฎีจะเท่ากับประมาณ 2^n เมื่อประสิทธิภาพการผลิต 100 % แต่โดยทั่วไปมักทำ PCR ประมาณ 30 รอบ ซึ่งจะขึ้นส่วนของ DNA เป็นจำนวนหนึ่งพันล้านเท่าของจำนวน DNA ตั้งต้น (รูปที่ 2.4)

2.7.2 องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

1. การเก็บสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างเพื่อสกัด DNA โดยตัวอย่างที่ส่งตรวจอาจเป็นเนื้อเยื่อจากพืช สัตว์ หรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย เช่นเลือด สารน้ำต่างๆ หรือชิ้นเนื้อที่อาจจะใหม่หรือเก่าก็ได้เช่นกัน ซึ่งสามารถนำมาสกัดเอาสารพันธุกรรมซึ่งอาจจะเป็น RNA หรือ DNA ก็ได้โดยใช้วิธีต่างๆ รวดเร็วซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี เช่น วิธี standard proteinase K incubation method ซึ่งสามารถสกัดเอา DNA ปริมาณน้อยๆ จากเนื้อเยื่อได้ เนื่องจากเทคนิค PCR มีความไวสูงและอาศัย DNA ปริมาณน้อยๆได้ ทั้งสามารถเลือกเพิ่มจำนวน DNA ช่วงสั้นๆได้ จึงสามารถใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นระยะเวลาแล้ว ทำให้มีประโยชน์นำไปใช้กับงานทางด้านโบราณคดีหรืองานนิติเวชได้

2. DNA ต้นแบบ (template DNA) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป้าหมาย หรือ DNA เป้าหมาย (DNA target) สามารถจะใช้ในปฏิกิริยา PCR ในลักษณะของ DNA สายเดี่ยวหรือสายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาด

ของ DNA จะไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวน DNA โดย DNA มีขนาดสั้นๆและอยู่ในรูป ปลายเปิด (linear DNA) จะมีประสิทธิภาพดีกว่า DNA ที่มีขนาดยาวๆ และอยู่ในรูป relaxed DNAs หรือ circular DNAs เพราะง่ายต่อการ denature และต่อการที่ primer จะเข้าไปจับ ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการ เพิ่มจำนวน และลดผลผลิต DNA ที่ไม่จำเพาะลงในกรณีที่สารพันธุกรรมเป็น RNA ก็สามารถนำมาทำ PCR ได้โดยผ่านขั้นตอนการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA ก่อน โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นเพิ่ม DNA โดยใช้ DNA polymerase ต่อไป DNA ต้นแบบที่สกัดได้แล้ว สามารถนำมาเก็บใน TE buffer หรือ น้ำที่ -20 °C แต่ควรหลีกเลี่ยงสารยับยั้งในขบวนการ PCR เช่น การมี EDTA จำนวนมาก (ซึ่งจะไปเกาะติดกับ Mg^{2+}) และบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด DNA ที่มีฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ เพราะอาจทำให้เกิดการตกตะกอนของแมกนีเซียมฟอสเฟต ($Mg_3(PO_4)_2$) ได้ที่อุณหภูมิ สูง นอกจากนี้ส่วนของ ฟีนอล (phenol) ก็ต้องกำจัดไปให้หมดเช่นกัน



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสการเพิ่มปริมาณ

DNA นี้ประกอบไปด้วยขั้นตอน denaturation, annealing และ extension

ที่มา: http://www.pseudomonas-syringae.org/Outreach/Module_3_Home.htm

3. การเลือกออกแบบ primer ที่จะใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงาน โดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของสาย DNA ที่ต้องการตรวจหากับ primer โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาสังเคราะห์ primer เป้าหมายสำคัญของการออกแบบ primer ในการทำ PCR มี 2 อย่าง คือความจำเพาะและประสิทธิภาพ โดยธรรมชาติของการทำ PCR เมื่อพยายามปรับความจำเพาะของการทำ PCR ให้สูงขึ้น ประสิทธิภาพของการทำ PCR จะลดลง ในขณะที่ถ้าพยายามปรับให้ประสิทธิภาพในการทำ PCR สูงขึ้น ความจำเพาะของการทำ PCR ย่อมจะลดลง โปรแกรมในการออกแบบ primer ในปัจจุบันพยายามออกแบบให้มีความสมดุลระหว่างความจำเพาะกับประสิทธิภาพ ความสมดุลดังกล่าวถูกกำหนดโดยค่ามาตรฐานที่กำหนดขึ้น (default) ของตัวแปร (variables) ต่างๆ ที่มีผลต่อความจำเพาะและ/หรือประสิทธิภาพ ตัวแปรเหล่านี้สามารถทำการปรับเปลี่ยนค่าเพื่อเพิ่มหรือลดความจำเพาะและประสิทธิภาพให้เหมาะสมกับรูปงาน ในการประยุกต์นำเอาเอาเทคนิค PCR มาใช้ในงานต่างๆ จำเป็นอย่างยิ่งต้องคำนึงถึงเป้าหมายหรือวัตถุประสงค์ของการทำเพื่อจะได้ปรับค่าของตัวแปรต่างๆ ให้เหมาะสมสำหรับการคัดเลือก primer ที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพที่สุดสำหรับงานนั้น

primer ที่ออกแบบมาจาก Nucleotide sequence ชนิดใดชนิดหนึ่งจะเป็น Specific primer ซึ่งมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวนหรือตรวจสอบโดยวิธี PCR ส่วน Primer ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของ Amino acid sequence ซึ่งได้จากการทำ Multiple sequence alignment เรียกว่า Degenerate primer ซึ่ง Degenerate primer เป็น Nucleotide sequence ที่ได้มาจากการแปลง Amino acid sequence กลับมาเป็น Nucleotide sequence โดย Degenerate primer ควรมีค่า Degeneracy ไม่เกิน 10,000 การคำนวณค่า Degeneracy คำนวณจากค่า Propability ของ Nucleotide แต่ละตำแหน่งของ Primer ซึ่งปัจจัยในการออกแบบ primer สำหรับการทำ PCR แบบพื้นฐาน ได้แก่

3.1 ความยาวของ primer

โดยทั่วไป primer ขนาดความยาวในช่วง 18-24 เบส และมีค่า T_m มากกว่าหรือเท่ากับ 54°C จะมีความจำเพาะและประสิทธิภาพในการทำ PCR มาตรฐานได้ดี การใช้ primer ที่มีขนาดสั้นประมาณ 15 เบสหรือน้อยกว่านั้น จะมีข้อจำกัดในการทำงาน โดย primer ลักษณะนี้จะเหมาะสำหรับใช้ในงาน PCR ที่มีแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็น cDNA หรือพลาสมิด หากใช้กับ genomic DNA โอกาสที่ primer จะเกาะติดในตำแหน่งอื่นๆ (false priming) เกิดการ amplified product แบบไม่จำเพาะจะมีสูง ในกรณีที่ความยาวของ primer ให้ยาวกว่า 24 เบส พบว่าจะไม่ค่อยมีปัญหาในการทำ PCR โดยความจำเพาะของ primer จะเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า ทุกๆหนึ่งเบสที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบความเร็วของการ anneal เข้ากับ

แม่พิมพ์ primer ที่มีขนาดยาวขึ้นจะมีอัตราเร็วในการ anneal ช้ากว่า primer ที่มีขนาดสั้นกว่า primer ที่มีขนาดใหญ่มากกว่ามาตรฐานที่ใช้กันมีขนาดในช่วง 28-35 เบส มักใช้ในกรณีตัวอย่างแม่พิมพ์ที่ลำดับเบสมีความหลากหลาย เช่น เชื้อไวรัสเอชไอวี แม้ว่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แยกได้จากผู้ป่วยคนเดียวกัน จะมีลำดับเบสที่หลากหลาย หรือในกรณีที่ลำดับเบสคล้ายคลึงกันแต่ไม่เหมือนกันอย่างสมบูรณ์ การออกแบบ primer ให้มีขนาดยาวขึ้น จะช่วยให้ primer เข้าเกาะกับแม่พิมพ์ที่อาจมีลำดับเบสบางตำแหน่งไม่เหมาะสมกัน

3.2 นิวคลีโอไทด์ของ PCR primer

วิระพงษ์ ลุฑิตานนท์ (2550) พบว่านิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของ primer เป็นส่วนสำคัญในการควบคุมการเกิด mispriming โดยนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของ primer ที่สามารถยึดเกาะกับแม่พิมพ์อย่างมั่นคง จะมีโอกาสเกิด mispriming ได้ง่าย โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' ไม่จำเป็นต้องมีเบสคู่สมเลย ด้วยเหตุนี้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ส่วนใหญ่จะพยายามคัดเลือก primer ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' เกาะติดกับแม่พิมพ์ด้วยแรงยึดเกาะที่พอเหมาะไม่มากเกินไป เพื่อลดปัญหาการเกิด mispriming (การคัดเลือกทำได้โดยการคำนวณค่าแรงยึดเกาะด้วยหลักการทางเทอร์โมไดนามิกส์)

นอกจากปัญหาเรื่อง mispriming แล้ว ในการออกแบบ primer ต้องพยายามหลีกเลี่ยงลักษณะ primer ที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่างๆดังนี้

- การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง primer คู่ primers ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลายที่ 3' เป็นคู่สมกัน สามารถทำปฏิกิริยากันและทำหน้าที่เป็นเสมือน primer-แม่พิมพ์ซึ่ง DNA polymerase สามารถใช้เป็นสับสเตรทสร้างสายใหม่ออกจากปลาย 3' ของ primer ทั้งสองสายได้ ก่อให้เกิด primer-dimer ขึ้น และเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR ลดลง
- การเกิด hair-pin โครงสร้าง hair-pin เกิดขึ้นในกรณี primer เกิดโครงสร้างทุติยภูมิขึ้นภายในสายโดย primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตัวในสายมีลักษณะเป็นคู่สมกัน ซึ่งจะมีการโน้มสาย primer เข้ามาก่อนให้เกิดลักษณะ hair-pin ขึ้น ซึ่งโครงสร้างนี้จะมีลักษณะเสมือน primer แม่พิมพ์เช่นกัน และเกิดการสร้างสายใหม่สั้น ๆ ได้ และเป็นปัจจัยที่ทำให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR ลดลงเช่นกัน

3.3 ปริมาณ GC และค่า Tm ของ primer

PCR primers สำหรับงาน PCR-มาตรฐาน โดยทั่ว ๆ ไปควรมีปริมาณ GC อยู่ในช่วง 40-60%

และมีค่า Tm อยู่ในช่วง 55-65°C ซึ่ง primer ที่มีค่า Tm ในช่วงนี้ จะสามารถเกาะติดกับแม่พิมพ์ได้อย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสถาบันวิจัยและพัฒนาสุขภาพภาคใต้ โดยสงวนไว้เพื่อใช้ประโยชน์ในวงจำกัด
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ primer ทั้งคู่ควรมีค่า T_m ใกล้เคียงกัน (ต่างกันไม่เกิน 3°C) เพราะถ้า primers มีค่า T_m ที่ต่างกันมาก จะก่อให้เกิดปัญหาในการตั้งอุณหภูมิสำหรับการ annealing ให้เหมาะสมสำหรับ primers ทั้งคู่ และมีผลกระทบต่อความจำเพาะและ/หรือประสิทธิภาพของการทำ PCR เป็นอย่างมาก

3.4 ความยาวของ amplified products และการกำหนดบริเวณเกาะติดของ primers

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ส่วนใหญ่สามารถกำหนดขนาดของ amplified products และช่วงบริเวณของแม่พิมพ์ที่จะคัดลอก primer ได้ การกำหนดขนาดของ amplified products จะให้มีขนาดใด นอกจากจะขึ้นกับลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายแม่พิมพ์, แหล่งและลักษณะของสิ่งตรวจวิเคราะห์ และค่าตัวแปรต่าง ๆ ตามที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังขึ้นกับงาน PCR ที่ประยุกต์ใช้ โดยทั่วไป ในการตรวจหาส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจจากตัวอย่างตรวจ สามารถกำหนดขนาดของ amplified products ให้อยู่ในช่วง 150-1000 เบส (ส่วนใหญ่ PCR มาตรฐานสามารถเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดไม่เกิน 3000 เบส โดยใช้พลาสมิดเป็นแม่พิมพ์)

3.5 ควรหลีกเลี่ยงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ primer ไม่ให้เป็นคู่สมกันเองเพื่อป้องกันการ anneal กันเองกับ primer อีกสายหนึ่ง (cross complementary) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3' overlap ในคู่ primer เพื่อช่วยลดการเกิด "primer dimer"

3.6 ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกันโดยทั่วไปอยู่ในช่วง $55-80^\circ\text{C}$ ซึ่งปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ช่วยออกแบบ primers ที่เหมาะสมสำหรับงาน PCR อยู่ มากจึงช่วยลดปัญหาดังกล่าวไปมาก เช่น การออกแบบ primer ด้วยโปรแกรม Primer3, โปรแกรม CODEHOP และ โปรแกรม primo pro 3.4 และ โปรแกรมที่ช่วยวิเคราะห์คุณสมบัติของ primers ได้แก่ โปรแกรม Oligo Calculator และ โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 เป็นต้น (กัญญา จิระเจริญรัตน์, 2550)

4. Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อว่า *Thermus aquaticus* (Taq) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้าง DNA ได้ที่อุณหภูมิสูงคือ $70-85^\circ\text{C}$ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 72°C ซึ่ง Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 kDa แต่ข้อเสียของเอนไซม์ชนิดนี้คือ ไม่มี 3' ไป 5' exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า proofreading ทำให้เกิดการผ่าเหล่าขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 5. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 mM ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTP รวม (ทั้ง 4 ชนิด) จะมี

ส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 mM ซึ่งเพียงพอสำหรับการสร้าง DNA ได้ประมาณ 20-26 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ของปฏิกิริยา ดังนั้นควรเลือกใช้ความเข้มข้นของ dNTP ที่ต่ำที่สุดที่เพียงพอสำหรับความยาว และ ส่วนประกอบของ DNA และควรปรับ pH ให้เป็นกลางประมาณ 7 และความเข้มข้นของ dNTP แต่ละ ชนิดที่สมดุลกัน เพื่อให้ PCR ที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะถูกต้องและได้ปริมาณสูง ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่ มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมผิดพลาด (misincorporation)

6. Buffer ส่วนประกอบของ buffer ประกอบด้วย Tris-HCl, KCl และ MgCl_2 เป็นต้น ความเข้มข้นและสภาวะเหมาะสมของส่วนประกอบใน buffer ในการทำ PCR มีดังนี้

6.1 ความเข้มข้นของ magnesium ion (Mg^{2+}) *Taq* DNA polymerase ต้องการ Mg^{2+} เพื่อช่วย ส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสาย DNA ดำเนินต่อไปได้โดย Mg^{2+} จะทำหน้าที่เป็น co-factor นอกจากนั้น Mg^{2+} ยังมีผลต่อความถูกต้องของการทำงานของเอนไซม์ด้วย (enzyme fidelity) ต่อการ anneal ของ primer ความจำเพาะของ DNA ที่ได้ และปริมาณ DNA เป็นต้น

6.2 pH โดย pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ *Taq* DNA polymerase คือที่ pH 7.0 -7.5 ที่อุณหภูมิ 72 °C แต่ปกติ *Taq* DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่ อุณหภูมิ 25 °C เนื่องจาก pH ของ Tris- buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้นเมื่อ อุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72 °C จะได้ pH 7.3 นั่นเอง

7. จำนวนรอบของการทำ PCR (cycle number) จำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณ DNA ต้นแบบตั้งต้น ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ผิดพลาดก็มากขึ้น ตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิต PCR ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลงและเกิด background มากขึ้น แต่ใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย

8. การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR product) การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ

8.1 Gel electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR ที่สร้างได้มาแยกตามขนาด DNA โดยใช้ กระแสไฟฟ้าแยก DNA บน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมย้อม DNA ด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต ผลผลิต PCR ที่ดีควรให้ขึ้น DNA ที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็ก และแถบ DNA ไม่ชัดเจน อาจเป็น DNA ที่เป็น primer dimer ก็ได้

8.2 Direct sequencing ในกรณีต้องการรู้รายละเอียดของลำดับเบสหรือของผลผลิต PCR ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่ สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR products) หรืออาจจะ sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single stranded PCR products)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่าย การค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

วิธีการนี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เอนไซม์เหล่านี้แต่ละชนิดมีคุณสมบัติพิเศษตรงที่สามารถตัดดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะเจาะจงกับตัวมัน ปัจจุบันนิยมนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นภายใต้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ก่อน เรียกว่า PCR-RFLP เป็นวิธีที่บ่งบอกความหลากหลายทางชีวภาพที่สามารถจำแนกชนิดได้ โดยการตัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มหรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยแบบแผนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose หรือ polyacrylamide gel electrophoresis และพบว่าวิธี PCR-RFLP เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzymes)

เอนไซม์ตัดจำเพาะคือเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งลำดับเบสที่มีการเรียงตัวอย่างจำเพาะเท่านั้น เอนไซม์ในกลุ่มนี้สกัดได้จากแบคทีเรีย ในปัจจุบันสามารถแบ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตามคุณสมบัติ ความต้องการสารที่จำเป็นในการทำงานของเอนไซม์ (co-factor) และวิธีการตัดดีเอ็นเอ โดยแบ่งได้เป็น 3 ชนิด

Type I Restriction Enzymes เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะไม่ตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งจำเพาะ โดยมากจะตัดไกลไปจากบริเวณที่เอนไซม์ไปจับกับบริเวณจำเพาะ (recognition site) ดังนั้นจะนำมาใช้ประโยชน์ไม่ได้ เนื่องจากไม่ทราบตำแหน่งการตัดที่แน่นอน

Type II Restriction Enzymes เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่มี 2 subunits ที่เหมือนกัน (identical) จะตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่บริเวณจำเพาะ เช่น *EcoRI*, *HindIII* เป็นต้น เนื่องจากเอนไซม์กลุ่มนี้มีการตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะดังนั้นเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีประโยชน์มากในการศึกษาทางอณูชีววิทยา

Type III Restriction Enzymes เอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 2 subunits ที่แตกต่างกัน โดยมากจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างออกไป 25 คู่เบส จากบริเวณจำเพาะ ซึ่งจะนำมาใช้ไม่ได้คล้ายกับ Type I Restriction Enzymes

การเรียกชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ เรียกตามชื่อแบคทีเรียที่นำมาแยกเอนไซม์นั้นออกมา โดยอักษรตัวแรกมาจากชื่อ genus ของแบคทีเรีย อักษรสองตัวถัดมาเป็นอักษรสองตัวแรกของ species อักษรตัวถัดมาจะเป็นสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรานั้น และตัวสุดท้ายเป็นเลขโรมันที่บอกถึงลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างหรือความหลากหลายของขนาด DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่ง DNA ในออร์แกเนลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นมีความสามารถที่จำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำเพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกหลาน แต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน DNA ได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง เช่นการเกิดการกลายพันธุ์แบบต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยวิธี RFLP ได้โดยใช้หลักการดังนี้ คือ นำ DNA ที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย และจะตัด DNA ที่ตำแหน่งซึ่งมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แบบจำเพาะ (recognition site) โดยตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 4-6 bp ดังนั้น เมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัด DNA เป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้า DNA เป้าหมายมาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาด และ จำนวนชิ้น DNA ที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิด polymorphism หรือ RFLP แล้วทำการเปรียบเทียบชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น ในทางปฏิบัติ การวิเคราะห์ RFLP ที่เกิดขึ้นทำโดยวัดความแตกต่างของ RFLP ระหว่างตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบที่ละคู่ และนับจำนวนแถบ DNA ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อแสดงแผนภาพความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น Rungroj *et al.* (2009) กล่าวไว้ในเอกสารประกอบภาคปฏิบัติการ molecular and cellular workshop ปี 2009 ว่าเทคนิค RFLP ใช้ประโยชน์ในด้านการตรวจหาการเปลี่ยนแปลง (mutation) หรือ single nucleotide polymorphisms; SNPs ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยอาศัยหลักการของขนาดยีนที่แตกต่างกันระหว่างผู้ที่มียีนปกติและมีการเกิด mutation หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายใน (restriction endonuclease)

สำหรับโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือการจัดจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต นั้นมีอยู่มากในปัจจุบัน ซึ่งการเลือกใช้โปรแกรมขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการทำงาน และ ลักษณะของข้อมูลดิบที่มี ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นต้น ตัวอย่างโปรแกรมมีดังนี้ คือ

2.1 โปรแกรม BLAST (basic local alignment search tools) เป็นโปรแกรมสำหรับการค้นหาบริเวณเฉพาะที่เหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจกับฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์ สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2.2 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีน โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (local alignment) หรือเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (global alignment)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับโปรแกรม Clustal W <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> และโปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ได้คือ ClustalX1.83 และ BioEdit เป็นต้น

2.3 โปรแกรมสำหรับสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ โดยการคำนวณ algorithms ได้แก่วิธี distance matrix เช่น unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA), minimum evolution (ME), neighbor-joining (NJ) หรือวิธี maximum parsimony (MP) หรือวิธี maximum likelihood (ML) ตัวอย่างโปรแกรมคำนวณ ได้แก่ MEGA สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://www.megasoftware.net/>, Bosque เข้าถึงได้ที่ <http://bosque.udce.cl/> และ PAUP เข้าถึงได้ที่ <http://paup.csit.fsu.edu/> เป็นต้น

2.4 โปรแกรมสำหรับหาค่าแห่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น NEB cutter version 2.0 สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> และโปรแกรม Webcutter version 2.0 ที่สามารถเข้าถึงอ่านคู่มือการใช้งานและคู่มือค่าแห่งเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ที่ <http://ma.lundberg.gu.se/cutter2/> เป็นต้น

2.8 การใช้สารเคมียับยั้งไรฝุ่น

สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าตัวไรฝุ่นหรือที่เรียกว่า acaricide ที่นิยมใช้กัน ได้แก่ benzyl, benzoate, pyrethroids, natamycin ในประเทศไทยการใช้ acaricides ในการทำลายไรฝุ่นยังไม่แพร่หลาย แต่ในต่างประเทศนิยมใช้ในการฆ่าไรฝุ่นในพรมแต่ยังไม่แนะนำให้ใช้กับที่นอนหรือเครื่องนอน เนื่องจากอาจทำให้มีการสะสมของสารเคมีเพราะต้องใช้ทุก 1-2 เดือน นอกจากนี้ยังมีสารอีกประเภทหนึ่งซึ่งเป็นโปรตีนเสื่อมสภาพ (กระบวนการเสื่อมสภาพที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ของปัจจัยภายในและภายนอก) ได้แก่ tannic acid จากพืชสมุนไพรรอบว่าสามารถทำลายสารก่อภูมิแพ้ได้ ปัจจุบันได้มีผลิตภัณฑ์หลายชนิด ที่กล่าวว่าสามารถยับยั้งไรฝุ่นหรือทำลายสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นได้ ออกจำหน่ายในรูปแบบต่าง ๆ กันเช่น สเปรย์ โฟม ผงโรย การเคลือบสารเคมีหรือสารจากธรรมชาติลงบนผ้า จากนั้นนำผ้ามาปูเพื่อทำเป็นที่นอนหรือโซฟา อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้มีอายุการใช้งาน และยังไม่มีการวิจัยใดที่ยืนยันแน่ชัดว่าสารเคลือบเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพตลอดอายุการใช้งานของเครื่องใช้ต่างๆ (อำมร อินสังข์ และคณะ. 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง (มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็ง มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อ เป็นต้น) และสารนั้นจะต้องไม่มีผลทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยา ย่อมไม่ต้องการให้ยาไปมีผลกับส่วนที่ดีของร่างกาย ยกเว้นเชื้อโรค หรือส่วนเกิน (มะเร็ง) ที่เราต้องการกำจัดเท่านั้น สารใดก็ตามถ้ามีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการก็จะจัดสารนั้นให้อยู่ในพวกสารพิษ (toxic substance) ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะต้องอาศัยเครื่องมือในการทดสอบฤทธิ์ และวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนั้นอาจยังต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างของสารบางส่วนเพื่อทำให้สารนั้นมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ประเทศไทยจัดเป็นดินแดนที่มีความหลากหลายในทรัพยากรธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ หรือแม้กระทั่งสิ่งมีชีวิตเล็กๆอย่างจุลินทรีย์ (นิรนาม. ม.ป.ป.)

ในอดีตที่ผ่านมาได้มีการศึกษาพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า 8,000 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามได้มีผู้คิดค้นหาแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ รักษาโรค กำจัดวัชพืชและแมลงศัตรูพืช เป็นต้น

2.9.1 การใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและสมุนไพรยับยั้งไรฝุ่น

อำมร อินทร์สังข์และจรงค์ศักดิ์ พุมนวน. 2551 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำ (*Piper nigrum* Linn.) ที่แยกสกัดจากเปลือก (blue oil) และจากเนื้อ (yellow oil) ต่อไรฝุ่น *D. pteronyssius* (Trouessart) ด้วยน้ำมันหอมระเหย 0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8 และ 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ โดยวิธีการรมและตรวจนับอัตราการตายที่ 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำส่วนที่สกัดจากเปลือกและส่วนที่สกัดจากเนื้อมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นน้อย คือที่ 5% (6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้ 43.3 และ 41.0% ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเปลือกมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้เพียง 20.0, 33.3, 35.6, 37.8 และ 43.3% ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำส่วนที่สกัดจากเนื้อมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นเพียง 11.1, 20.0, 25.6, 33.3 และ 41.1% ตามลำดับอีกที และในการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรต่อไรฝุ่น

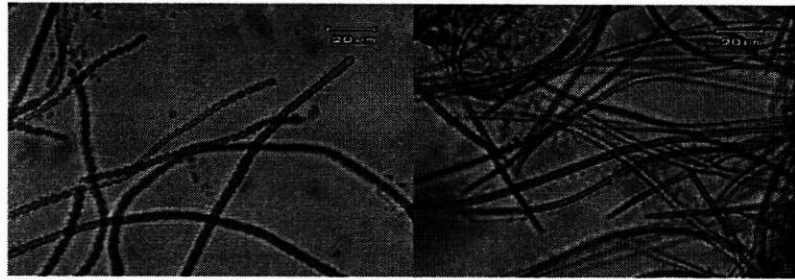
D. pteronyssius (Trouessart) ด้วยวิธีการรม พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1% ($1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุด 100% และมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.092 และ $0.232 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ตามลำดับ (อามร อินทร์สังข์ และ จรงค์ศักดิ์ พุมนวน. 2009) Chang *et al.* (2001) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ essential oil และองค์ประกอบของ Hayata heartwood, *Taiwania cryptomerioides* กับไรฝุ่น *D. pteronyssius* และ *D. farinae* ด้วยวิธีการสัมผัส พบว่าที่ความเข้มข้น $12.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ น้ำมันหอมระเหยจากแก่นของฮายาตะทำให้ไรฝุ่น *D. pteronyssius* ตาย 36% และ *D. farinae* ตาย 67% ส่วน Akendengue *et al.* (2003) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืช *Uvaria klaineana*, *U. mocoli* และ *U. versicolor* กับไรฝุ่น *D. pteronyssinus* พบว่า crude extract จากลำต้นของ *U. versicolor* ซึ่งสกัดด้วย methanol และ hexane มีประสิทธิภาพดีที่สุด

2.9.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย

ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) จัดอยู่ใน Division Cyanophyta สาหร่ายชนิดนี้มีโครงสร้างของนิวเคลียสคล้ายคลึงกับนิวเคลียสของแบคทีเรีย (รูปที่ 2.5) และบางชนิดยังมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ แต่อย่างไรก็ตามในวิชาสาหร่ายก็ยังจัดกลุ่มสาหร่ายนี้แยกออกมาจากแบคทีเรีย เพราะสาหร่ายชนิดนี้มีคลอโรฟิลล์ เอ และมีการปล่อยออกซิเจนสู่สิ่งแวดล้อมจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งไม่พบในแบคทีเรีย สามารถพบสาหร่ายชนิดนี้ได้ทั้งในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงมาก เช่น ในบ่อน้ำพุร้อน หรือบริเวณที่มีอากาศหนาวเย็น เช่น ในหิมะ หรือบริเวณขั้วโลก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้มีเมือก (gelatinous sheath) หุ้ม จึงสามารถเก็บความชื้นไว้ในเซลล์ และสามารถเป็นฉนวนกันความร้อน ความเย็นให้กับเซลล์ได้ อีกประการหนึ่งโมเลกุลของโปรตีนภายในโปรโตพลาสซึมจับตัวกันแน่น จึงอาจเป็นเหตุช่วยให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้นาน (กาญจนภาชน์ ลีวโนมนต์. 2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 ไชยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40x

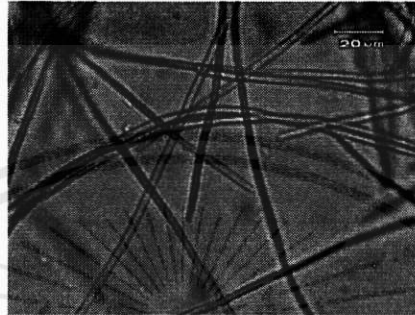
ไชยาโนแบคทีเรียเป็นกลุ่มที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดคือมีถึง 7500 สปีชีส์ หรืออาจมากกว่านี้ (Chapman. 1973) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่อยู่ในน้ำจืด ในน้ำทะเลหรือน้ำกร่อยพบพวกนี้น้อย ไชยาโนแบคทีเรีย พบได้ทุกแห่งในโลก แม้กระทั่งน้ำพุร้อน หรือหิมะก็สามารถเจริญได้ มีความสามารถทนต่อสภาวะแห้งแล้งซึ่งไม่มีพืชอื่นเจริญได้เลย แม้แต่ดินในทะเลทรายก็สามารถเจริญได้ สำหรับน้ำทั่วไป ไชยาโนแบคทีเรีย สามารถเจริญได้ในน้ำที่มีสภาพเป็นกลาง หรือด่างเล็กน้อย ในน้ำที่ pH 4-5 จะไม่มี ไชยาโนแบคทีเรียอยู่ (กาญจนภาพณ์ ล้วม โนมมนต์. 2527)

Oscillatoria sp.

สาหร่ายชนิดนี้อยู่ใน Division Cyanophyta, Order Nostocales, Family Oscillatoriaceae เป็นสาหร่ายที่เป็นเส้นสายที่อาจอยู่เดี่ยวๆ หรืออาจมีการรวมกลุ่มกันหนาแน่นในบางสภาพ โดยทั่วไปเซลล์ในเส้นสายมีความกว้างมากกว่าความยาวของเซลล์ แต่มีบางชนิดที่มีความกว้างและความยาวใกล้เคียงกัน ขนาดของเซลล์สม่ำเสมอตลอดสาย เซลล์ยอมีลักษณะกลมมน บางชนิดมีคาลิปตราหุ้มอยู่ เส้นสายของสาหร่ายชนิดนี้ไม่มีซีทหุ้ม แต่มีน้ำใส ซึ่งเรียกว่า วอเตอร์ชีท (watery sheath) หุ้มอยู่ ไม่มีเฮทเทอโรซิสต์ (รูปที่ 2.6) เป็นสาหร่ายที่พบได้บ่อยที่สุด และพบได้ทุกแห่งที่มีความชื้น เช่น ตามพื้นดินที่ชื้น และ ตามบ่อน้ำ คู ลำธาร ท่อระบายน้ำซึ่งมีอินทรีย์สารที่เน่าเปื่อย บริเวณที่มีสาหร่ายชนิดนี้น้ำจะมีสีเขียวคล้ำ Chauhan *et al.* (1992) รายงานว่า *Oscillatoria* sp. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดอื่นที่เลี้ยงร่วมกัน โดย *Oscillatoria* sp. จะปล่อยสารที่ได้จากกระบวนการ secondary metabolism ซึ่งจะไปส่งผลกระทบต่อกระบวนการ metabolism ของสาหร่ายชนิดอื่น Katircioglu *et al.* (2006) พบว่าสารสกัดจาก *Oscillatoria* sp. ที่สกัดด้วย methanol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus*

เอกสารนี้ *cerevisiae*, ที่ใช้ *S. cerevisiae* 2SI TP (3-2) และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ โดยเกิด clear zone ของ *S. cerevisiae*, อีก *S. cerevisiae* 2SI TP (3-2) และ *P. aeruginosa* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.8, 9.8 และ 16.8

mm ตามลำดับ นอกจากนี้ Raouf and Ibraheem (2008) พบว่าสารสกัดจาก *Oscillatoria ornate* ที่สกัดด้วย ethyl acetate มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas salmonicida* ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคนิปลา โดยเกิด clear zone ของ *A. salmonicida* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 23 mm

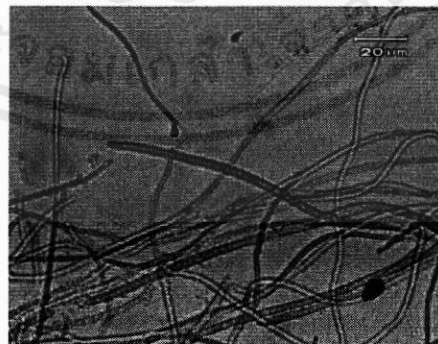


รูปที่ 2.6 *Oscillatoria* sp.

ที่มา : กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40x

Phormidium sp.

สาหร่ายนี้อยู่ใน Division Cyanophyta, Order Nostocales, Family Oscillatoriaceae เป็นสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสายมักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มสานกันเป็นแผ่น เซลล์มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมพื้นผ้า หรือทรงกระบอกเรียงต่อกัน มีความกว้างของเซลล์สม่ำเสมอตลอดสาย ยกเว้นตรงปลายกลมมน บางชนิดอาจมีคาลิปตรา มีซีทหุ้มเส้นสายบางๆ ซีทไม่มีสี บางชนิดซีทไหล่ออกมานอกไซโคม (รูปที่ 2.7) พบในแหล่งน้ำสภาวะเช่นเดียวกับ *Oscillatoria*



รูปที่ 2.7 *Phormidium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในหน่วยงาน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

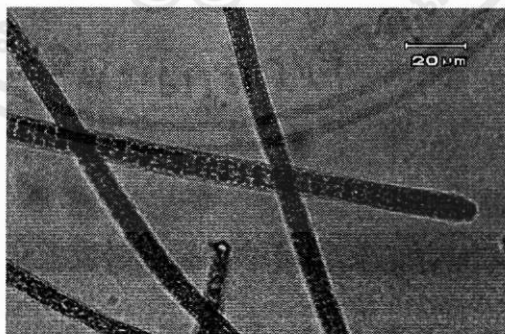
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเผยแพร่และจำหน่ายเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40x

Teneva *et al.* (2005) รายงานว่าสาหร่ายในกลุ่ม Cyanophyta ได้แก่ *P. bijugatum*, *P. molle*, *P. papyraceum*, *P. uncinatum* และ *P. autumnale* สามารถสร้าง bioactive compounds ทั้งสาร neurotoxic และ hepatotoxic ซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม และยังพบว่าสารพิษจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถยับยั้งกระบวนการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดอื่นโดยไปยับยั้งกระบวนการ extracellular metabolites Baskara (2010) รายงานว่าสาหร่าย *Phormidium* sp. สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutants*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้ โดยโดยเกิด clear zone ของ *S. mutants*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* และ *K. pneumoniae* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20, 17.5, 15, 10 และ 10 mm ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Phormidium* sp. สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* PTCC 1112, *Bacillus subtilis* PTCC 1023, *Escherichia coli* PTCC 1047 และ *Salmonella typhi* PTCC 1609 ได้โดยโดยเกิด clear zone ของ *S. aureus* PTCC 1112, *B. subtilis* PTCC 1023, *E. coli* PTCC 1047 และ *S. typhi* PTCC 1609 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20, 12, 16 และ 20 mm ตามลำดับ (Ghasemi *et al.* 2007)

Spirulina sp.

เป็นสาหร่ายที่อยู่ใน Division Cyanophyta, Order Nostocales, Family Oscillatoriaceae มีลักษณะเป็นเส้นสายที่มีลักษณะเป็นเกลียวคล้ายสว่าน *Spirulina* (รูปที่ 2.8) ประกอบด้วยเซลล์หลายเซลล์มาต่อกัน แต่ผนังเซลล์แต่ละเซลล์บางมาก จึงมองไม่เห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา มีการเคลื่อนไหวแบบควงสว่าน สาหร่ายชนิดนี้มีโปรตีนสูง บางชนิดสูงถึง 45 – 49% ของน้ำหนักแห้ง จึงนิยมเพาะเลี้ยงกันเป็นอุตสาหกรรม และนำผลผลิตที่ได้ไปเป็นอาหารสัตว์ หรืออาหารเสริมของคน เพราะมีคุณค่าทางด้านเศรษฐกิจเรื่องประโยชน์ของสาหร่าย สาหร่ายชนิดนี้พบได้ในน้ำจืดทั่วไป โดยเฉพาะน้ำที่มีของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมจะพบเสมอ



รูปที่ 2.8 *Spirulina* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่มา : กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงกำลังขยาย 40x
 ไม่ว่าจะพิมพ์ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chamorro-Cevallos *et al.* (2008) รายงานว่า *Spirulina platensis* เป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วย โปรตีน, วิตามิน, แร่ธาตุ และ กรดไขมันจำเป็นเช่น c-linolenic acid และ sulfolipids และยังมีพบพบสาร กลุ่ม phycocyanin จาก *Spirulina subtilis* ซึ่งเป็นสารซึ่งเป็นสารละลายเชิงซ้อน ประกอบด้วยธาตุเหล็ก และเกลือแร่อื่น ช่วยเพิ่ม bioavailability และต้านอนุมูลอิสระได้ Mendiola *et al.* (2007) รายงานว่าสาร สกัดจากสาหร่าย *Spirulina platensis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* และ *Aspergillus niger* ได้โดยเกิด clear zone ของ *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* และ *A. niger* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20, 15, 20 และ มากกว่า 20 mm ตามลำดับ ซึ่ง พบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. platensis* ประกอบด้วย c-linolenic acid ปริมาณมากซึ่งพบว่าเมื่อสกัด แยกส่วนสารสกัดส่วนที่มีปริมาณไขมันสูงมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. coli* ได้ดี (Demule *et al.*, 1996)

สาหร่ายสีเขียว (green algae)

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ใน Division Chlorophyta สาหร่ายในควิซันนี้ ส่วนใหญ่มีสีเขียวเหมือน หน้ำ ทั้งนี้เพราะภายในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์ทั้ง เอ และ บี จำนวนมากซึ่งจะบดบัง รงควัตถุสีอื่นเอาไว้ นอกจากนั้นก็ยังมีรงควัตถุพวกแคโรทีนและแซนโทฟิลล์อีกหลายชนิด รงควัตถุ ทั้งหมดอยู่ใน คลอโรพลาสต์ซึ่งมีรูปร่างได้หลายแบบ คุณสมบัติเหล่านี้สามารถจัดจำแนกสาหร่ายสี เขียวได้อย่างชัดเจน สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะมีไฟรินอยด์ในไมโครพลาสต์ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการ สร้างแป้งในเซลล์ของสาหร่าย

สาหร่ายสีเขียวนี้สามารถพบได้ทั่วไปแทบทุกหนทุกแห่ง ประมาณกันว่า 10% ของสาหร่ายสี เขียวทั้งหมดเป็นสาหร่ายทะเล ซึ่งเจริญแตกต่างกันตามอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสง และความ สมบูรณ์ของอาหาร สาหร่ายสีเขียวที่เป็นสาหร่ายทะเลมักพบในบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง อาจจะมี บ้างที่พบในระดับความลึกถึง 300 ฟุต ส่วนอีก 90% ของสาหร่ายทั้งหมดจะเป็นสาหร่ายน้ำจืด หรือ สาหร่ายที่ขึ้นอยู่บนสภาพแวดล้อมที่เป็นอากาศก็ได้ สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดอาจจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นๆ หรือในน้ำลึกที่แสงส่องถึง และหลายชนิดมีสภาพเป็นแพลงก์ตอนพืช บางชนิดก็ขึ้นอยู่บนก้อนหิน ทราบ โคลน เปลือกหอย บนพืชหรือสัตว์อื่น หรืออาจเจริญอยู่ในพืชหรือสัตว์ก็ได้ อาจขึ้นอยู่ในดิน หรือในเปลือกไม้แตก บางชนิดสปอร์อาจปนมากับฝุ่นละออง และบางชนิดอาจจะพบอยู่ในหิมะหรือ ในน้ำแข็งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสีเขียวนี้เป็นดิวิชันที่มีสมาชิกมาก กล่าวคือ มีประมาณ 450 จีนัส และ 7000 สปีชีส์ (Bold and Wynne, 1978) แต่ละจีนัสมีความแตกต่างกันมากทั้งรูปร่าง โครงสร้าง และการสืบพันธุ์

Ulva intestinalis

สาหร่ายชนิดนี้มีชื่อภาษาไทยว่า สาหร่ายไส้ไก่ เพราะทลัสต์มีลักษณะเป็นหลอดกลวงคล้าย ลำไส้ มีความหนาเพียง 1 ชั้นของเซลล์ บางชนิดทลัสต์เรียบ แต่บางชนิดหึงงอ ยึดติดกับพื้นโดยใช้ไรซอยด์ พื้นที่ยึดเกาะอาจเป็นก้อนหิน เปลือกหอย เศษไม้ หรือไม้น้ำอื่นๆ เป็นสาหร่ายทะเลแทบทั้งหมด แต่ก็มีที่เป็นสาหร่ายน้ำจืด เมื่ออายุมากขึ้นอาจหลุดลอยขึ้นมาตามผิวน้ำ ในขณะที่งอกขึ้นมาเป็นทลัสต์ใหม่ๆ เส้นสาขจะเป็นลักษณะที่เซลล์เรียงต่อกันเป็นแถวเดียว แต่เมื่อมีการแบ่งเซลล์หลายแนวจะเกิด เซลล์หลายแถว มีความหนา 2 ชั้น ต่อมาความหนา 2 ชั้นจะแยกกันเกิดเป็นหลอดกลวงตรงกลาง

สารออกฤทธิ์ที่พบใน *U. intestinalis* ส่วนใหญ่ได้แก่ monoterpenoids, phlorotannins และ phenolic compounds (Taskin *et al.* 2007) Patra *et al.* (2009) รายงานว่าสารสกัดขยายจาก *Enteromorpha compressa* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกคือ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus brevis* และแกรมลบคือ *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* และ *E. coli* ได้ และมีการใช้ *U. intestinalis* ไปเป็นแหล่ง bioactive compounds ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดโรคใบด่างในพืช และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเนื่องจาก *U. intestinalis* สามารถผลิตก๊าซมีเทนได้ (Saad *et al.* 2006) นอกจากสารสกัดจากสาหร่ายยังพบสารกลุ่ม monoterpenoids ได้ในสารสกัดจากพืช เช่น ยี่ห่วย กานพลู กระเทียม และใบมะนาว เป็นต้น อนุพันธ์ของสารกลุ่มนี้คือ eugenol, carvone, borneol, carveol, benzyl alcohol, thymol, camphor, menthol, chlorothymol, cinnamaldehyde, carvacrol, cineol และ citronellol ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่ออกฤทธิ์ฆ่าไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ได้ดี (Saad *et al.* 2006)

U. rigida

สาหร่ายชนิดนี้มีชื่อเป็นภาษาไทยว่า สาหร่ายเขว และสาหร่ายผักกาดทะเล เป็นสาหร่ายสีเขียว ที่มีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ มีความหนา 2 ชั้นของเซลล์การเจริญเติบโต โดยมีการแบ่งเซลล์ทั้งในแนว กว้างและในแนวยาว จึงแผ่ออกเป็นแผ่นและมีรอยจีบอยู่ตรงขอบ มีปริมาณโปรตีน 20-30% สุวรรณ และคณะ (2552) รายงานว่า สาหร่ายผักกาดทะเลมีประโยชน์ทั้งในแง่ที่เป็นอาหารมนุษย์ ทำน้ำ จุลินทรีย์ และใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ นอกจากนี้ สุพิศ และคณะ (2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับอาจารย์ผู้สอนเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์อื่นใดได้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ และใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ นอกจากนี้ สุพิศ และคณะ (2545) ไม่ว่าจะพิมพ์ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าสาหร่าย *U. rigida* ที่เลี้ยงในบ่อเพาะเลี้ยงหอยเป่าสื่อทำให้ปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในบ่อลดลง นอกจากนี้ *Ulva* sp. ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งพบว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นเมื่อกินอาร์ทีเมียที่กิน *Ulva* sp. เป็นอาหาร (Immanuel et al. 2004)

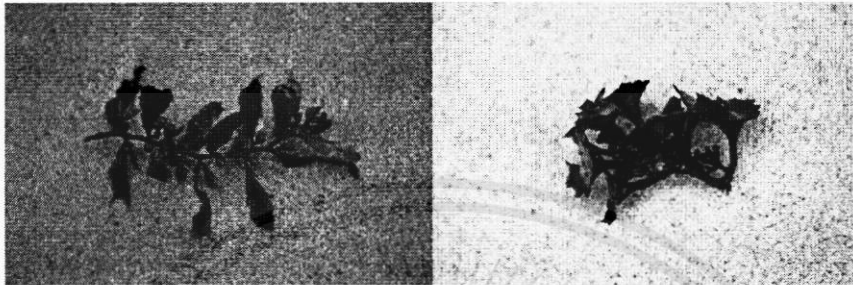
Caulerpa lentillifera

สาหร่ายชนิดนี้มีชื่อเป็นภาษาไทยว่า สาหร่ายช่อพริกไทย หรือสาหร่ายพวงองุ่น มีรูปร่างเป็นเม็ดสีเขียวกลมๆเล็กๆอยู่รวมกันเป็นพวงบนก้านคล้ายช่อพริกไทยหรือพวงองุ่น เป็นสาหร่ายทะเลที่มีความสำคัญในระบบนิเวศในแง่ของระบบห่วงโซ่อาหาร โดยเป็นอาหารของสัตว์ทะเลและนอกจากนี้ยังช่วยบำบัดน้ำเสียได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่มีการปลดปล่อยก๊าซออกซิเจนคืนสู่ระบบนิเวศได้อีกทางหนึ่ง (พนิดา แก้วมาลา. 2553) มักขึ้นอยู่ตามพื้นทรายปนโคลนหรือขึ้นเกาะตามซากปะการัง สามารถรับประทานเป็นผักสลัด หรือผักจิ้มน้ำพริกได้ Ratana-arporn and Chirapart (2006) รายงานว่า *C. lentillifera* ประกอบด้วยโปรตีน 12.49% และประกอบไปด้วยสารไอโอดีน โพลีแซคคาไรด์ วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า *C. lentillifera* เป็นสาหร่ายสีเขียวที่นิยมใช้ในบ่อบำบัดน้ำสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งสาหร่ายสามารถกำจัดไนโตรเจนออกจากน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ได้รับแสงอย่างเหมาะสม (ได้รับแสงไม่เกิน 250 micromol photon/m[superscript 2]/s) โดยสามารถกำจัดไนโตรเจนออกจากระบบได้ประมาณร้อยละ 25 ทำให้น้ำมีคุณภาพดี ปริมาณแอมโมเนียต่ำ และไม่มีการสะสมของไนโตรท์ ในเครท และฟอสเฟต นอกจากนี้ยังพบว่า *C. racemosa* และ *C. prolifera* ที่สกัดด้วย methanol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้โดยเกิด clear zone ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 และ 9 mm ตามลำดับ (Freile-Pelegrin and Morales. 2004)

สาหร่ายสีน้ำตาล

สีน้ำตาล หรือ Brown algae จัดอยู่ในดิวิชัน Phaeophyta ลักษณะทั่วไปเป็นสาหร่ายหลายเซลล์ ลักษณะเป็นเส้นสายต่อกันออกเป็นกิ่งก้านคล้ายพืช (รูปที่ 2.9) มีผนังเซลล์ ประกอบด้วยชั้นของเซลล์ลูโลส (cellulose layer) หรือเยื่อหุ้มที่เป็นเพกติน ในคลอโรพลาสต์ประกอบด้วยรงควัตถุพวก แคโรทีนอยด์สูง คลอโรฟิลล์ เอ และ ซี แซนโทฟิลล์ บางชนิดเป็นอาหารได้ เช่น *Ectocarpus*, *Laminaria*, *Macrocystis*, *Nereocystis*, *Postelsia palmiformis* หรือรู้จักในนามของ สาหร่าย เกลปี (kelp) สาหร่ายสีน้ำตาลเป็นสาหร่ายที่มีขนาดใหญ่ ส่วนมากมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแกมเขียวแก่เนื่องจากสีของคลอโรฟิลล์ถูกพวกฟูโคแซนทิน แคโรทีนอยด์ และแซนโทฟิลล์ บดบังหมดพวกนี้เป็นพืชในทะเล

เกือบทั้งหมดมีเพียง 3-4 ชนิดเท่านั้นที่อยู่ในน้ำจืด รูปร่างของสาหร่ายสีน้ำตาลมีหลายแบบหลายชนิด แตกต่างกันไปโครงสร้างของสาหร่ายมีวิวัฒนาการมากกว่าชนิดอื่น



รูปที่ 2.9 สาหร่ายสีน้ำตาล

ที่มา : กล้องดิจิทัล กำลังขยาย 10x

สาหร่ายสีน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่ ได้แก่ *Sargassum* sp. และ *Dictyota* sp. ภายในเซลล์ของสาหร่ายกลุ่มนี้มีรงควัตถุพวกฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) สารสกัดกลุ่มที่ออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม lipophilic compound และสาร betain ซึ่งสามารถเพิ่มความต้านทานเชื้อโรคและหนอนซึ่งเป็นศัตรูพืชได้ (Blunden, 1994) สารสกัดหยาบจาก *Sargassum fluitans* ที่สกัดด้วย petroleum ether พบว่ามีสาร lipophilic compound เป็นองค์ประกอบสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* และ *S. epidemidis* ได้ (Oranday et al. 2004) Chiheb et al. (2009) พบว่าสารสกัดจาก *Dictyota linearis* สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ได้โดยสามารถต้านเชื้อ *E. coli* ได้สูงกว่าสารสกัดจาก *Sargassum vulgare* และสารที่ได้จากกระบวนการ secondary metabolites มีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง ไวรัส และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น acrylic acid, halogenated aliphatic compounds และ terpenes ของ *Dictyota* sp. Tuney et al. (2006) รายงานว่าสารสกัดจาก *Dictyota linearis* สามารถต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีกว่าสารสกัดจาก *Enteromorpha*

สาหร่ายสีแดง

สาหร่ายแดง เป็นสาหร่ายที่มีลักษณะประาะบาง สีจางเร็ว มีเม็ดสีประกอบซึ่งสามารถดูดแสงในช่วงคลื่นสีน้ำเงิน และสีม่วงกระจายอยู่ในช่วงลึกทะเล พบในทะเลที่น้ำค่อนข้างลึกและเย็นเพราะสามารถสังเคราะห์แสงได้ที่ความลึก ประมาณ 40-60 m บางชนิดขึ้นอยู่บนแอ่งน้ำบนหิน ลักษณะรูปร่างส่วนมากจะแบนบางชนิดคล้ายกระบองมีหลายชนิดที่นำมาต้ม แล้วได้สารวุ้นที่เรียกว่า "อการ์-อการ์" มีประโยชน์ในด้านการทำอาหารและศึกษาทางด้านแบคทีเรียวิทยา เม็ดสีของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครู ใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ แซนโทฟิลล์ แคโรทีน และไฟโคอีริทรินประกอบด้วยไฟโคไซยานิน สีของพืชจะเห็นเป็นสีแดง

ยังไม่พบรายงานการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายในการควบคุมไรฝุ่น แต่ได้มีมีการศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chondrus crispus*, *Ulva fasciata*, *Chaetomorpha antennina*, *Enteromorpha compressa*, *Helimeda gracilis*, *Enteromorpha intestinalis*, *Caulerpa toxifolia*, *Amphirova anceps*, *Gracilaria edulis*, *Laurencia papillosa*, *Sargassum illicifolium*, *Padina gymnospora*, *Sargassum flavican linza* และ *Dictyota dichoderma*. ต่อระบบทางเดินอาหารของหนอนหนอนใยผัก *Plutella xylostella* (Linnalus) พบว่าสาหร่าย *Chondrus crispus*, *Gracilaria edulis* และ *Sargassum illicifolium* มีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนตาย 80% โดยเข้าไปทำลายระบบทางเดินอาหาร ทำลายการทำงานลำไส้และกระเพาะของหนอน (Babuselvam and Ravikumar. 2009) นอกจากนี้วัชรินทร์ ลือคำหาญ (2544) ศึกษาสารกำจัดศัตรูพืชจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. TISTR ที่สกัดจาก methanol ที่ระดับ 1, 3, 5, 7 และ 10% โดยใช้ฟุ้งกันจุ่มสาร สกัดทาลงบนใบคะน้าขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 3x5 cm ทั้งด้านบนและด้านล่างโดยใช้สารสกัดจากสะเคาเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำใบคะน้าไปเลี้ยงหนอนกระทู้หอมวัย 2 ที่ผ่านการอดอาหารนาน 4-6 ชั่วโมง สังเกตดูน้ำหนักและอัตราการตายของหนอนภายใน 4 วัน พบว่าหนอนมีอัตราการตายสะสมสูงสุดเท่ากับ 50% และหนอนที่รอดชีวิตมีน้ำหนักต่ำกว่าหนอนในชุดควบคุม 8-12 เท่า *Hapalosiphon* sp. TISTR มีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนกระทู้แต่ไม่รุนแรงนัก ซึ่งการตายของหนอนจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 เป็นต้นไป และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 3% เป็นต้นไป มีอัตราการตายสะสม 44-72%

2.10 ผลของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อปริมาณสารออกฤทธิ์

เนื่องจากอาหารเป็นปัจจัยในการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยเฉพาะองค์ประกอบของคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสและสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดจนกระทั่งสารอาหารเหล่านี้หมด (Schluter. 1998) สารอาหารเข้มข้นต่ำจึงส่งผลกระทบต่อกระบวนการสะสมอาหารซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโมเลกุลขนาดใหญ่ (Macromolecules) เช่น ไนโตรเจนที่มีปริมาณจำกัดจะส่งผลให้ปริมาณโปรตีนลดลงแต่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและไขมันเพิ่มขึ้น (Stehfest et al. 2005) และฟอสฟอรัสที่มีปริมาณจำกัดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันลดลง (Kozłowska-Szerenos et al. 2004) โดยปกติแล้วอายุของเซลล์สาหร่ายมีผลต่อชนิด ปริมาณ และองค์ประกอบของสารต่างๆ หรืออาหารสะสมในเซลล์สาหร่ายและมีผลต่อปริมาณพอลิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แฉีกคาไรด์ หากมีพอลิแฉีกคาไรด์มากจะส่งผลให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น ซึ่งพอลิแฉีกคาไรด์ที่ถูกสร้างโดยเซลล์สาหร่ายจะสะสมอยู่ในเซลล์ของสาหร่ายและมีบางส่วนเคลือบบนผิวเซลล์ (สุนีรัตน์ เรื่องสมบูรณ์. 2549) เช่นในสาหร่าย *Sargassum fusiforme* พบว่าสามารถต้านเชื้อไวรัสโอโนกุงได้สูงขึ้นเมื่อพบปริมาณพอลิแฉีกคาไรด์มากขึ้น (Oranday et al. 2004)

ธาตุอาหารสำหรับสาหร่าย (algal nutrition)

จากการที่สาหร่ายสามารถเปลี่ยนระบบเมแทบอลิซึมได้ตามสภาวะแวดล้อมทำให้การศึกษาทางด้านความต้องการธาตุอาหารของสาหร่ายค่อนข้างเปลี่ยนแปลง โดยปกติโภชนาการของสิ่งมีชีวิตทั่วไปจะมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ สิ่งมีชีวิตที่สร้างอาหารได้เองโดยไม่ต้องอาศัยอาหารจากแหล่งอื่น (autotrophy) และสิ่งมีชีวิตที่ได้รับอาหารจากแหล่งอื่น (heterophy) จุลินทรีย์ที่สร้างอาหารได้เองจะใช้อาหารในรูปของธาตุอาหารที่เป็นสารอนินทรีย์และได้พลังงานจากแสงหรือจากการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ที่สร้างโดยสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Nelson and Lewin, 1974) สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการสารอาหารแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะมีแร่ธาตุอาหารในปริมาณที่สูงกว่าระดับที่พบในธรรมชาติมาก ระดับแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จะเปลี่ยนแปลงเสมอขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น ความหนาแน่นของเซลล์ แสง อุณหภูมิ และพีเอช โดยเฉพาะแสงมักเป็นปัจจัยที่จำกัดปริมาณเซลล์สูงสุดของสาหร่าย ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของสาหร่ายมีดังนี้

ไนโตรเจน (nitrogen)

ไนโตรเจน มีหน้าที่หลักคือ ช่วยในการสังเคราะห์ด้วยแสง สร้างรงควัตถุ ช่วยในกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปไนโตรเจนมีประมาณ 7 – 10% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์จะมีไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีปริมาณเป็นสองรองจากคาร์บอน (ไม่นับไฮโดรเจนและออกซิเจน) ในสาหร่าย (ยกเว้นพวกไดอะตอม) ที่เจริญอยู่ในระยะ exponential จะมีไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 7-10% และคาร์บอนอยู่ประมาณ 50% ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนั้นยังพบน้ำมัน (oil) พอลิแฉีกคาไรด์ (Vaccaro, 1965) สารประกอบไนโตรเจนหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอนินทรีย์และสารอนินทรีย์สามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ตั้งแต่แก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้ในเตรต (NO_3^-) ไนไตรต์ (NO_2^-) แอมโมเนีย (NH_4^+) และยูเรีย [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] ได้จนถึงกรดอะมิโน เช่น glycine, serine, alanine, glutamic acid และ aspartic acid (Thomas, 1968 ; Wheeler and North, 1974 ; Neilson and Larson, 1980) และกรดนิวคลีอิก เช่น purine และ pyrimidine ที่สาหร่ายบางชนิดนำไปใช้ได้ เมื่อใช้แอมโมเนียในการเลี้ยงสาหร่ายพีเอชของน้ำจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออนออกมาจาก

กระบวนการดูดซึมแอมโมเนียเข้าไปในเซลล์ทำให้พีเอชเป็นกรดและยับยั้งการเจริญของสาหร่ายเป็นส่วนใหญ่ ในทางปฏิบัติจึงไม่ควรใช้แอมโมเนียเกินกว่า 1 mM เนื่องจากความเป็นพิษของสารประกอบนี้ ดังนั้นไนเตรตจึงเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ที่สุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่างๆไป ซึ่งก็อาจมีปัญหาเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของพีเอช แต่โดยปกติแล้วสาหร่ายสามารถทนสภาพที่เป็นเบสได้ดีกว่าสภาพที่เป็นกรดและสาหร่ายบางชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการพีเอชสูงในการเจริญสำหรับยูเรียที่มีราคาถูกกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจนอื่นๆก็สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช ในกรณีที่เกิดการขาดไนโตรเจนระหว่างการเจริญ สาหร่ายสามารถนำสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในเซลล์มาใช้ในการแบ่งตัวได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะมีการนำโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ phycocyanin มาใช้ ทำให้ปริมาณไนโตรเจน (โปรตีนหรือ phycocyanin) ในเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และมีการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการผลิตสาหร่ายเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร โปรตีนจะต้องระมัดระวังเกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารต้องมีเพียงพอ

ฟอสฟอรัส (phosphorus)

ฟอสฟอรัสมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดพลังงาน ขบวนการสร้างกรดนิวคลีอิกของสาหร่าย โดยทั่วไปสาหร่ายต้องการใช้ฟอสฟอรัสในรูปของอนินทรีย์ฟอสฟอรัส (แต่ในน้ำธรรมชาติมีอยู่ในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัสมากกว่า) ถ้าขาดฟอสฟอรัสจะทำให้ปริมาณ โปรตีน คลอโรฟิลล์ เอ, RNA, DNA ของสาหร่ายลดลง ส่วนปริมาณแป้ง คาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น ทำให้รูปร่างเซลล์ของสาหร่ายเปลี่ยนแปลงไป โดยฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักอีกตัวหนึ่งซึ่งมักขาดแคลนระหว่างการเจริญของสาหร่าย ฟอสฟอรัสมีหน้าที่สำคัญในเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวกับการถ่ายทอดพลังงานและการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยปกติในแหล่งน้ำทั่วไปมักมีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (total phosphorus) อยู่ในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัสมากกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ (H_2PO_4 หรือ HPO_4^{2-} รวมเรียกว่า Pi) (Goldman and Jenkins, 1974) ปริมาณความต้องการ Pi ของสาหร่ายแตกต่างกันไป ขึ้นกับสายพันธุ์และสภาวะแวดล้อม ได้แก่ความเข้มข้นของ Pi ในอาหาร แสง พีเอช และระดับความเข้มข้นของไอออนโลหะอื่นๆ เช่น Na^+ , K^+ และ Mg^{++} เมื่อสาหร่ายเกิดการขาด Pi จะแสดงอาการคล้ายกับการขาดธาตุไนโตรเจนคือเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือปริมาณ โปรตีน คลอโรฟิลล์ เอ, ATP, RNA และ DNA ลดลง ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น โดยรวมแล้วปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดภายในเซลล์จะค่อยๆลดลง ในกรณีที่มีการขาดปริมาณฟอสฟอรัสอย่างรุนแรงอาจทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงด้วย เช่น ทำให้ขนาดและรูปร่างของเซลล์เล็กลง

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของงานบริการวิชาการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Demule *et al.* (1996) พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายที่มีไขมันสูงจะมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้สูงขึ้น ดังนั้นปริมาณไขมันน่าจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งในการเลี้ยงสาหร่ายในโตรเจน และฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณไขมันภายในเซลล์สาหร่าย ดังนั้นการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัสแตกต่างกัน จึงอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายมีความแตกต่างกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างทดลอง

นำตัวอย่างไรฝุ่น *D. pteronyssinus* (Trouessart), *D. farinae* และ *Bromia tropicalis* ตัวเต็มวัย สายพันธุ์ละ 1000 ตัว เก็บตัวอย่างในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C หรือจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

3.2 อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf Centrifuge 5804R; Eppendorf® , USA)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf Centrifuge 5417R; Eppendorf® , USA)
3. ไมโครเวฟ (Intellrowave; LG®, Thailand)
4. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 ° C (Whirlpool; Sanyo®, Thailand) และ -80 ° C (Thermo Scientific 995; Becthai®, USA)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (GeneAmp PCR system 2400; Applied Biosystems®, USA)
6. เครื่องอิลเล็กโตรโฟรีซิส (Sub-Cell GT; Bio-Rad®, USA)
7. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc TM XR; Bio-Rad® , USA)
8. gel chamber และ กถ่องพลาสติก เพื่อใช้สำหรับย้อมเจล
9. เครื่องรันเจล PAGE (MiniProtein 3 cell; Bio-Rad®, USA)
10. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Power PAC 300; Bio-Rad®, USA)
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (smartspect TM 3000; Bio-Rad®, USA)
12. เครื่องผสมสาร (Fine vortex; FinePCR®, Korea)
13. เครื่องชั่งอิลเล็กโทรนิค (Sartorius; Scientific Promotion® , Germany)
14. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (HEV-25/50; Hirayama® , Japan)
15. หลอด flacon tube ขนาด 15 ml และหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
16. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. สาหร่าย 15 สกุล คือ *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., *Padina* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina platensis* (food grade), *S. platensis* (animal feed), *Hapalosiphon* sp., *Mastigocladopsis* sp., *Caulerpa* sp., *Cladophora* sp., *Ulva intestinalis*, *U. rigida*, *Gracilaria* sp., *Fischerella* sp. และ *Acanthophora* sp.

19. อาหารเลี้ยงไรฝุ่น (อาหารหนูปดละเอียด จมูกข้าวสาลี และยีสต์)

19. ขวดเลี้ยงไรฝุ่น (mite bottle)

20. ตู้ควบคุมความชื้น (mite chamber)

21. ฟุ้งกันเบอร์ 0

22. ตู้อบความร้อน (Hot air oven รุ่น 1350FX, SHEL-LAB®)

23. เครื่องแก้วต่างๆ

24. ขวดโหลแก้วขนาด 10 L

25. หัวทราย

26. magnetic stirrer และ magnetic bar

27. น้ำกลั่น

28. เครื่องกลั่นระเหยสาร (Rotary evaporator)

29. ถังจลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

30. เครื่องกรองสุญญากาศ (suction pump)

31. ขวดรูปชมพู 120 มิลลิลิตร

32. ไมโครไปเปต

3.3 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

2. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ใน native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ภายใต้กระแสไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ของบริษัท Invitrogen® และ บริษัท Fermentas ®
4. ชุดสกัด genomic DNA (Genomic DNA from tissue; Nucleospin® tissue) ของบริษัท Machery-Nagel ®
5. ชุดแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ ชุดสกัด DNA ออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN®
6. ชุดสารเคมีที่ใช้ในการย่อยผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (เอนไซม์ *AluI* ของ บริษัท Roch®)
7. Methanol ของบริษัท J.T.Baker®
8. Hexane ของบริษัท J.T.Baker®
9. Dichloromethane ของบริษัท J.T.Baker®
10. Ethanol ของบริษัท J.T.Baker®
11. อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG11
12. สารละลายอิมิตัวของโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCL)

หมายเหตุ : รายละเอียดและการเตรียมอยู่ภาคผนวก ก

3.4 วิธีการ

3.4.1 การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยเทคนิค RFLP-PCR

3.4.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA)

นำตัวอย่างไรฝุ่น *D. pteromyssinus* (Trouessart), *D. farinae* และ *Bromia tropicalis* ตัวเต็มวัย สายพันธุ์ละ 1,000 ตัวมาสกัด DNA (DNA extraction) โดยใช้ DNA extraction kits (Genomic DNA from tissue ; Nucleospin[®] tissue) และนำสารละลาย DNA ไปวัดหาปริมาณ และคุณภาพของ DNA ที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร

3.4.1.1.1 การสกัด DNA โดยใช้ DNA extraction kits (Genomic DNA from tissue ; Nucleospin[®] tissue)

เตรียมตัวอย่างไรฝุ่นประมาณ 1,000 ตัว ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ในขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก (lysis) เติม buffer ALT ปริมาตร 180 μ l และสารละลาย proteinase K ปริมาตร 20 μ l จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดแล้วนำไป incubate ที่

อุณหภูมิ 56 ° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (โดยทำการ vortex เป็นระยะๆขณะที่ทำการ incubate) โดยในขั้นตอนการ adjust DNA binding conditions จะเติม 100 % ethanol ปริมาตร 200 µl ในหลอดตัวอย่าง และ vortex อย่างรวดเร็วเพื่อตกตะกอน DNA และทำการ bind DNA ด้วยการ โทลด์สารละลายที่ได้จากตัวอย่างในแต่ละหลอดใส่ใน NucleoSpin® Tissue Column ที่ประกอบด้วย collection tube และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง และทำการล้าง silica membrane โดยการล้างครั้งที่ 1 จะเติมสารละลาย buffer AW ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และเทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง ล้างครั้งที่ 2 เติมสารละลาย buffer AW2 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และทิ้งส่วนของเหลวที่ผ่านการกรอง จากนั้นทำให้ silica membrane แห้ง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 1 นาที เพื่อให้ column แห้ง และสุดท้ายในขั้นตอนการเก็บ DNA จะนำ NucleoSpin® tissue column ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่เตรียมไว้ และเติมสารละลาย elution buffer AE ปริมาตร 100 µl (นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อนนำมาปั่นเพื่อให้ได้ผลผลิต DNA เพิ่มขึ้น) จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และเก็บตัวอย่าง DNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 °C และนำไปวัดหาค่าความเข้มข้นของ DNA ต่อไป

3.4.1.1.2 การวัดหาปริมาณ DNA โดยใช้ spectrophotometer

การวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm โดย DNA สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 nm จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย DNA จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

ถ้าค่า A_{260} ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่ามีความเข้มข้นของ DNA สายคู่ (doublestranded DNA; dsDNA) เท่ากับ 50 ng/µl โดยคุณภาพของ DNA พิจารณาจากค่า A_{260}/A_{280} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของ DNA เทียบกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยกตามลำดับโดย DNA ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} ระหว่าง 1.8-1.9 (Kalp. 2002) ถ้ากว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลาย หรือถ้ามากกว่า 1.9 แสดงว่ามี RNA ปนอยู่ในสารละลาย

3.4.1.1.3 การตรวจวิเคราะห์ DNA โดยการวิธี agarose gel electrophoresis

ชั่งอะกาโรสนิคผง 0.6 g เติมสารละลาย 1xTAE buffer จำนวน 40 ml (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.5 % เจล; g/ml) ทำให้อะกาโรสละลายด้วยความร้อนโดยใช้เตาไมโครเวฟและทิ้งไว้ให้อุ่น (อุณหภูมิประมาณ 50 °C) เมื่อเริ่มอุ่นจึงเทเจลลงในถาด (tray) และวางหัว (comb) ไว้ทางส่วนบน

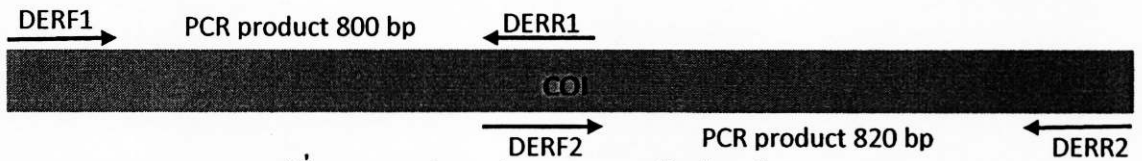
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เขียนขึ้นโดยนักวิจัยของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30- 45 นาที จึงถอดหรือออก จากนั้นนำเอาเจลไปวางบนเครื่องแยกขนาดชิ้นส่วน DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าตามแนวราบ เทสารละลาย 1X TAE buffer ลงในเครื่องจนท่วมแผ่นเจล และทำการผสมตัวอย่าง DNA กับสีติดตาม (6x loading dye) ในอัตราส่วน PCR product 5 µl ต่อสีติดตาม 2 µl บนกระดาษพาราฟิล์ม และหยอดลงในหลุมบนแผ่นเจล(1 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง) โดยใช้แถบ DNA มาตรฐานเป็น marker และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 100 v เป็นเวลา 50 นาที หรือจนสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลเคลื่อนที่มาถึงเกือบถึงขอบเจลอีกด้าน คือประมาณ 1-2 cm เมื่อเสร็จสิ้นจึงนำเจลที่ได้ไปแช่น้ำย้อม DNA (ethidium bromide; EtBr 2 mg/ml) ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่าประมาณ 5 นาที และนำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่อง gel photodocumentation system ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของ DNA ที่ติดสีย้อม ethidium bromide ; EtBr จากนั้นบันทึกภาพและนำไปวิเคราะห์ผล

3.4.1.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน COI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนที่สนใจโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ให้มีจำนวนชิ้นยีนมากพอ เพื่อจำแนกสายพันธุ์ต่อไปโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่สนใจซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณปลายยีน COI ของ *D. pteromyssinus* (Trouessart) และ *D. farinae* ในฐานะข้อมูลจากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> แล้วเปรียบเทียบความเหมือนลำดับเบสของยีนไรฝุ่นทั้ง 2 ชนิด ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน COI ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ ใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด เนื่องจากยีน COI มีขนาดยาวถึง 1500 bp จึงต้องใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือบริเวณต้นยีนถึงกลางยีน และจากกลางยีนถึงปลายยีน (ซึ่งลำดับเบสตรงตำแหน่งการเกาะของไพรเมอร์บริเวณต้นยีนและปลายยีนบนแม่พิมพ์ที่ออกแบบจะมีตำแหน่งจับอยู่บนอกส่วนของยีน) ไพรเมอร์ คือ DERF1 (5' TAATGCRAAGAGTTTAAGCC 3') DERR1 (5' GGCTCAATYTTTATTACTATAAAAACC 3') DERF2 (5'GGTTTTTTGGTCAYCCTGAGG 3') DERR2 (5'CAAGCYTCMACATTAGTGTG 3') (ตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR

No.	Name	Sequences (5' -3')	Product (bp)	Tm (° C)
1	DERF1	TAATGCRAAGAGTTTAAGCC	800	47.8
	DERR1	GGCTCAATYTTTATTACTATAAAACC		47.8
2	DERF2	GGTTTTTGGTCAYCCTGAGG	820	47.8
	DERR2	CAAGCYTCMACATTAGTGTG		47.8

กระบวนการในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ต้องอาศัยสารละลายที่มีส่วนประกอบ และสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมดังนี้ (ตารางที่ 3.3)

1. Initial denaturation อุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาที 1 รอบ เพื่อเตรียม DNA ต้นแบบให้แยกเป็น DNA สายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์

2. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการ โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสประกอบด้วย

denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 1 นาที	}	35 รอบ
annealing ที่อุณหภูมิ 47.8 °C นาน 1 นาที		
extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที		

3. Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 10 นาที 1 รอบ

4. เก็บผลิตภัณฑ์ที่ 4 °C และทำการเพิ่มปริมาณสาร DNA โดยใช้เครื่องเครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (GeneAmp PCR system 2400; Applied Biosystems®, USA) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบ DNA ที่สกัดได้ กับแถบ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Invitrogen®) โดยคาดว่าชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 800 เมื่อใช้ไพรเมอร์ DERF1 และ DERR1 ขนาด 820 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ DERF2 และ DERR2 และ 1,500 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ DERF1 และ DERR2

3.4.1.3 Sensitivity ของ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนที่ COI ของ *D. pteronyssinus* (Trouessart) และ *D. farinae* ด้วยไพรเมอร์ DERF1 (5' TAATGCRAAGAGTTTAAGCC 3') และ DERR1 (5' GGCTCAATYTTTATTACTATAAAACC 3') โดย DNA template ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เป็น dilution DNA ที่ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1 และ -1 เท่า

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Substance	Volume (μ l)
10X <i>Taq</i> buffer	1.5
2 mM dNTP	1.5
25mM MgCl ₂	1.5
10 μ M forward primer	1
10 μ M reverse primer	1
<i>Taq</i> DNA polymerase; Invitrogen® (5U/ μ l)	0.2
DNA template (200 ng/ μ l)	3
dH ₂ O	5.3
Total	15

ตารางที่ 3.3 แสดง Thermal cycler condition

Step	Time (min)	Temp (°C)
Initial PCR activation step:	3	95
3-step cycling		
Denaturation:	1	95
Annealing:	1	47.8
Extension:	1	72
Number of cycles: 35 cycles		
Final extension:	10	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ โฆษณาด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.4 การสกัดแยก DNA ออกจากอะกาโรสเจลและการทำให้บริสุทธิ์

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วย 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบ DNA ที่สกัดได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับแถบ DNA มาตรฐาน และทำการสกัดแยก DNA ที่ต้องการออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยทำตามวิธีในคู่มือของ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) ดังนี้ โดยเริ่มจากการตัดแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ใส่หลอด microcentrifuge เดิมบัฟเฟอร์ Binding ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด เติม isopropanol (1 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง) ปิเปตสารละลายที่ได้ใส่ใน spin column ที่ประกอบด้วยหลอด collection tube ปริมาตร 2 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ wash buffer ปริมาตร 750 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ spin column แห้งที่ความเร็วสูงสุดหรือประมาณ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที และย้าย spin column ใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เดิม บัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที และทำการตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วย 1% agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบ DNA ที่สกัดได้กับแถบ DNA มาตรฐาน

3.4.1.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์ PCR

ใช้ไพรเมอร์ DERF1 (5'TAATGCRAAGAGTTTAAGCC3') DERR1 (5'GGCTCAATYTTTATTACTATAAAAACC 3') DERF2 (5'GGTTTTTTGGTCAYCCTGAGG 3') DERR2 (5'CAAGCYTCMACATTAGTGTG 3') เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นทำการตัดเฉพาะบริเวณยีน COI ที่ต้องการด้วยโปรแกรม BioEdit และ ClustalX และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลบนอินเทอร์เน็ตด้วยโปรแกรม BLAST (basic local alignment search tools) เป็นโปรแกรมสำหรับการค้นหาบริเวณเฉพาะที่เหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจกับฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างและเหมือนภายในสายพันธุ์และ

ระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีน โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (global alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW และโปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ระบบวินโดวส์ คือ ClustalX1.83 และ BioEdit เป็นต้น

3.4.1.6 การวิเคราะห์ความหลากหลายของไรฝุ่นด้วยวิธี PCR-RFLP

เป็นวิธีวิเคราะห์ความหลากหลาย (polymorphism) ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจโดยดูจากความยาวที่แตกต่างกันของ DNA เมื่อผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยจากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ COI ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primer 1 คู่ จากนั้นนำ DNA ที่ได้ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AluI* ตัดที่ตำแหน่ง AG CT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เลือกจากการใช้โปรแกรม NEB Cutter (สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) คูตำแหน่งเอนไซม์ที่เหมาะสมและ ทำนายขนาดและจำนวนชิ้น DNA หลังด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยในปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 15 μ l ประกอบด้วย ผลผลิตพีซีอาร์, สารละลาย 10x fastdigest buffer (pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37°C), เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ความเข้มข้น 10 U/ μ l และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วนตามตารางที่ 3.5 จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที และตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดเอนไซม์ด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) แล้วย้อมเจล ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใตแสงอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 3.4 อัตราส่วนของสารในการย่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วย *AluI*

Substance for COI analysis	Volume/reaction (μ l)
10x fastdigest buffer	1
<i>AluI</i> enzyme (10 U/ μ l)	0.5
PCR product (400 ng/ μ l)	5
ddH ₂ O	8.5
Total	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.5 อัตราส่วนของสารใน 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Substance	Volume (ml)
ddH ₂ O	2.635
30% acrylamide	1.33
5x TBE buffer	1
10% ammonium persulfate	0.035
TEMED	0.175
Total	5

3.4.1.7 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ว่ามีค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับซีเอ็น COI ของไรฝุ่นในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% identities) จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณซีเอ็น COI ระหว่างสายพันธุ์ *D. pteromyssinus* (Trouessart) และ *D. farinae* ด้วยโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มซีเอ็นแบบเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (global alignment) โดยใช้โปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ระบบวินโดวส์ คือ ClustalX1.83, BioEdit และ GeneDoc version 2.7.000 เป็นต้น วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้มีการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ดังนี้

1. BlastN ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ที่ใช้ในการศึกษาเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลทั้งหมด ซึ่งผลการตรวจสอบความเหมือนที่ได้รับจากโปรแกรม BlastN ที่ถูกต้องนั้นจะถูกตัดสินผ่านการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยคิดจากค่าคะแนน (scoring) ของ random hits และโปรแกรม Primer-BLAST เพื่อหาข้อมูลและความเหมือนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ โดยสามารถเข้าถึงได้ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. โปรแกรม The Bio-Web Sequence Cleaner เพื่อจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ไม่ให้มีช่องว่าง (space), tab, ตัวเลข หรือ แม้กระทั่งเปลี่ยนอักษรตัวเล็กเป็นตัวใหญ่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ ได้ที่ http://www.cellbiol.com/scripts/cleaner/sequence_cleaner.html

3. โปรแกรม Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator เพื่อคำนวณค่า Tm (melting temperature) ของ primer ที่ออกแบบ, ตรวจสอบการเกิด self-complementarity ของ primer ที่ออกแบบ โดยสามารถเข้าถึงได้ที่ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html> เป็นต้น

4. โปรแกรม NEBcutter V2.0 สำหรับหาคำแหน่งตัดและทำนายขนาดของนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยเข้าถึงได้ที่ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

5. โปรแกรม BankIt เพื่อเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ออนไลน์เข้าไปในฐานข้อมูล GenBank โดยสามารถเพิ่มได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>

6. โปรแกรมเปรียบเทียบความเหมือนโดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมด เช่น โปรแกรม Clustal W2 สำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีน โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนหรือเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด เข้าถึงการงานได้ที่ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> และใช้โปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานในระบบวินโดวส์ คือ ClustalX1.83, BioEdit เพื่อปรับแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

7. โปรแกรม MEGA 4.1 (beta3) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software V 4.1) เป็นลักษณะโปรแกรมที่ใช้งานได้โดยไม่เสียค่าบริการ โดยโปรแกรม MEGA 4.1(beta3) ได้รวบรวมเอาความสามารถและแอปพลิเคชัน ต่าง ๆ เช่น ClustalW ซึ่งช่วยในการศึกษาเปรียบเทียบสายลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนหลายสายในครั้งเดียว (computational sequence alignment) และวิธีในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้หลากหลายวิธี เช่น distance matrix, parsimony และ likelihood โดยโปรแกรมจะอนุญาตให้ผู้ใช้งานสามารถกำหนดค่า พารามิเตอร์ได้ตามต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถเชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ฐานข้อมูลชีวสารสนเทศได้โดยผ่านทางอินเทอร์เน็ตเบราว์เซอร์ โดยการติดตั้งโปรแกรม MEGA4.1 (beta3) นั้นสามารถเข้าถึงได้ที่ <http://www.megasoftware.net/features.html>. (Tamura *et al.* 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายกลุ่มต่างๆ ในการกำจัดไรฝุ่น

3.4.2.1 วิธีการเลี้ยงไรฝุ่น

ไรฝุ่น *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ที่ใช้ในการศึกษา เลี้ยงในขวดเลี้ยงไรฝุ่น (mite bottom) ซึ่งมีอากาศถ่ายเทได้สะดวกและป้องกันการเล็ดลอดของไรฝุ่นได้ดี เก็บขวดเลี้ยงไรฝุ่นไว้ในตู้ควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ (mite chamber) ซึ่งมีถาดพลาสติกใส่น้ำกลั่นผสม KCl อิ่มตัว เพื่อรักษาความชื้นภายในตู้และป้องกันการหลบหนีของไรฝุ่นออกนอกตู้ ทำการเปิดตู้นาน 30 นาทีทุกหนึ่งหรือสองวัน เพื่อให้อากาศภายในตู้ถ่ายเท โดยเลี้ยงไรฝุ่นที่อุณหภูมิ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ และความชื้นสัมพัทธ์ $86\pm 1\%$ อาหารที่ใช้เลี้ยงคืออาหารหนูบดละเอียด จมูกข้าวสาลี (wheat germ) และยีสต์ในอัตราส่วน 1:1:0.25 g ตามลำดับ

3.4.2.2 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่าย ได้แก่ *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp. และ *Dictyota* sp. โดยเก็บมาจากหาดค่ายเจษฎารายเจ้า อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 เก็บ *Padina* sp. จากอ่าวช่อ อ. อ่าวใหญ่ จังหวัดตราดเดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 เก็บ *Enteromorpha* sp. และ *Ulva* sp. จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดตราด เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 เก็บ *Gracilaria* sp. มาจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสมุทรสงครามในเดือนเมษายน พ.ศ. 2552 และเก็บ *Acanthophora* sp. และ *Caulerpa* sp. มาจากบรจรงฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทราในเดือนมิถุนายน 2552 จากนั้นนำสาหร่ายที่ได้มาตากแดดให้แห้งและอบที่อุณหภูมิ 60°C ประมาณ 1 ชั่วโมง และนำสาหร่ายที่อบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียด เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาสกัด

3.4.2.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina platensis*, *Hapalosiphon* sp., *Mastigocladopsis* sp. และ *Fischerella* sp. โดยเพาะขยายจาก stock ให้มีปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11 ปุ๋ยสูตรการค้า comercial grade เลี้ยงภายใต้แสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 30 ไมโครโพลตออนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ในโหลแก้วขนาด 10 ลิตร และมีการให้ฟองอากาศในขวดเพาะเลี้ยงตลอดเวลา เมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตเต็มที่ก็ทำการกรองเก็บสาหร่ายด้วยถุงกรองสาหร่าย หลังจากนั้นนำสาหร่ายที่ได้จากการกรองไปอบให้แห้งในเตาอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 5 วันเพื่อให้สาหร่ายแห้ง นำสาหร่ายที่อบแห้งแล้วมาบดละเอียด เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาสกัด

3.4.2.4 การสกัดสาหร่าย

นำสาหร่ายทั้ง 15 สกุล มาสกัดด้วยสารสกัด 3 ชนิด คือ methanol (มีขี้)100%, dichloromethane (กึ่งมีขี้) 100% และ hexane (ไม่มีขี้) 100% โดยเติม methanol 1000 ml ในสาหร่ายบดละเอียดประมาณ 100 g ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50°C โดยตั้งบนเครื่อง magnetic stirrer ให้หมุนตลอดเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองเอาส่วนของสารสกัดออกมาด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (suction pump) นำสาหร่ายส่วนกากไปผึ่งให้แห้งจากนั้นนำไปสกัดต่อด้วยสารตัวต่อไปคือ hexane และ dichloromethane ด้วยวิธีการเดิม นำสารสกัดที่ได้มากลั่นระเหยเอาส่วนของสารเคมีออกจากสารสกัดด้วยเครื่อง evaporator หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการทดสอบไรฝุ่นต่อไป

3.4.2.5 ทดสอบคุณสมบัติของการฆ่าไรฝุ่นโดยการสัมผัสในเบื้องต้น

นำสารสกัดหยาบมาละลายใน ethanol (มีขี้) 95% (เนื่องจาก ethanol ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและไรฝุ่น) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 % (0.32, 3.2 และ 32 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) แล้วเคลือบสารสกัด 15 μl ในกรงทดสอบไรฝุ่น (mite cage) ขนาด 4.7 cm^2 ทิ้งไว้ให้แห้ง ใช้ฟูกัน 1 เส้นขน สุ่มเขี่ยตัวเต็มวัยของไรฝุ่นเพื่อให้ได้ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่มีขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 10 ตัว ใส่ลงในกรงทดสอบไรฝุ่น หลังจากนั้นปิดกรงทดสอบไรฝุ่นทั้งสองด้านด้วยผ้ากรองเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองด้วย ethanol 95% ในแต่ละการทดลองจะทำการทดสอบ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนไรฝุ่นที่ตายที่ 24 ชั่วโมง

ตรวจลักษณะการตายของไรฝุ่นภายใต้กล้อง stereo microscope โดยการใช้ปลายฟูกันเขี่ยบริเวณลำตัว เพื่อดูการตอบสนองของไรฝุ่น คือ ไรฝุ่นมีชีวิต (sign of motility) จะแสดงการตอบสนองหรือเคลื่อนไหว โดยสามารถเดินได้อย่างน้อยเท่ากับความยาวของลำตัว (Knight et al., 1990) ขณะที่ไรฝุ่นไม่มีชีวิต จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง สีส้น เช่น ลำตัวแบน ขาหงิกงอ ไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหรือยับยั้งได้แต่ไม่สามารถเดินได้ภายหลังการสัมผัส (Welty et al., 1988) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่นตาม Abbott's formula (Abbott, 1925)

จัดลำดับประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นของสารสกัดจากสาหร่ายตามอัตราการตายของไรฝุ่น (ดัดแปลงจาก พรพิมล 2547) คือ กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงมีอัตราการตายของไรฝุ่นระหว่าง 70 – 100%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) และนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธีการ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการตายของไรฝุ่นจากสาหร่ายแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการตายของไรฝุ่นจากสาหร่ายชนิดเดียวกันที่ระดับของความเข้มข้นต่างๆ และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการตายของไรฝุ่นจากกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

การหาค่า LC_{50} (50% Lethal Concentration) กลุ่มของสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพดี โดยใช้โปรแกรม SPSS, Probit Analysis

3.4.3 ผลของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย

เลือกสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่นได้ดีที่สุดมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11 บัญการค่า CG เกรด ในสถานะที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นสารอาหาร โดยผันแปรปริมาณ $NaNO_3$ และ K_2HPO_4 คือ ลด $NaNO_3$ และ K_2HPO_4 เป็น 1/2 เท่า, $NaNO_3$ กับ K_2HPO_4 ปกติ (ชุดควบคุม) และเพิ่ม $NaNO_3$ และ K_2HPO_4 เป็น 2 เท่า ในโหลแก้วขนาด 10 L และมีการให้ฟองอากาศในโหลเพาะเลี้ยงตลอดเวลา โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรวมในวันที่ 0 และวันสุดท้ายที่เก็บผลผลิตเมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตเต็มที่ก็ทำการกรองเก็บสาหร่ายด้วยถุงกรองสาหร่าย หลังจากนั้นนำสาหร่ายที่ได้จากการกรองไปอบให้แห้งในเตาอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ $60^{\circ}C$ นาน 5 วันเพื่อให้สาหร่ายแห้ง นำสาหร่ายที่อบแห้งแล้วมาบดละเอียดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ จนกว่าจะนำมาสกัด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน COI

4.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน COI ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)

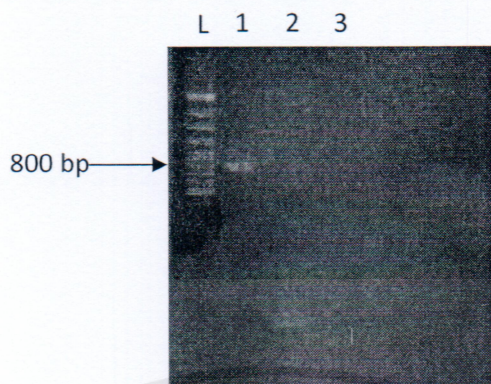
จากการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของชิ้นยีน COI ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ mitochondrial genomic DNA จากไรฝุ่นที่ได้จากการสกัดเป็น DNA ต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ DERF1 (5' TAATGCRAAGAGTTTAAGCC 3') DERR1 (5' GGCTCAATYTTTATTACTATAAAACC 3') DERF2 (5' GGGTTTTTGGTCAYCCTGAGG 3') DERR2 (5' CAAGCYTCMACATTAGTGTG 3') จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1.5 % agarose gel ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ คงที่ 100 V/cm เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ DNA มาตรฐาน 1 kb DNA Ladder, Invitrogen® พบว่าปรากฏแถบ DNA ของ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ที่มีขนาดประมาณ 800 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ DERF1 และ DERR1 820 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ DERF2 และ DERR2 และ 1500 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ DERF1 และ DERR2 (รูปที่ 4.1) ส่วน *Bromia tropicalis* ไม่ปรากฏแถบ DNA ทุกไพรเมอร์ที่ใช้ (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน COI ทำการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel โดย Lane L คือ DNA มาตรฐาน (1kb DNA Ladder) Lane ที่ 1-3 คือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ *Dermatophagoides pteronyssinus* Lane ที่ 4-6 คือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ *Dermatophagoides farinae* เมื่อใช้ไพรเมอร์ DERF1 และ DERR1, DERF2 และ DERR2, DERF1 และ DERR2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าตามลำดับ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

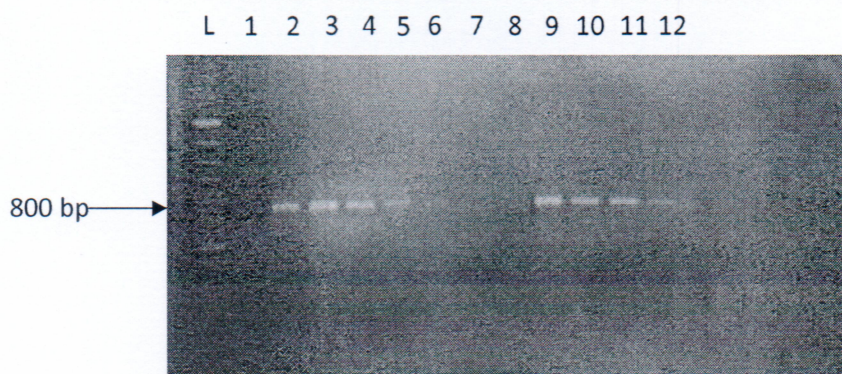


รูปที่ 4.2. ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน COI ของ *Bromia tropicalis* ทำการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel โดย Lane L คือ DNA มาตรฐาน (1kb DNA Ladder) Lane ที่ 1 คือ positive control Lane ที่ 2 และ 3 คือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ยีนยีน ของไรฝุ่น *Bromia tropicalis* เมื่อใช้ไพรเมอร์ DERF1 และ DERR1, DERF2 และ DERR2 ตามลำดับ

4.1.2 ผล sensitivity ของ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* เมื่อ dilution DNA

จากการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของยีนยีน COI ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ mitochondrial genomic DNA จากไรฝุ่น ที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.3.1 เมื่อสกัด DNA จากไรฝุ่น 1,000 ตัว และ dilution ลง 10 เท่า คือ 100, 10, 1 และ -1 ตามลำดับ เป็น DNA ดั้งแบบ และใช้ไพรเมอร์ DERF1 และ DERR1 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 V/cm เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ DNA มาตรฐาน 1 kb DNA Ladder, Invitrogen®) (รูปที่ 4.3) พบว่าปรากฏแถบ DNA ของ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ที่มีขนาดประมาณ 800 bp ซึ่งไม่ปรากฏแถบ DNA ที่ความเข้มข้น 1000 เท่า ของ *D. farinae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

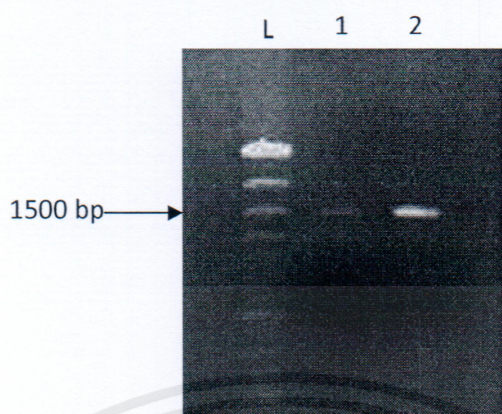


รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ได้จากการ dilution DNA บริเวณส่วนยีน COI ของ *Dermatomphagoides pteronyssinus* และ *Dermatomphagoides farinae* และทำการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel โดย Lane L คือ DNA มาตรฐาน (1kb DNA Ladder) Lane ที่ 1 คือ negative control Lane ที่ 2-6 คือ แถบ DNA ของ *Dermatomphagoides pteronyssinus* และ Lane ที่ 8-12 คือ แถบ DNA ของ *Dermatomphagoides farinae* เมื่อสกัด DNA จากไรฝุ่น 1,000 ตัว และ dilution ลง 10 เท่า คือ 100, 10, 1 และ -1 ตามลำดับ

4.1.3 ผลการทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

สกัดชิ้น DNA ตัวอย่างโดยการตัดแถบ DNA ที่มีขนาดที่ต้องการ (1500 bp) ออกจากเจล แล้วนำมาสกัดแยก DNA ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick gel extraction kit (QIAGEN®) เพื่อกำจัดแถบ DNA ที่ไม่จำเพาะหรือสิ่งปนเปื้อนออกจากแถบ DNA ที่ต้องการ แล้วทำการตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 V/cm เป็นเวลา 50 นาที แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ที่ทำให้บริสุทธิ์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb DNA Ladder, Fermentas® พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1500 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

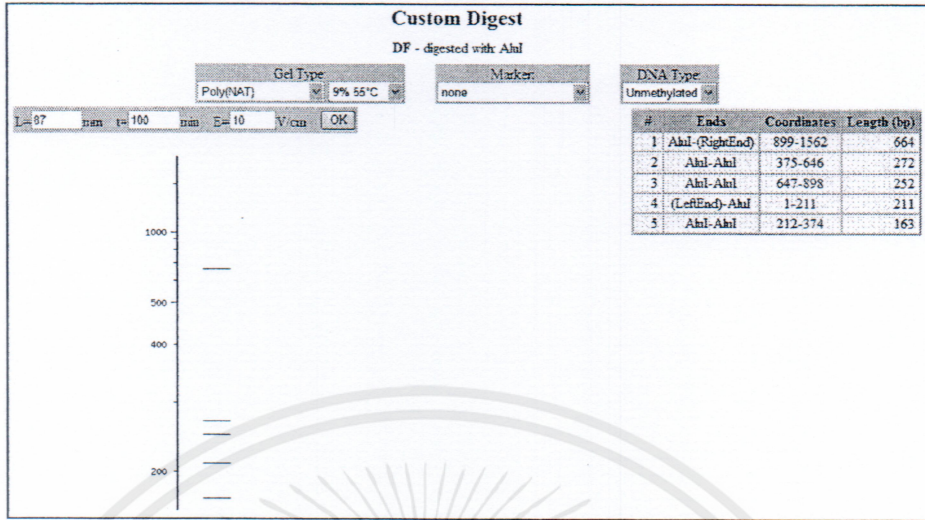


รูปที่ 4.4 ผลึกภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel โดย Lane L คือ DNA มาตรฐาน (100 นาโนกรัม 1 kb DNA Ladder) และ Lane ที่ 1คือ ผลึกภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ของ *Dermatophagoides pteronyssinus* และ Lane ที่ 2 คือ ผลึกภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ของ *Dermatophagoides farinae*

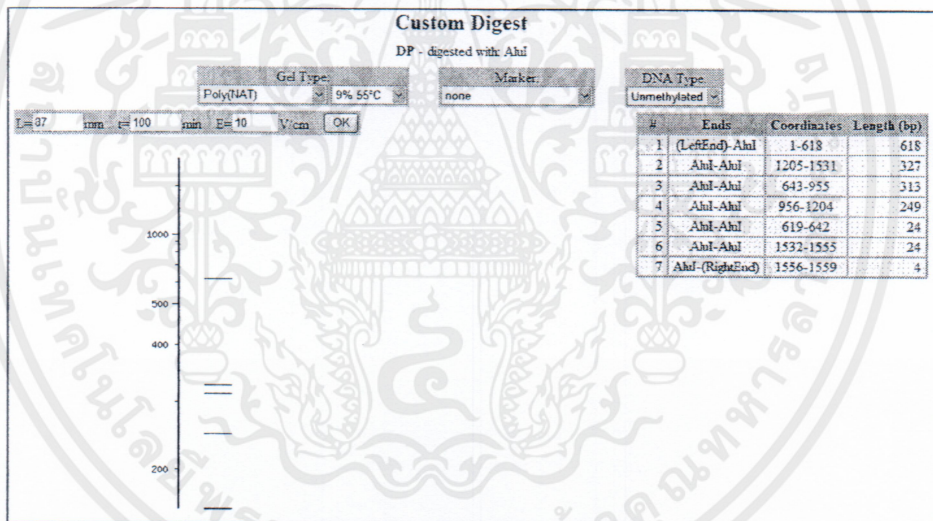
4.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของไรฝุ่นด้วยวิธี PCR-RFLP

การทดลองนี้ใช้โปรแกรม NEB Cutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) เพื่อทำนายชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งตัดภายในบริเวณยีน COI และเพื่อทำนายขนาด จำนวนชิ้น DNA และรูปแบบของ RFLP ที่ได้ โดยพบว่าหลังจากศึกษาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะและทดสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AhaI* พบว่าได้รูปแบบและความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ตัดแตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.1 (รูปที่ 4.5 และ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ตำแหน่งตัดภายในบริเวณยีน COI ของไรฝุ่น *Dermatophagoides farinae* ด้วยเอนไซม์ *AluI* ที่ทำนายโดยใช้โปรแกรม NEB Cutter

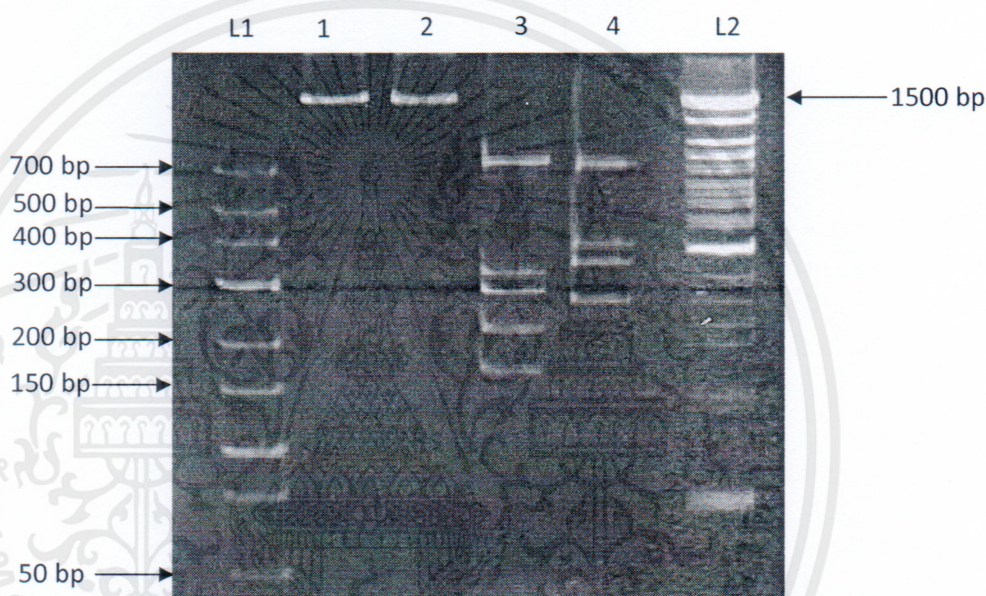


รูปที่ 4.6 ตำแหน่งตัดภายในบริเวณยีน COI ของไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* ด้วยเอนไซม์ *AluI* ที่ทำนายโดยใช้โปรแกรม NEB Cutter

ตารางที่ 4.1 ขนาดชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *AluI* ที่ทำนายโดยใช้โปรแกรม NEB Cutter

ไรฝุ่น	COI digested with <i>AluI</i>
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	664, 272, 252, 211 และ 163 bp
<i>Dermatophagoides farinae</i>	618, 327, 313, 249, 24, 24 และ 4 bp

และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในข้อ 4.1.1 นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาด DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดเอนไซม์ด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยให้ กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 V/cm เป็นเวลา 75 นาที แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับ DNA มาตรฐาน 25 และ 100 bp DNA Ladder (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ตรวจสอบด้วย 8% native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดย Lane L1 และ L2 คือ DNA มาตรฐาน (25 bp และ 100 bp DNA Ladder, Fermentas® ตามลำดับ) Lane ที่ 1-2 คือ ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermotophagoides pteronyssinus* และ *Dermotophagoides farinae*ตามลำดับ และ Lane ที่ 3-4 คือ ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermotophagoides pteronyssinus* และ *Dermotophagoides farinae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AluI* ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมไรฝุ่น

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence)

ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COI ของไรฝุ่นที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ DERF1 (5' TAATGCRAAGAGTTTAAGCC 3') ในด้าน forward และไพรเมอร์ DERR2 (5' CAAGCYTCMACATTAGTGTG 3') ในด้าน reverse เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นทำการตัดเฉพาะบริเวณยีน COI ที่ต้องการด้วยโปรแกรม BioEdit และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลบนอินเทอร์เน็ตด้วยโปรแกรม BLAST (basic local alignment search tools; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เป็นโปรแกรมสำหรับค้นหายีนเฉพาะที่เหมือนกันระหว่างลำดับเบสที่สนใจกับฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์บนระบบอินเทอร์เน็ต พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือเหมือน (% identities) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของ European House Dust mite (*D. pteronyssinus* และ *D. farinae*) พบว่า ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* เหมือนกับ European House Dust mite (*D. pteronyssinus*) EU884425 และมีค่า identities ที่ 98 %; ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* เหมือนกับ European House Dust mite (*D. farinae*) GQ465336.1 และมีค่า identities ที่ 99%

4.3.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ของไรฝุ่น

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบ (alignment) ความแตกต่างและความเหมือนภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีนแบบเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมด (global alignment) โดยใช้โปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ระบบวินโดวส์โดยการใช้โปรแกรม BioEdit จัดการลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการปรับแก้และรวมสาย DNA ที่ได้จากการ sequencing ซึ่งในกรณีนี้คือการจัดการลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์ และใช้โปรแกรม BioEdit สำหรับการหาคำแหน่งของไพรเมอร์หาคำแหน่งของยีน และตัดส่วนที่ไม่ใช่ยีนออก จากนั้นทำการปรับแก้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ชัดเจนออก และปรับสาย DNA ที่ได้ให้เป็นสาย 5' ไป 3' จึงเก็บข้อมูลของสาย DNA ที่ได้ในรูปแบบ .tex และ .fasta (แสดงตามตารางที่ 4.2) และใช้โปรแกรม Clustal W2 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับใช้งานบนอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> เพื่อดูความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแมลงวันหลังลายแต่ละสายพันธุ์ ว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ของของไรฝุ่น *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* โดยแสดงผล ดังรูป 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการเรียนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายต่อไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus*

4.4.1 ปริมาณสารสกัดหยาบ (crude extract) จากสาหร่าย 15 สกุล

จากการสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 15 สกุล ได้แก่ *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., *Padina* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade), *Hapalosiphon* sp., *Mastigocladopsis* sp., *Caulerpa lentillifera*, *Cladophora* sp., *Ulva intestinalis*, *U. rigida*, *Gracilaria* sp., *Fischerella* sp. และ *Acanthophora* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายคือ methanol, hexane และ dichloromethane (ตารางที่ 4.2) พบว่าสาหร่าย *Dictyota* sp. ที่สกัดด้วย methanol ให้ปริมาณของสารสกัดหยาบมากที่สุด คือ 17.68 g ต่อสาหร่ายแห้ง 200 g และ methanol เป็นตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารสกัดหยาบในสาหร่ายทุกชนิดสูงที่สุด

4.4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก methanol ต่อไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 15 สกุล ได้แก่ *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., *Padina* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *S. platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade), *Hapalosiphon* sp., *Mastigocladopsis* sp., *C. lentillifera*, *Cladophora* sp., *U. intestinalis*, *U. rigida*, *Gracilaria* sp., *Fischerella* sp. และ *Acanthophora* sp. ที่สกัดด้วย methanol โดยวิธีการสัมผัส ที่ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3) โดยพบว่าในสาหร่ายทุกชนิดสารสกัดที่ความเข้มข้น 1% ($32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่นได้สูงที่สุดโดยแตกต่างกับความเข้มข้น 0.1 และ 0.01% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพสูงโดยสามารถฆ่าไรฝุ่นได้มากกว่า 70% คือ สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Sargassum* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *S. platensis* (food grade), *S. platensis* (animal feed) และ *U. intestinalis* ที่สกัดด้วย methanol สามารถฆ่าไรตาย 83.9 ± 2.4 , 70.0 ± 2.2 , 99.0 ± 1.0 , 98.0 ± 1.3 , 85.8 ± 4.0 , 90.3 ± 3.5 และ $86.1 \pm 1.8\%$ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการตายของไรฝุ่นจากสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Oscillatoria* sp. มีประสิทธิภาพสูงสุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Phormidium* sp. และ *S. platensis* (animal feed) กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นปานกลางโดยสามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 50-69% คือสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Fischerella* sp., *Hapalosiphon* sp., *Mastigocladopsis* sp., *Padina* sp. และ *Acanthophora* sp. โดยสามารถฆ่าไรตาย 58.0 ± 2.1 , 67.0 ± 3.3 , 65.5 ± 2.5 , 53.0 ± 4.5 และ $63.6 \pm 3.2\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นต่ำคือสามารถฆ่าไรฝุ่นได้ต่ำกว่า 50% ได้แก่สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Turbinaria* sp., *Gracilaria* sp., *U. rigida*, *Cladophora* sp. และ *C. lentillifera* โดยสามารถฆ่าไรตาย 19.7 ± 3.5 , 40.6 ± 4.3 , 47.6 ± 5.6 , 35.0 ± 3.7 และ $45.7 \pm 3.2\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งพบว่าสาร

สกัดหยาบจากสาหร่าย *Turbinaria* sp. ที่ความเข้มข้น 1% มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่นต่ำที่สุดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดหยาบจากสาหร่ายอื่นๆ

4.4.3 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก hexane ต่อไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 15 สกุล ได้แก่ *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., *Padina* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *S. platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade), *Hapalosiphon* sp., *Mastigocladopsis* sp., *C. lentillifera*, *Cladophora* sp., *U. intestinalis*, *U. rigida*, *Gracilaria* sp., *Fischerella* sp. และ *Acanthophora* sp. ที่สกัดด้วยด้วย hexane โดยวิธีการสัมผัส ที่ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.4) โดยพบว่าในสาหร่ายทุกชนิดสารสกัดที่ความเข้มข้น 1% ($32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่นได้สูงที่สุด โดยแตกต่างกับที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.01% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดจากสาหร่าย *U. intestinalis*, *Turbinaria* sp. และ *Dictyota* sp. มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่นไม่แตกต่างกันทางสถิติซึ่งไม่พบกลุ่มสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพสูง กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นปานกลาง ได้แก่สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. และ *S. platensis* (animal feed) โดยสามารถฆ่าไรตาย 51.4 ± 4.4 , 52.0 ± 3.6 และ $50.7 \pm 3.7\%$ ตามลำดับ และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นต่ำ ได้แก่สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Sargassum* sp., *U. intestinalis*, *Turbinaria* sp., *Dictyota* sp., *Padina* sp., *Gracilaria* sp., *U. rigida*, *Cladophora* sp., *C. lentillifera* และ *Acanthophora* sp. โดยสามารถฆ่าไรตาย 15.4 ± 3.3 , 48.6 ± 5.5 , 15.3 ± 3.6 , 29.2 ± 4.4 , 24.9 ± 3.8 , 31.6 ± 3.4 , 34.9 ± 3.7 , 45.0 ± 3.4 , 28.0 ± 3.9 , 36.0 ± 2.7 และ $42.4 \pm 3.8\%$ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการตายของไรฝุ่นด้วยสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Turbinaria* sp. มีประสิทธิภาพต่ำที่สุดโดยไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Sargassum* sp.

4.4.4 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก dichloromethane ต่อไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 15 สกุล ได้แก่ *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., *Padina* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *S. platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade), *Hapalosiphon* sp., *Mastigocladopsis* sp., *C. lentillifera*, *Cladophora* sp., *U. intestinalis*, *U. rigida*, *Gracilaria* sp., *Fischerella* sp. และ *Acanthophora* sp. ที่สกัดด้วยด้วย dichloromethane โดยวิธีการสัมผัส ที่ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5) พบว่าที่ความเข้มข้น 1% ($32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทุกสกุลสามารถฆ่าไรฝุ่นสูงกว่าที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1% ยกเว้นสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *U. intestinalis* ที่ระดับความเข้มข้น 1% สามารถฆ่าไรฝุ่นได้โดยไม่แตกต่างทางสถิติกับที่ระดับความเข้มข้น 0.1% ซึ่งสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 15 สกุล ที่สกัดด้วย dichloromethane

ไม่พบสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูง กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นปานกลาง ได้แก่สารสกัด
 หยาบจากสาหร่าย *U. intestinalis* และ *Dictyota* sp. ซึ่งสามารถฆ่าไรตาย 60.0 ± 2.9 และ $50.6 \pm 3.9\%$
 ตามลำดับ และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นต่ำ ได้แก่สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Sargassum*
sp., *Turbinaria* sp., *Padina* sp., *Gracilaria* sp., *U. rigida*, *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *S.*
platensis (food grade), *S. platensis* (animal feed), *Cladophora* sp., *C. lentillifera*, *Hapalosiphon* sp.,
Mastigocladopsis sp., *Fischerella* sp. และ *Acanthophora* sp. โดยสามารถฆ่าไรตาย 41.4 ± 4.7 ,
 14.2 ± 3.1 , 16.5 ± 3.4 , 42.5 ± 4.9 , 41.1 ± 6.7 , 37.0 ± 3.7 , 48.6 ± 3.2 , 38.4 ± 4.3 , 46.0 ± 3.1 , 33.0 ± 2.6 , 30.0 ± 3.7 ,
 40.6 ± 2.6 , 44.5 ± 2.2 , 24.6 ± 3.7 และ $41.6 \pm 2.8\%$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่าย
Turbinaria sp. ที่ความเข้มข้น 1% มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่นต่ำที่สุด โดยไม่แตกต่างทางสถิติกับ
 สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Padina* sp. และ *Fischerella* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารสกัดหยาบ (g) ที่ได้จากสาหร่าย 15 สกุล ที่สกัดด้วย methanol, hexane และ dichloromethane (สกัดจากสาหร่าย 200 g)

ลำดับ	ชนิดสาหร่าย	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด		
		methanol	hexane	dichloromethane
1	<i>Oscillatoria</i> sp.	8.25	0.91	0.41
2	<i>Phormidium</i> sp.	3.28	0.74	0.67
3	<i>Spirulina platensis</i> (food grade)	12.11	2.04	1.07
4	<i>S. platensis</i> (animal feed)	10.87	1.25	1.11
5	<i>Mastigocladopsis</i> sp.	6.12	1.11	1.02
6	<i>Hapalosiphon</i> sp.	8.17	2.11	1.00
7	<i>Fischerella</i> sp.	8.64	2.18	1.86
8	<i>Gracilaria</i> sp.	4.75	0.63	0.92
9	<i>Acanthophora</i> sp.	4.99	1.20	1.12
10	<i>Caulerpa lentillifera</i>	8.23	2.41	0.89
11	<i>Ulva intestinalis</i>	8.57	1.68	1.24
12	<i>U. rigida</i>	6.64	0.81	0.84
13	<i>Cladophora</i> sp.	4.01	2.63	2.54
14	<i>Sargassum</i> sp.	6.99	1.00	0.90
15	<i>Turbinaria</i> sp.	2.80	1.30	0.77
16	<i>Padina</i> sp.	10.41	1.84	4.21
17	<i>Dictyota</i> sp.	17.68	1.04	0.93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* โดยสารสกัด จากสาหร่าย ที่สกัดด้วย methanol

ลำดับ	ชนิดสาหร่าย	ความเข้มข้นของสารสกัด (%)		
		1	0.1	0.01
1	Control (ethanol 95%)	0	0	0
2	<i>Oscillatoria</i> sp.	99.0±1.0 ^{aA}	78.0±3.6 ^{bAB}	60.0±3.9 ^{cA}
3	<i>Phormidium</i> sp.	98.0±1.3 ^{aA}	88.8±2.9 ^{aA}	53.6±3.5 ^{bAB}
4	<i>Spirulina platensis</i> (food grade)	85.8±4.0 ^{aAB}	61.4±3.5 ^{bB}	35.0±6.7 ^{cC}
5	<i>S. platensis</i> (animal feed)	90.3±3.5 ^{aA}	68.0±4.7 ^{bB}	50.0±4.9 ^{cB}
6	<i>Fischerella</i> sp.	58.0±2.1 ^{aC}	40.0±2.5 ^{bD}	34.0±3.5 ^{cC}
7	<i>Mastigocladopsis</i> sp.	67.0±3.3 ^{aC}	57.9±4.2 ^{bC}	41.5±3.2 ^{cBC}
8	<i>Hapalosiphon</i> sp.	65.5±2.5 ^{aBC}	57.6±1.8 ^{bC}	37.2±2.1 ^{cC}
9	<i>Gracilaria</i> sp.	40.6±4.3 ^{aE}	32.7±4.8 ^{aD}	11.1±4.1 ^{bE}
10	<i>Acanthophora</i> sp.	63.6±3.2 ^{aBC}	42.3±2.8 ^{bD}	36.0±4.0 ^{cC}
11	<i>Caulerpa lentillifera</i>	45.7±3.2 ^{aCD}	26.0±3.4 ^{bE}	18.1±3.2 ^{bD}
12	<i>Cladophora</i> sp.	35.0±3.7 ^{aF}	20.0±4.2 ^{bEF}	13.00±3.7 ^{bE}
13	<i>Ulva rigida</i>	47.6±5.5 ^{aCD}	38.6±4.7 ^{aD}	28.5±5.4 ^{bCD}
14	<i>U. intestinalis</i>	86.1±1.8 ^{aAB}	50.9±2.3 ^{bC}	32.95±19 ^{cC}
15	<i>Sargassum</i> sp.	83.9±2.4 ^{aAB}	69.4±4.3 ^{bB}	47.7±4.6 ^{cB}
16	<i>Turbinaria</i> sp.	19.7±3.5 ^{aG}	12.3±2.5 ^{bF}	12.1±2.6 ^{bE}
17	<i>Dictyota</i> sp.	70.0±2.2 ^{aB}	53.2±4.5 ^{bC}	51.5±3.5 ^{cB}
18	<i>Padina</i> sp.	53.00±4.5 ^{aC}	38.73±4.4 ^{bD}	17.91±3.3 ^{cD}

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวนอนเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* โดยสารสกัดจากสาหร่าย ที่สกัดด้วย hexane

ลำดับ	ชนิดสาหร่าย	ความเข้มข้นของสารสกัด (%)		
		1	0.1	0.01
1	Control (ethanol 95%)	0	0	0
2	<i>Oscillatoria</i> sp.	51.4±4.4 ^{aA}	38.0±3.9 ^{bB}	25.0±4.0 ^{cB}
3	<i>Phormidium</i> sp.	52.0±3.6 ^{aA}	38.2±3.6 ^{bB}	28.0±4.2 ^{cB}
4	<i>Spirulina platensis</i> (food grade)	45.0±3.4 ^{aAB}	35.0±3.9 ^{bB}	27.6±2.3 ^{cB}
5	<i>S. platensis</i> (animal feed)	50.7±3.7 ^{aA}	36.0±4.0 ^{bB}	28.0±4.7 ^{cB}
6	<i>Fischerella</i> sp.	30.3±2.1 ^{aC}	14.8±3.2 ^{bE}	9.1±3.1 ^{bC}
7	<i>Mastigocladopsis</i> sp.	54.5±1.3 ^{aA}	38.0±2.2 ^{bB}	23.3±1.1 ^{cB}
8	<i>Hapalosiphon</i> sp.	43.0±1.6 ^{aAB}	30.0±2.1 ^{bC}	12.1±2.1 ^{cC}
9	<i>Ācanthophora</i> sp.	42.4±3.8 ^{aAB}	36.44±3.5 ^{bB}	21.0±4.8 ^{cC}
10	<i>Gracilaria</i> sp.	31.6±3.4 ^{aC}	27.1±3.2 ^{bC}	12.0±3.4 ^{cC}
11	<i>Cladophora</i> sp.	28.0±3.9 ^{aD}	21.6±4.1 ^{aD}	11.0±4.1 ^{bC}
12	<i>Caulerpa lentillifera</i>	36.0±2.7 ^{aB}	23.0±3.0 ^{bD}	15.8±3.4 ^{cC}
13	<i>Ulva rigida</i>	34.9±3.7 ^{aC}	22.0±4.7 ^{bD}	17.0±4.0 ^{cC}
14	<i>U. intestinalis</i>	48.6±5.5 ^{aA}	37.6±5.7 ^{aA}	30.6±4.6 ^{aA}
15	<i>Sargassum</i> sp.	15.41±3.29 ^{aF}	7.13±2.72 ^{bF}	5.36±2.34 ^{bD}
16	<i>Turbinaria</i> sp.	15.3±3.6 ^{aF}	14.0±3.4 ^{aE}	8.0±2.5 ^{bCD}
17	<i>Dictyota</i> sp.	29.2±4.4 ^{aD}	21.4±5.5 ^{abD}	10.7±2.7 ^{bC}
18	<i>Padina</i> sp.	24.9±3.8 ^{aE}	6.9±3.4 ^{bF}	7.0±2.2 ^{bCD}

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวนอนเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

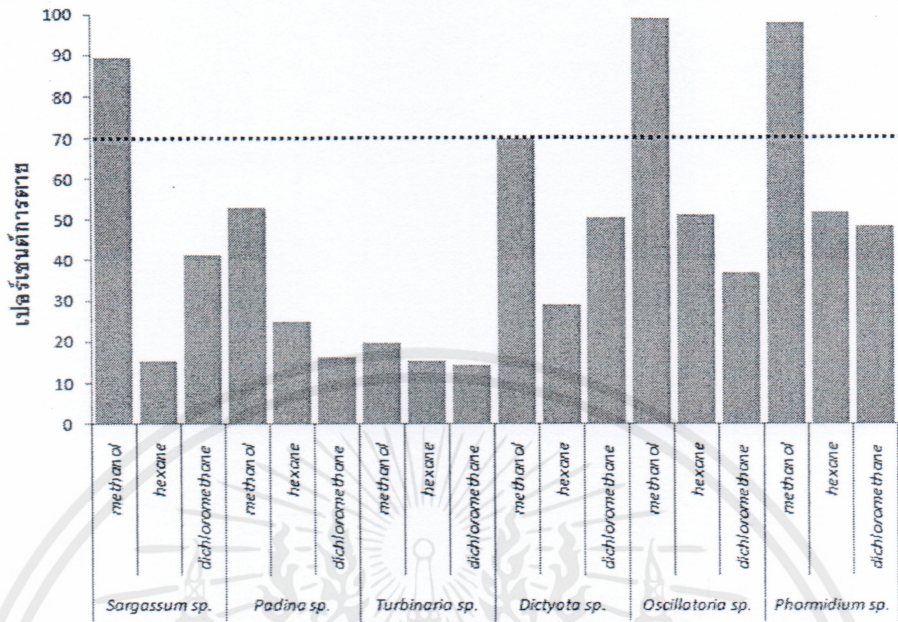
ตารางที่ 4. 5 เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* โดยสารสกัดจากสาหร่าย
ที่สกัดด้วย dichloromethane

ลำดับ	ชนิดสาหร่าย	ความเข้มข้นของสารสกัด (%)		
		1	0.1	0.01
1	Control (ethanol 95%)	0	0	0
2	<i>Oscillatoria</i> sp.	37.0±3.7 ^{aC}	25.8±4.0 ^{bB}	16.0±3.1 ^{cC}
3	<i>Phormidium</i> sp.	48.6±3.2 ^{aB}	33.7±4.0 ^{bA}	29.0±2.3 ^{cA}
4	<i>Spirulina platensis</i> (food grade)	38.4±4.3 ^{aC}	26.0±4.3 ^{bB}	14.0±3.1 ^{cC}
5	<i>S. platensis</i> (animal feed)	46.0±3.1 ^{aB}	34.0±3.4 ^{bA}	24.6±3.7 ^{cAB}
6	<i>Fischerella</i> sp.	24.6±3.7 ^{aDE}	11.8±1.9 ^{bCD}	8.8±1.3 ^{bD}
7	<i>Mastigocladopsis</i> sp.	44.5±2.2 ^{aB}	32.1±2.3 ^{bA}	21.6±1.9 ^{cB}
8	<i>Hapalosiphon</i> sp.	40.6±2.5 ^{aB}	24.9±3.1 ^{bB}	10.3±2.4 ^{cD}
9	<i>Acanthophora</i> sp.	41.6±2.8 ^{aB}	36.0±4.0 ^{bA}	20.2±4.2 ^{cB}
10	<i>Gracilaria</i> sp.	42.5±4.9 ^{aB}	28.8±2.9 ^{bB}	14.9±3.9 ^{cC}
11	<i>Cladophora</i> sp.	33.0±2.6 ^{aCD}	18.0±4.2 ^{bC}	12.7±2.9 ^{bC}
12	<i>Caulerpa lentillifera</i>	30.0±3.7 ^{aD}	19.7±3.3 ^{bC}	20.0±3.3 ^{bB}
13	<i>Ulva intestinalis</i>	60.0±2.9 ^{aA}	50.0±6.4 ^{bA}	45.0±6.9 ^{bA}
14	<i>U. rigida</i>	41.1±6.7 ^{aB}	39.1±4.7 ^{abA}	33.6±3.5 ^{bA}
15	<i>Turbinaria</i> sp.	14.2±3.1 ^{aE}	12.0±2.5 ^{aCD}	10.0±2.6 ^{aD}
16	<i>Dictyota</i> sp.	50.6±3.9 ^{aB}	39.0±4.8 ^{bA}	21.0±3.8 ^{cB}
17	<i>Padina</i> sp.	16.5±3.4 ^{aE}	6.9±2.1 ^{bD}	7.0±3.4 ^{bD}
18	<i>Sargassum</i> sp.	41.4±4.7 ^{aB}	7.13±1.6 ^{bD}	5.36±8.1 ^{bD}

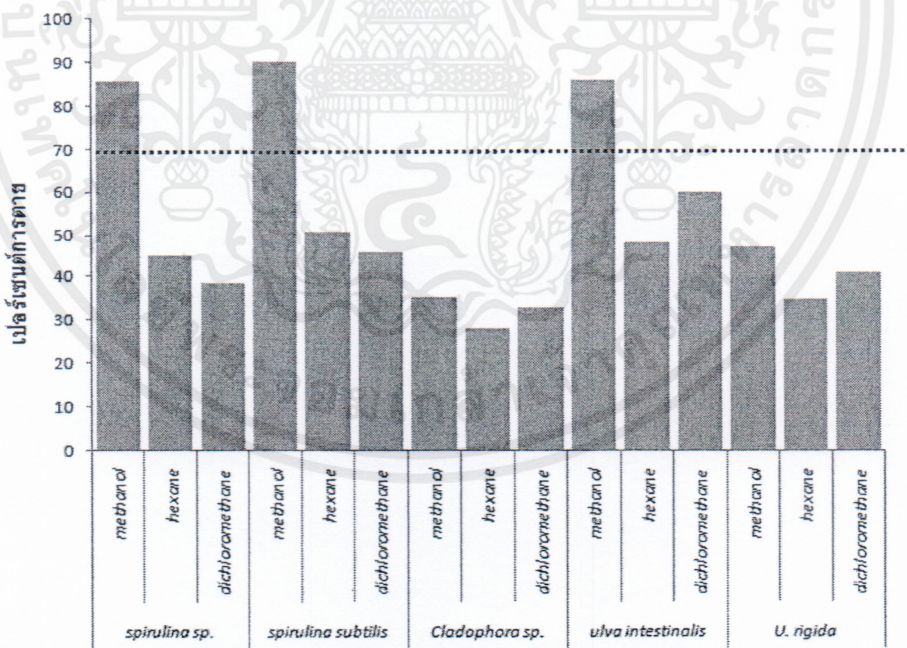
อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวนอนเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

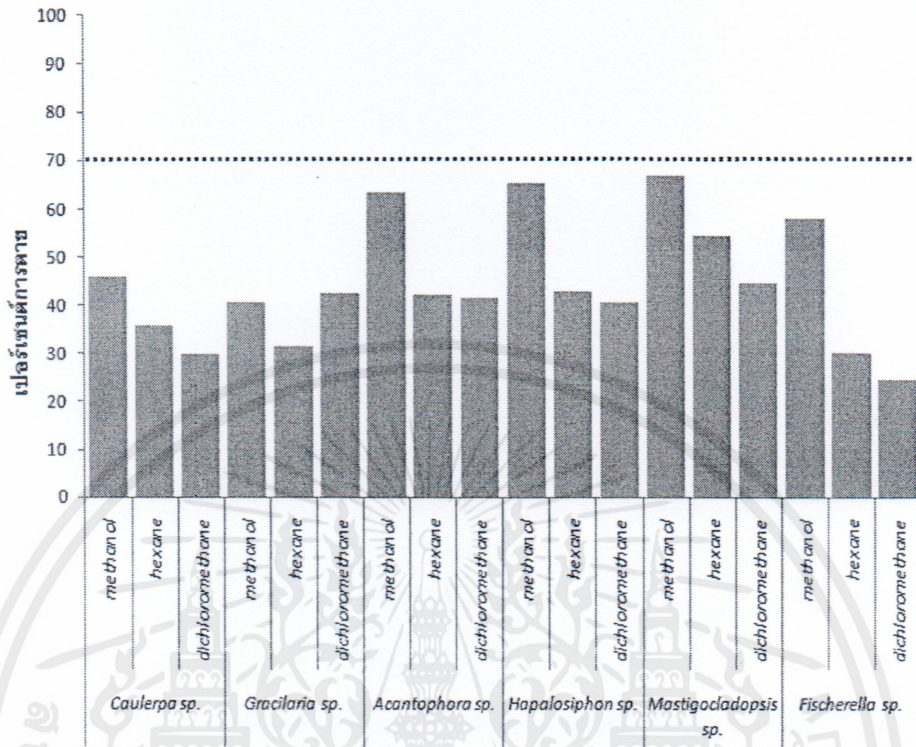


รูปที่ 4.9ก เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* โดยสารสกัดหยาบจากสาหร่าย ที่ความเข้มข้น 1%



รูปที่ 4.9ข เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* โดยสารสกัดหยาบจากสาหร่าย ที่ความเข้มข้น 1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9ค เปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* โดยสารหยาบสกัดจากสาหร่าย ที่ความเข้มข้น 1%

4.5 LC₅₀

จากการทดสอบหาสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นเบื้องต้น สารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าไรได้มากกว่า 70% ได้แก่ *Sargassum* sp., *Dictyota* sp., *U. intestinalis*, *Phormidium* sp., *S. platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade) และ *Oscillatoria* sp. (รูปที่ 4.5ก, 4.5ข และ 4.5ค) ซึ่งอัตราการตายของไรฝุ่นจากสารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. สูงที่สุดคือ $99.0 \pm 1.0\%$ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ *Phormidium* sp. ที่มีอัตราการตายของไรฝุ่นเท่ากับ $98.0 \pm 1.3\%$ รองลงมาคือสารสกัดหยาบจาก *S. platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade), *Sargassum* sp., *U. intestinalis* และ *Dictyota* sp. โดยมีอัตราการตายของไรฝุ่นเท่ากับ 90.3 ± 3.5 , 85.8 ± 4.0 , 83.9 ± 2.4 , 72.5 ± 1.4 และ $70.0 \pm 2.2\%$ ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 7 สกูลที่สกัดด้วย methanol มาทดสอบหาค่า LC₅₀ ที่ความเข้มข้น 9 ระดับคือ 0 (ethanol 95%), 0.005,

0.01, 0.5, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% (0, 0.16, 0.32, 1.6, 3.2, 16, 32, 48 และ 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ที่ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.6) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 48 และ 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phormidium sp., *S. platensis* (animal feed) และ *Oscillatoria* sp. มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้สูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่นโดยไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า $3.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ *Oscillatoria* sp. มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้สูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับ *Phormidium* sp. ส่วนความเข้มข้นที่สูงกว่า $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ สารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดหยาบจากสาหร่ายอื่นๆ และค่า LC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *S. platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade), *U. intestinalis*, *Dictyota* sp., และ *Sargassum* sp. ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1.81, 2.28, 5.13, 6.74, 9.18, 12.87 และ $13.14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ

4.6 ผลของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในการเลี้ยงสาหร่ายต่อปริมาณและประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย

4.6.1 นำหนักแห้งและปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากสาหร่าย *Oscillatoria* sp. และ *Phormidium* sp. ที่เลี้ยงโดยได้รับไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน

จากการนำสาหร่าย *Oscillatoria* sp. และ *Phormidium* sp. ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุดมาเลี้ยงโดยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11 บัญชีสูตรการค้า commercial grade ผันแปรปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสคือ ลด NaNO_3 และ K_2HPO_4 เป็น 1/2 เท่า, NaNO_3 กับ K_2HPO_4 ปกติ (ชุดควบคุม) และเพิ่ม NaNO_3 และ K_2HPO_4 เป็น 2 เท่า จากนั้นนำสาหร่ายมาสกัดด้วย methanol พบว่าสารปริมาณของสกัดหยาบที่ได้จากสาหร่าย *Oscillatoria* sp. (ตารางที่ 4.7) ที่เลี้ยงในอาหารสูตรปกติ (ชุดควบคุม) มากที่สุด คือ 4.13 g ต่อสาหร่ายแห้ง 100 g และ สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงโดยเพิ่ม NaNO_3 เป็น 2 เท่าให้ปริมาณสาหร่ายน้ำหนักแห้งสูงคือ 0.81 g ต่อสาหร่ายแห้ง 100 g

4.6.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. และ *Phormidium* sp. ที่ผันแปรปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในการเลี้ยง

จากการนำสารสกัดหยาบ *Oscillatoria* sp. และ *Phormidium* sp. ที่สกัดด้วย methanol จากสภาวะต่างๆ มาทดสอบที่ความเข้มข้น 9 ระดับคือ 0 (ethanol 95%), 0.005, 0.01, 0.5, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% (0, 0.16, 0.32, 1.6, 3.2, 16, 32, 48 และ $64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ที่ 24 ชั่วโมง เพื่อหาค่า LC_{50} (ตารางที่ 8 และ 9) พบว่า ที่ความเข้มข้น 48 และ $64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ของสาหร่ายทุกสกุล ไรฝุ่นมีอัตราการตายสูงโดยไม่มี

ตารางที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การตาย และค่า LC₅₀ ของสารสกัดเหยาจากสาหร่าย 7 สกุล ที่สกัดด้วย methanol ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	<i>Sargassum</i> sp.	<i>Dictyota</i> sp.	<i>U. intestinalis</i>	<i>Oscillatoria</i> sp.	<i>Spirulina</i> <i>platensis</i> (food grade)	<i>S. platensis</i> (animal feed)	<i>Phormidium</i> sp.
0	0.0 \pm 0.0 ^{aF}	0.0 \pm 0.0 ^{aH}	0.0 \pm 0.0 ^{aG}	0.0 \pm 0.0 ^{aG}	0.0 \pm 0.0 ^{aG}	0.0 \pm 0.0 ^{aH}	0.0 \pm 0.0 ^{aG}
0.16	10.6 \pm 2.4 ^{dE}	25.7 \pm 1.0 ^{cG}	24.2 \pm 0.8 ^{cF}	37.3 \pm 1.2 ^{aF}	29.7 \pm 1.5 ^{bF}	33.7 \pm 2.5 ^{bG}	38.6 \pm 0.8 ^{aF}
0.32	23.6 \pm 1.9 ^{dD}	36.9 \pm 2.8 ^{cF}	32.7 \pm 1.9 ^{aF}	53.0 \pm 1.8 ^{aE}	39.1 \pm 0.5 ^{cF}	44.9 \pm 2.0 ^{bF}	51.3 \pm 0.6 ^{aE}
1.6	38.3 \pm 5.3 ^{cB}	42.4 \pm 4.8 ^{cE}	44.5 \pm 3.8 ^{cE}	61.5 \pm 0.5 ^{aD}	53.7 \pm 1.5 ^{bE}	51.8 \pm 1.7 ^{bE}	60.7 \pm 1.7 ^{aD}
3.2	49.2 \pm 0.6 ^{dC}	57.5 \pm 0.9 ^{cD}	54.4 \pm 6.4 ^{cDD}	79.3 \pm 0.7 ^{aC}	65.8 \pm 1.1 ^{bD}	65.6 \pm 2.2 ^{bD}	80.0 \pm 0.2 ^{aC}
16	67.9 \pm 3.1 ^{dB}	68.7 \pm 1.7 ^{dC}	79.5 \pm 1.3 ^{aC}	96.7 \pm 1.1 ^{aB}	73.8 \pm 1.0 ^{cC}	79.9 \pm 0.2 ^{cC}	88.5 \pm 0.5 ^{bB}
32	89.4 \pm 1.0 ^{cB}	72.5 \pm 1.4 ^{dB}	86.1 \pm 1.8 ^{cB}	99.3 \pm 1.2 ^{aAB}	87.8 \pm 1.4 ^{bB}	93.2 \pm 1.0 ^{bB}	98.0 \pm 1.8 ^{aA}
48	93.3 \pm 1.0 ^{abA}	89.8 \pm 1.0 ^{baA}	97.4 \pm 2.3 ^{aA}	100.0 \pm 0.0 ^{aA}	98.8 \pm 1.5 ^{aA}	100.0 \pm 0.0 ^{aA}	100.0 \pm 0.0 ^{aA}
64	98.0 \pm 0.8 ^{aA}	92.8 \pm 0.9 ^{baA}	99.4 \pm 1.1 ^{aA}	100.0 \pm 0.0 ^{aA}	100.0 \pm 0.0 ^{aA}	100.0 \pm 0.0 ^{aA}	100.0 \pm 0.0 ^{aA}
% CV	12.27	11.58	13.82	14.56	17.22	9.19	12.52
LC ₅₀	13.14	12.87	9.18	1.81	6.74	5.13	2.28
slope	0.05	0.04	0.06	0.14	0.06	0.07	0.09
SE	0.004	0.003	0.004	0.016	0.004	0.006	0.009

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวอนตเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น *Phormidium* sp. ที่เลี้ยงโดยลด NaNO_3 เป็น 1/2 เท่า ซึ่งมีอัตราการตายของไรฝุ่นสูงสุดที่ความเข้มข้น $64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และที่ทุกระดับความเข้มข้นของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ลด K_2HPO_4 เป็น 1/2 มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า LC_{50} เท่ากับ $1.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

ตารางที่ 4.7 น้ำหนักและปริมาณสารสกัดหยาบ (g) ที่ได้จากสาหร่าย *Oscillatoria* sp. และ *Phormidium* sp. ที่ผันแปรปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ที่สกัดด้วย methanol (สกัดจากสาหร่าย 100 g)

สาหร่าย	สถานะที่เลี้ยงสาหร่าย	น้ำหนักสาหร่าย (g น้ำหนักแห้ง/l)	ปริมาณสารสกัด หยาบ (g/สาหร่าย แห้ง 100g)
<i>Oscillatoria</i> sp.	Control	0.76 ± 0.02^A	4.13
	ลด NaNO_3	0.61 ± 0.03^C	3.91
	เพิ่ม NaNO_3	0.81 ± 0.01^A	3.57
	ลด K_2HPO_4	0.64 ± 0.01^C	3.87
	เพิ่ม K_2HPO_4	0.79 ± 0.01^A	4.01
<i>Phormidium</i> sp.	Control	0.68 ± 0.01^B	2.92
	ลด NaNO_3	0.62 ± 0.02^C	3.17
	เพิ่ม NaNO_3	0.72 ± 0.01^{AB}	3.12
	ลด K_2HPO_4	0.61 ± 0.02^C	2.11
	เพิ่ม K_2HPO_4	0.71 ± 0.01^B	2.86

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การตาย และค่า LC_{50} ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่ ผันแปรปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส สกัดด้วย methanol ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	control	ลด NaNO_3	เพิ่ม NaNO_3	ลด K_2HPO_4	เพิ่ม K_2HPO_4
0	0.0±0.0 ^{aG}	0±0 ^{aH}	0±0 ^{aH}	0.00±0 ^{aF}	0.00±0 ^{aH}
0.16	37.3±1.2 ^{aF}	31.9±1.6 ^{cdG}	28.2±1.9 ^{dG}	39.7±1.2 ^{aE}	38.0±1.2 ^{abG}
0.32	53.0±1.8 ^{aE}	45.2±0.8 ^{bcF}	36.7±1.8 ^{dF}	52.8±0.4 ^{aD}	48.3±1.3 ^{abF}
1.6	61.5±0.5 ^{aD}	52.3±1.6 ^{cE}	45.3±1.6 ^{cE}	67.3±2.9 ^{aC}	58.2±2.3 ^{bE}
3.2	79.3±0.7 ^{aC}	74.7±1.40 ^{bdD}	64.7±2.6 ^{deD}	91.0±0.6 ^{aB}	76.9±1.5 ^{bdD}
16	96.7±1.1 ^{aB}	89.5±0.7 ^{bcC}	83.9±1.5 ^{cdC}	99.3±0.3 ^{aA}	88.0±1.5 ^{bcC}
32	99.3±1.2 ^{aAB}	95.4±0.8 ^{bbB}	91.3±0.9 ^{cbB}	100.0±0.0 ^{aA}	95.1±1.0 ^{bbB}
48	100.0±0.0 ^{aA}	100.0±0.0 ^{aA}	99.0±0.6 ^{aA}	100.0±0.0 ^{aA}	98.7±0.0 ^{aAB}
64	100.0±0.0 ^{aA}	100.0±0.0 ^{aA}	100.0±0.0 ^{aA}	100.0±0.0 ^{aA}	100.0±0.0 ^{aA}
% CV	14.56	10.92	12.52	9.88	11.08
LC_{50}	1.81	3.9	6.59	1.02	3.07
slope	0.144	0.33	0.44	0.45	0.02
SE	0.016	0.06	0.06	0.07	0.06

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวดิ่งเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวนอนเดียวกันที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การตาย และค่า LC_{50} ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Phormidium* sp. ที่ ผันแปรปริมาณไนเตรตและฟอสฟอรัส สกัดด้วย methanol ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	control	ลด NaNO_3	เพิ่ม NaNO_3	ลด K_2HPO_4	เพิ่ม K_2HPO_4
0	0.0±0.0 ^{aG}	0.00±0 ^{al}	0.00±0 ^{ah}	0.0±0 ^{aG}	0.00±0 ^{aF}
0.16	38.6±0.8 ^{aF}	30.3±1.3 ^{cdH}	34.0±0.6 ^{bcG}	35.3±1.0 ^{abF}	33.7±2.3 ^{bcE}
0.32	51.3±0.6 ^{aE}	38.7±0.7 ^{dG}	44.3±2.0 ^{bcF}	49.1±2.3 ^{abE}	40.0±3.1 ^{cdE}
1.6	60.7±1.7 ^{aD}	44.2±1.2 ^{cF}	53.2±1.2 ^{bcE}	60.7±1.5 ^{abD}	51.7±6.1 ^{bcD}
3.2	78.0±0.2 ^{aC}	60.7±0.3 ^{cE}	73.3±1.8 ^{bdD}	71.7±2.4 ^{bcC}	67.3±2.9 ^{cdC}
16	88.5±0.5 ^{bbB}	68.0±1.5 ^{cdD}	81.5±1.2 ^{dcC}	82.8±0.9 ^{dB}	81.8±2.7 ^{dB}
32	98.0±1.8 ^{aaA}	82.3±0.7 ^{ccC}	89.0±1.5 ^{cbB}	99.7±0.3 ^{aaA}	89.0±2.5 ^{cbB}
48	100.0±0.0 ^{aaA}	86.5±2.1 ^{bbB}	97.0±1.0 ^{aaA}	100.0±0.0 ^{aaA}	98.1±0.6 ^{aaA}
64	100.0±0.0 ^{aaA}	91.3±0.7 ^{baA}	100.0±0.0 ^{aaA}	100.0±0.0 ^{aaA}	100.0±0.0 ^{aaA}
% CV	12.52	13.47	12.35	9.85	12.45
LC_{50}	2.28	11.29	5.12	3.24	5.90
slope	0.089	0.37	0.27	0.3	0.34
SE	0.01	0.06	0.05	0.06	0.06

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งเดียวกันที่แตกต่างกันคือความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวนอนเดียวกันที่แตกต่างกันคือความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การสกัด DNA จากไรฝุ่น

จากการศึกษาพบว่า การสกัด DNA ไรฝุ่นในขั้นตอนการสกัด DNA เรื่องของการทำให้เซลล์แตกมีความสำคัญ เนื่องจากไรฝุ่นตัวเต็มวัย มีผนังลำตัวที่หนาเนื่องจากร่างกายประกอบไปด้วยเปลือกหรือกระดูกภายนอก (exoskeleton) ซึ่งประกอบไปด้วย สารพวกไคติน (chitin) กระดูกภายนอกของแมลงมีความแข็งแรงทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้อวัยวะภายในและทำหน้าที่ยึดเกาะกับกล้ามเนื้อต่างๆ ทำให้ในขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกก็จะต้องใช้เวลานานกว่าในระยะตัวหนอน (Stevens. and Wall. 2001) Hershkovitz *et al.* (1996) กล่าวว่างานศึกษาเกี่ยวกับอนุชีววิทยาทางด้าน DNA โมเลกุลนั้นควรที่จะให้ความสำคัญและระมัดระวังอย่างสูงเกี่ยวกับความสะอาดและหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของตัวอย่างในทุกขั้นตอนการทำงานทางด้านนี้ เนื่องจากจะทำให้เกิดความผิดพลาดของข้อมูล และทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ผิดพลาดได้

5.2 การทำ PCR-RFLP

การระบุสายพันธุ์ของไรฝุ่น *D. pteromyssinus* และ *D. farinae* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคภูมิแพ้ในประเทศไทยด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเทคนิค PCR-RFLP จากส่วนของยีน COI ในกรณีที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนซึ่งการจำแนกชนิดของไรฝุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์ ยังไม่มีรายงาน โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ DERF1 และ DERR1 ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 800 bp ไพรเมอร์ DERF2 และ DERR2 ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 820 bp และไพรเมอร์ DERF1 และ DERR2 ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1500 bp ซึ่งยีน COI ใน European House Dust mite มีความยาวประมาณ 1548 bp (Dermauw *et al.* 2009)

การวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนของยีน COI แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu I* (รูปที่ 4.7) พบว่ายีน COI ของ *D. pteromyssinus* ได้ขนาดและจำนวนชิ้นผลิตภัณฑ์สอดคล้องกับการทำนายจากการใช้โปรแกรม NEB Cutter แต่ยีน COI ของ *D. farinae* ซึ่งเอนไซม์ *Alu I* ซึ่งสามารถตัดที่ตำแหน่งจำเพาะได้จำนวน 6 ชิ้น โดยมีชิ้นขนาด 618, 327, 313, 249, 24 และ 7 bp โดยชิ้นของยีนขนาด 24 และ 7 bp ซึ่งมีขนาดเล็กมากไม่ได้

ปรากฏบน 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการแยกโมเลกุลที่มีขนาดแตกต่างกันให้เคลื่อนที่แยกออกจากกัน และหากยังใช้เวลานานขึ้น โมเลกุลก็จะเคลื่อนที่แยกกันได้ชัดเจนขึ้น ทำให้ชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กหลุดลอกจากรูพรุนของเจลไปได้ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในการศึกษาครั้งนี้ให้รูปแบบ RFLP (RFLP pattern) ที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* และแม้ว่าเทคนิค PCR-RFLP มีข้อบกพร่องในกรณีที่มีการกลายพันธุ์บริเวณ restriction site อาจมีการจำแนกสายพันธุ์ผิดพลาดหรือออกนอกกลุ่ม แต่งานวิจัยจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ใช้ได้รับการยอมรับและแพร่หลายในการจำแนกสายพันธุ์และยังคงช่วยในการแยกสายพันธุ์หรือตัดสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการออกไปได้ในขั้นคัดกรอง ประกอบกับการจำแนกความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP มีความรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จนถึงการดู RFLP pattern (Ratcliffe et al., 2003)

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนของยีน COI ที่ทำการศึกษาเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า *D. pteronyssinus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับฐานข้อมูลคิดเป็น 98% และ *D. farinae* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับฐานข้อมูลคิดเป็น 99% ซึ่งสามารถระบุชนิดไรฝุ่นได้อย่างชัดเจน

5.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายต่อไรฝุ่น, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 15 สกุล ได้แก่ *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., *Padina* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade), *Hapalosiphon* sp., *Mastigocladopsis* sp., *Caulerpa lentillifera*, *Cladophora* sp., *Ulva intestinalis*, *U. rigida*, *Gracilaria* sp., *Fischerella* sp. และ *Acanthophora* sp. ที่สกัดด้วย methanol, dichloromethane และ hexane ผลพบว่าสารสกัดที่สกัดโดยใช้ methanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด โดยทั่วไปในการสกัดพืชสมุนไพรเบื้องต้นนิยมใช้แอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากแอลกอฮอล์เป็น all purpose solvent โดยที่ใช้น้อยมากคือ methanol และ ethanol ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำละลายได้กว้างทั้งสารที่มีขั้วและไม่ขั้ว (นันทวัน บุญยะประกศร. 2536) ซึ่งสารสกัดหยาบที่ได้จาก methanol เป็นตัวทำละลายส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม lipophilic compound เป็นกลุ่มหลัก ซึ่งสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการ

ละลายในน้ำมันได้และยังมีหน้าที่เป็นตัวทำลายเอนไซม์ในพืชได้ และยังพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายไม่มีขั้วมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วซึ่งการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องสอดคล้องกับการทดลอง Yi *et al.* (2000) ซึ่งใช้ methanol, acetone และ methanol-toluene (3:1) สกัดสาหร่าย 23 สายพันธุ์ 3 คิวชั้น ได้แก่ Chlorophyta (*Ulva pertusa* และ *Enteromorpha prolifera*) Phaeophyta (*Ishige okamurai*, *I. foliacea*, *Colpomenia sinuosa*, *Dictyota sp.*, *Pachydictyon coriaceum*, *Dictyopteris latiuscula*, *Spatoglossum sp.*, *Sargassum fusiforme*, *S. thunbergii*) และ Rhodophyta (*Laurencia chinensis*, *L. okamurai*, *Gracilaria blodgettii*, *Gelidium amansii*, *Gloiopeltis furcata*, *Dasya scoparia*, *Grateloupia filicina*, *Gigartina intermedia*, *Chondria crassicaulis*, *Gymnogo flabeliformis*, *Hypnea cervicornis* และ *Plocamium telfairiae*) พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราและแบคทีเรียได้ดีที่สุด นอกจากนี้ประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *Ulva lactuca*, *Cladostephus spongiosus*, *Cystoseira usneoides* และ *Sacchoriza polyschides* ที่เก็บจากบริเวณชายฝั่งของโมร็อกโกที่สกัดด้วย methanol พบว่าสาหร่ายทั้ง 4 ชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* สูง คือเกิดบริเวณ clear zone มากกว่า 20 mm (Chiheb *et al.*, 2009) ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในครั้งนี้ใช้วิธีการฆ่าไรฝุ่นด้วยการสัมผัสซึ่งพบว่ามีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพดีมากในการฆ่าไรฝุ่นด้วยวิธีการสัมผัส เช่น กานพลู ว่านน้ำ หางไหลขาว และน้อยหน่า โดยว่านน้ำมีคุณสมบัติถูกตัวตาย เป็นสารขับไล่ และยับยั้งการกินอาหารของแมลง ส่วนหางไหลขาวมีคุณสมบัติเป็นสารสัมผัสถูกตัวตาย และกินตาย (อามร์ อินทร์สังข์. 2547) แสดงดังตารางที่ 5.1

การพิจารณาว่าสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพสูงหรือไม่ ก็ต้องสามารถฆ่าไรฝุ่นตายมากกว่า 70% ซึ่งจากการทดลองนี้สาหร่ายที่มีประสิทธิภาพสูงได้แก่ *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Phormidium sp.*, *Spirulina platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade) และ *U. intestinalis*

Sargassum sp. และ *Dictyota sp.* อยู่ในคิวชั้น Phaeophyta เป็นสาหร่ายสีน้ำตาลซึ่งพบว่ามีรายงานถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทั้ง 2 สกุลนี้ไว้โดย Chiheb *et al.* (2009) พบว่าสารสกัดจาก *Dictyota linearis* สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้สูงกว่าสารสกัดจาก *Sargassum vulgare* เนื่องจากสารสกัดจาก *D. linearis* ทำให้เกิด clear zone ของ *E. coli* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 mm ขณะที่ *S. vulgare* ทำให้เกิด clear zone ของ *E. coli* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 mm และสารที่ได้จากกระบวนการไม่ว่ากรณี secondary metabolites เช่น acrylic acid, halogenated aliphatic compounds และ terpenes ของ *Dictyota sp.* ยังมีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง ไวรัส และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้

ตารางที่ 5.1 ค่า LC₅₀ ของสารสกัดหยาบต่อไรฝุ่น *D. Pteronyssinus* ด้วยวิธีการสัมผัส

สาร	LC ₅₀ (µg/cm ²)	reference
<i>Sargassum</i> sp.	13.14	การทดลองครั้งนี้
<i>Dictyota</i> sp.	12.87	การทดลองครั้งนี้
<i>Ulva intestinalis</i>	9.18	การทดลองครั้งนี้
<i>Oscillatoria</i> sp.	1.81	การทดลองครั้งนี้
<i>Spirulina platensis</i>	5.13	การทดลองครั้งนี้
<i>Phormidium</i> sp.	2.28	การทดลองครั้งนี้
พริกไทยดำ (<i>Piper nigrum</i> Linn.)	1.51	Insung and Pumnuan. 2009
แก่นของสาขาคะ (<i>Taiwania cryptomerioides</i>)	12.6	Chang <i>et al.</i> 2001
อบเชย (<i>Cinnamomum bejolghota</i>)	0.23	Insung and Pumnuan. 2009
ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i> Linn.)	0.56	Insung and Pumnuan. 2009
กานพลู (<i>Syzygium aromaticum</i>)	0.09	Insung and Pumnuan. 2009
ตะไคร้บ้าน (<i>Cymbopogon citratus</i>)	0.81	Insung and Pumnuan. 2009
ตะไคร้หอม (<i>Cymbopogon nardus</i>)	0.93	Insung and Pumnuan. 2009
ไพล (<i>Zingiber cassumunar</i>)	0.7	Insung and Pumnuan. 2009
โหระพา (<i>Ocimum basilicum</i>)	1.57	Insung and Pumnuan. 2009

Tuney *et al.* (2006) รายงานว่าสารสกัดจาก *D. linearis* สามารถต้านเชื้อ *Psuedomonas aeruginosa* ได้ดีกว่าสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียว (*Enteromorpha linza*) เช่นเดียวกับ *Sargassum* sp. ซึ่งภายในเซลล์ของสาหร่ายนี้มีรงควัตถุพวกฟิวโคแซนทิน (fucoxanthin) ซึ่งสารสกัดกลุ่มที่ออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม lipophilic compound และสาร betain ซึ่งสามารถเพิ่มความต้านทานเชื้อโรคให้กับมันฝรั่งและต้านทานหนอนซึ่งเป็นศัตรูพืชได้ (Blunden. 1994) นอกจากนี้สารสกัดจากสาหร่ายสามารถป้องกันการทำลายของเพลี้ยอ่อน และไส้เดือนฝอยในดินต่อการเข้าทำลายของมะเขือเทศได้ (Booth. 1966; Stephenson. 1966) สารสกัดหยาบจาก *Sargassum fluitans* ที่สกัดด้วย petroleum ether พบว่ามีสาร lipophilic compound เป็นองค์ประกอบสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* และ *S. epidemidis* ได้ (Oranday *et al.* 2004) นอกจากนี้ยังพบพอลิแซค

คาไรด์ในสารสกัดจาก *Sargassum fusiforme* ช่วยต้านเชื้อไวรัสโอซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งได้ พบว่าในสาหร่าย *S. fusiforme* ที่มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงจะมีความสามารถในการต้านเชื้อไวรัสโอได้สูงขึ้น (Oranday et al. 2004)

U. intestinalis อยู่ในในควิซัน Chlorophyta เป็นสาหร่ายในกลุ่มสีเขียว มีคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุหลัก สารออกฤทธิ์ที่พบใน *U. intestinalis* ส่วนใหญ่ได้แก่ monoterpenoids, phlortannins และ phenolic compounds (Taskin et al. 2007) นอกจากนี้พบในสารสกัดจากสาหร่ายแล้วยังพบสารกลุ่ม monoterpenoids ได้ในสารสกัดจากพืช เช่น ยี่หระ กานพลู กระเทียม และใบมะนาว เป็นต้น อนุพันธ์ของสารกลุ่มนี้คือ eugenol, carvone, borneol, carveol, benzyl alcohol, thymol, camphor, menthol, chlorothymol, cinnamaldehyde, carvacrol, cineol และ citronellol ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่ออกฤทธิ์ฆ่าไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ได้ดี (Saad et al. 2006) พบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Enteromorpha linza* ที่สกัดด้วย diethyl ether สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida* sp., *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *E. coli* โดยทำให้เกิด clear zone ของเชื้อ *Candida* sp., *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *E. coli* ขนาด 7-10 mm (Tuney et al. 2006) พบว่าสารสกัดจาก *Enteromorpha compressa* ที่สกัดด้วย methanol สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 และ *E. faecalis* ATCC 29213 ได้ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 สูงที่สุดโดยทำให้เกิด clear zone ขนาดมากกว่า 20 mm ขณะที่ clear zone ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 700603 และ *E. faecalis* ATCC 29213 มีขนาดมากกว่า 10 mm แต่ไม่ถึง 16 mm (Chiheb et al. 2009) Anna et al. (2000) ยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของ *U. intestinalis* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งพบองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต และไขมันประมาณ 55 และ 14% ของเซลล์ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายที่มีไขมันสูงจะมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้สูงขึ้น (Demule et al. 1996)

Oscillatoria sp., *Phormidium* sp. และ *Spirulina platensis* อยู่ในควิซัน Cyanophyta เป็นไซยาโนแบคทีเรียซึ่งพบว่ามีรายงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายกลุ่มนี้ไว้มากเช่นกัน Teneva et al. (2005) รายงานว่าสาหร่ายในกลุ่ม Cyanophyta สามารถสร้าง bioactive compounds ทั้งสาร neurotoxic และ hepatotoxic ซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม และยังพบว่าสารพิษจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถยับยั้งกระบวนการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดอื่น โดยไปยับยั้งกระบวนการ extracellular metabolites Chauhan et al. (1992) รายงานว่า *Oscillatoria* sp. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกัน โดย *Oscillatoria* sp. จะปล่อยสารที่ได้จาก

กระบวนการ secondary metabolite ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการ metabolite ของสาหร่ายชนิดอื่น Reshef *et al.* (1997) สกัดสารไกลโคลิปิดจาก *Phormidium* sp. ซึ่งสามารถไปยับยั้งกระบวนการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ในกระบวนการ transcription ของไวรัส HIV-1 และ โพลีแซคคาไรด์จาก *Phormidium tenue* มีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระ และต้านทานกระบวนการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติในหนูได้ (William-son *et al.* 2002) Chamorro-Cevallos *et al.* (2008) รายงานว่า *S. platensis* เป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีน, วิตามิน, แร่ธาตุ และ กรดไขมันจำเป็นเช่น c-linolenic acid และ sulfolipids และยังพบพบสารกลุ่ม phycocyanin จาก *S. subtilis* ซึ่งเป็นสารซึ่งเป็นสารละลายเชิงซ้อน ประกอบด้วยธาตุเหล็กและเกลือแร่อื่น ช่วยเพิ่ม bioavailability และต้านอนุมูลอิสระได้ (Khane *et al.*, 2005) นอกจากนี้ วัชรินทร์ ลือคำหาญ (2544) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. TISTR 8252 พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้หอมวัย 2 และสามารถยับยั้งการกินของหนอนกระทู้หอมวัย 3 ได้ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 5%

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดไรฝุ่นระหว่างสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพสูงทั้ง 7 ชนิด พบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ซึ่งอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta มีประสิทธิภาพสูงที่สุด รองลงมาคือดิวิชัน Chlorophyta (*Caulerpa lentillifera*, *Cladophora* sp., *Ulva intestinalis* และ *U. rigida*) และดิวิชัน Phaeophyta (*Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., *Padina* sp. และ *Dictyota* sp.) ตามลำดับ โดยสาหร่ายในดิวิชัน Rhodophyta (*Gracilaria* sp. และ *Acanthophora* sp.) มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นต่ำ ด้วยวิธีการสัมผัส จากการเปรียบเทียบสารสกัดจากสาหร่ายในดิวิชัน Chlorophyta และดิวิชัน Phaeophyta พบว่าดิวิชัน Chlorophyta มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้สูงกว่าซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Chiheb *et al.* (2009) ซึ่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดจากสาหร่ายในดิวิชัน Chlorophyta (*Enteromorpha compressa*) และดิวิชัน Phaeophyta (*Dictyota linearis* และ *Sargassum vulgare*) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายในดิวิชัน Chlorophyta สามารถยับยั้งเชื้อได้สูงกว่าสาหร่ายจากดิวิชัน Phaeophyta และยังพบว่าสารสกัดจาก *Enteromorpha compressa* สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งหมดขณะที่สารสกัดจาก *Dictyota linearis* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เพียง *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25922 ส่วนสารสกัดจาก *Sargassum vulgare* ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ และจากการเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม secondary metabolite ของสาหร่ายในดิวิชัน

Chlorophyta (*Cladophora glomerata*) และสาหร่ายในคิวิชั่น Cyanophyta (*Nostochopsis lobatus*) พบว่าสาหร่าย *Nostochopsis lobatus* ซึ่งอยู่ในคิวิชั่น Cyanophyta มีประสิทธิภาพทางชีวภาพสูงกว่าใน *Cladophora glomerata* ซึ่งอยู่ในคิวิชั่น Chlorophyta (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2550) ยังไม่พบรายงานเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายในคิวิชั่น Cyanophyta คิวิชั่น Chlorophyta และคิวิชั่น Phaeophyta จึงยังไม่มีข้อมูลผลการทดลองเพื่อนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ของสาหร่ายทั้ง 3 คิวิชั่นกับการทดลองครั้งนี้

เนื่องจากยังไม่พบว่ามีรายงานถึงประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นหรือไรชนิดอื่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายมาก่อนทำให้ขาดข้อมูลของผลการทดลองในการเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการตัดสินใจในการนำสาหร่ายทั้ง 15 สกุล มาใช้ควบคุมและกำจัดไรฝุ่นได้ต่อไปเนื่องจากสาหร่ายเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่นเดียวกับพืชซึ่งถูกนำมาใช้ควบคุมและกำจัดไรฝุ่นในปัจจุบัน

5.4 ปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย

Nelson and Lewin (1974) กล่าวว่าธาตุอาหารเป็นปัจจัยทางเคมีที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของสาหร่าย ถ้าปริมาณสารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายต่างกันจะส่งผลต่อปริมาณผลผลิตสาหร่ายและสารประกอบต่างๆในสาหร่ายเช่น ไขมัน พอลิแซคคาไรด์ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เป็นต้น จากการนำสาหร่าย *Phormidium* sp. และ *Oscillatoria* sp. มาทดสอบหาสภาวะในการเลี้ยงสาหร่ายต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ โดยเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11 ปุ๋ยการค้า CG เกรด ในสภาวะที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นสารอาหาร คือ ลด NaNO_3 และ K_2HPO_4 เป็น 1/2 เท่า, NaNO_3 กับ K_2HPO_4 ปกติ (ชุดควบคุม) และเพิ่ม NaNO_3 และ K_2HPO_4 เป็น 2 เท่าจากนั้นนำสารสกัดหยาบ *Phormidium* sp. และ *Oscillatoria* sp. ที่สกัดด้วย methanol จากสภาวะต่างๆ มาทดสอบเพื่อหาค่า LC_{50} พบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่ ลด K_2HPO_4 เป็น 1/2 เท่า มีค่า LC_{50} เท่ากับ $1.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้สูงที่สุดโดยมีความแตกต่างกับ *Phormidium* sp. และ *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ธาตุอาหารเป็นที่ปัจจัยที่สำคัญในการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้แก่ สารประกอบของ ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัสโดยสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดจนกระทั่งสารอาหารเหล่านี้หมด (Schluter, 1998) ในสภาวะที่สารอาหารเข้มข้นต่ำจึงส่งผลกระทบต่อกระบวนการสะสมอาหารซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโมเลกุลขนาดใหญ่ (Macromolecules) เช่น ไนโตรเจนที่มีปริมาณ

จำกัดจะส่งผลให้ปริมาณ โปรตีนลดลงแต่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและไขมันเพิ่มขึ้น (Stehfest *et al.* 2005) และฟอสฟอรัสที่มีปริมาณจำกัดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของโปรตีนลดลง คาร์โบไฮเดรตและไขมันเพิ่มขึ้น (Kozłowska-Szerenos *et al.* 2004) หากมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ มากจะส่งผลให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น เช่นพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัด จาก *Sargassum fusiforme* มีผลต่อการต้านเชื้อไวรัสโอซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้ง คือในสาหร่าย *S. fusiforme* ที่มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงจะมีความสามารถในการต้านเชื้อไวรัสโอได้สูงขึ้น (Oranday *et al.* 2004) ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกสร้างโดยเซลล์สาหร่ายจะสะสมอยู่ในเซลล์ของ สาหร่ายและมีบางส่วนเคลือบบนผิวเซลล์ (สุนิรัตน์ เรื่องสมบูรณ์. 2549) Goldberg and Cohen (2006) กล่าวว่า การจำกัดปริมาณสารอาหารในการเลี้ยงสาหร่ายจะไปส่งผลให้การสะสมไขมันใน เซลล์สาหร่ายเพิ่มมากขึ้นแต่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตน้อยลง นอกจากนี้การจำกัดปริมาณ ฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงสาหร่ายยังส่งผลให้ปริมาณของไตรกลีเซอไรด์บริเวณผนังเซลล์ของสาหร่าย ลดลง จากการลดลงของไตรกลีเซอไรด์ทำให้เอนไซม์ diacylglycerol acyltransferase ซึ่งมีหน้าที่ เปลี่ยน acyl-CoA ภายในเซลล์ไปเป็นไตรกลีเซอไรด์ลดลง (Takagi *et al.* 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ methanol เป็นตัวทำละลายสารสกัดที่ได้จึงเป็นสารในกลุ่ม lipophilic compound เป็นกลุ่มหลัก ซึ่งการจำกัดปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะทำให้ปริมาณไขมันในเซลล์ของสาหร่ายเพิ่ม มากขึ้น (Goldberg and Cohen. 2006) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า การจำกัดปริมาณไนโตรเจน ทำให้สารสกัดจากสาหร่าย *Oscillatoria* sp. มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่นได้สูงขึ้น (สูงกว่าที่ เลี้ยงในสูตรอาหารปกติ) คาดว่าเพราะปริมาณไขมันในเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาตัวอย่างของไรฝุ่น *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคภูมิแพ้ในคนด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน COI ซึ่งมีขนาดประมาณ 1500 bp โดยพบว่าบริเวณดังกล่าวมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ซึ่งจากผลการทดลอง PCR-RFLP พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AluI* สามารถจำแนกไรฝุ่น *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* โดยอาศัยรูปแบบ RFLP ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อนำไปแยกภายใต้สนามไฟฟ้าด้วย native polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งชนิดของไรฝุ่นที่ระบุได้โดยวิธี PCR-RFLP สอดคล้องกับผลการระบุชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายในการควบคุมไรฝุ่น *D. pteronyssinus* พบว่า *Sargassum* sp., *Dictyota* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina platensis* (animal feed), *S. platensis* (food grade) และ *U. intestinalis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมไรฝุ่น *D. pteronyssinus* โดยสาหร่าย *Oscillatoria* sp. เป็นพืชต่อไรฝุ่นสูงที่สุดคือมีค่า LC_{50} เท่ากับ $1.81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และ *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ลด K_2HPO_4 เป็น 1/2 เท่า มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นได้สูงที่สุด ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ $1.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

ข้อเสนอแนะ

1. ควรวิเคราะห์ปริมาณ CHO, โปรตีน, ไขมัน ในสาหร่ายเพิ่มเติมเพื่อเป็นการยืนยันผลของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อองค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่าย
2. ในขั้นตอนการสกัดควร vary % ของ methanol, อุณหภูมิในการสกัด และระยะเวลาในการสกัดเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. ควรจะใช้วิธีการสกัดแบบ soxhlet เพื่อป้องกันการระเหยออกของตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กาญจนภาชน์ ลีวมนนต์. 2527. สาขาฯ.กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2550. เอกสารประกอบการสอนวิชาชีวสารสนเทศ (Bioinformatics). ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์, เต็มดวง ลิมไบลูย์, ปรานี ลีชนะชัย, ศิริเพ็ญ ศิริมนตรี, สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน, วีระพงศ์ ลูติดานนท์ และวิเศษ นามวาท. 2540. PCR Technology and Application. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ดวงกมล ทองอร่าม, วุฒิพงศ์ มหาคำ และศทาวุธ นามดี. 2005. “การจำแนกพืชสกุล Caulokaempferia K.Larsen (วงศ์ขิง) โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล”. วารสารวิจัย มข. 10(1):5-12.

นิรนาม ก. มปป. “สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) เข้าถึงได้ที่: <http://www.biotech.or.th/biotechnology-th/newsdetail.asp?id=3244>

นันทวัน บุญยะประภัสร์. 2536. การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช. ใน : ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เล่มที่ 1, วันดี กฤษณพันธ์ (ผู้รวบรวม). หน้า 116-129. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พัชรีย์ เลิศฤทธิ์. 2552. ตำราพันธุ์กรรมของยีนไมโทคอนเดรียในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: มิสเตอร์ ก๊อปปี้ (ประเทศไทย).

ไพฑูรย์ พิสุทธิสินธุ์. 2536. สถิติการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช พศ. 2536. กรุงเทพฯ : ฝ่ายวัตถุมีพิษกองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. ชีววิทยาของเซลล์. กรุงเทพฯ: โอ เอส พรินติ้ง เฮาส์.

ยุวดี พิรพรพิศาล. 2538. สาขาฯ. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วีระพงศ์ ลูติดานนท์. 2550. เอกสารการสอนการออกแบบ PCR primer. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มนตรี ตู้จินดา. 2526. โรคภูมิแพ้. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. โครงการตำราศิริราช. สำนักกรุงเทพเวชสาร

สุนีรัตน์ เรืองสมบุรณ์. 2549. การดูดซับโลหะหนักโดยสาหร่าย. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สุพิศ ทองรอด, ชูชาติ ชัยรัตน์, มณฑกานติ ท้ำมดิน และอนันต์ ต้นสุตะพานิช. 2545. ผลของสาหร่ายผสมนางและสาหร่ายหนามต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของหอยเป่าอื้อ. วารสารประมง. 55 (5): 423-429
- สุภัคชา หอมจันทร์. 2547. ความหลากหลายและชีววิทยาของไรฝุ่นในอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี. วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาการจัดการศัตรูพืช. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- สุรางค์ นุชประยูร,จินตนา จิรนา และณัฐธิยา หิรัญกาญจน์. 2546. เวชศาสตร์โมเลกุล. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวรรณ วรสิงห์, ธวัช ศรีวีระชัย, อรุณ ศรีอนันต์ และภาคภูมิ วงศ์แจ้ง. 2552. ฐานวิทยา การเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์ของสาหร่ายผักกาดทะเล *Ulva rigida*. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. กรมประมง
- หัตยา กาวิวงศ์. 2545. อนุพันธุศาสตร์. ครั้งที่ 1. ภาควิชาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- อำร อินทร์สังข์, วรณะ มหาทิตติคุณ และพรพิมล ชื่นชม. 2547. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดต่อไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart). รายงานการวิจัยในโครงการ BRT. 43-54 น.
- อำร อินทร์สังข์ และจรงค์ศักดิ์ พุมนวน. 2551. ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำ (*Piper nigrum* Linn.) ในการฆ่าไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart). วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. ปีที่ 39 ฉบับที่ 3 (พิเศษ) กันยายน – ธันวาคม
- อำร อินทร์สังข์ และจรงค์ศักดิ์ พุมนวน. 2009. Acaricidal activity of essential oil of medicinal plants against house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart). *KKU Science Journal*. 37(2):183-191
- Raouf, A. N. and B. M. I. Ibraheem. 2008. Antibiotic activity of two *Anabaena* species against four fish pathogenic *Aeromonas* species. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 7 (15), pp. 2644-2648
- Abbott, W. S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 65-267

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Akendengua, B., Ngou-Milama, E., Bourobou-Bourobou, H., Essouma, J., Roblot, F., Gley, C., Leurens, A., Hocquemiller, R., Loiseau, P. and C. Bories. 2003. Acaricidal activity of *Uvaria versicolor* and *Uvaria klaineana* (Annonaceae). **Phytotherapy Research** 17 (4): 364-367.
- Arlian, L. G., Allen, M. and Bernstein, I. L. 1988. Prevalence of Dust Mites in the Homes of Asthmatics in Several U.S. Geographical Regions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 81(2) 270.
- Bakkali F., S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. 46; 446–47
- Baskara, G. V. S. 2010. Antibacterial Activity of Cyanobacterial species from adirampattinam coast, southeast coast of Palk Bay. **Current Research Journal of Biological Sciences**. 2(1): 24-26
- Blunden, G., 1992. **Seaweed extracts used in agriculture**. EEC Cost
- Bronswijk, J. E. M. H., Cock, A. W. A. M. de and Oshima, S. 1978. The genus *Blomia oudemans* (Acari: Glycyphagidae) I. Description of *Bromia tropicalis* sp. N. from house dust in tropical and sub-48tropical region. **Journal of Acarologia**. 15(3):477-489
- Carmichael, W.W. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria. *Journal Seek entry for Human and Ecological Risk Assessment*. 7: 1393–1407.
- Chang, S. T., Chen, P. F., Wang, S. Y. and H. H. Wu. 2001. “Antimite activity of essential oils and their constituents from *taiwania cryptomerioides*.” **Journal of Medicine**. 38(3) : 155-157.
- Chamorro, M. G., and Barron, B. L. 2002. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral research*. 56; 279–285.
- Chamorro-Cevallos, G., L. Gardun˜ o-Siciliano , B.L. Barron , E. Madrigal-Bujaidar , D.E. Cruz-Vega and N. Pages. 2008. Chemoprotective effect of *Spirulina* (Arthrospira) against cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 567–574
- Chauhan, V. S., J. B. Marwah and S. N. Bagchi. 1992. Effect of an antibiotic from *Oscillatoria* sp. on phytoplankters, higher plants and mice. **New Phytol**. 251-257
- Chiheb, I., R. Hassane, M. L. Jose, D. S. Jose, G. V. J. Antonio, B. Hassane, and K. Mohamed, 2009. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. **African Journal of Biotechnology**. 8 (7):1258-1262

- Chen, W., Song, L.R., Peng, L., Wan, N., Zhang, X.M., Gan, N.Q. 2008. Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: water and sediment- interface contributions. **Journal of Water Resources Planning and Management**. 42:763–773.
- Chiheb, I., R. Hassane, M. L. Jose, D. S. Jose, G. V. J. Antonio, B. Hassane, and K. Mohamed, 2009. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. **African Journal of Biotechnology**. 8 (7):1258-1262
- Coloff, M. J., 1987. Effects of temperature and relative humidity on development times and mortality of eggs from laboratory and with populations of the European house-dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Experimental and Applied Acarology**. 3: 279-289.
- Coloff, M. J., 2009. **Dust mite**. CSIRO publishing. 600 pp.
- Denmark, H. A. and Cromroy, H. L. 2003. “House dust mites, *Dermatophagoides* spp.” [online]. Available : [http://creatures.ifas.ufl.edu/urban/house dust mite.htm](http://creatures.ifas.ufl.edu/urban/house%20dust%20mite.htm).
- Freile-Pelegri'n, Y. and J. L. Morales. 2004. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Botanica Marina*. 47: 140–146
- Gennard, D.E. 2007. **Forensic entomology: an introduction**. England: John Wiley&sons.
- George, W. 2007. **What dose “Related to” mean when used for human populations**.
- Goldberg, I.K., Cohen, Z. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry**. 67, 696–701.
- Hershkovitz, M. A. and Lewis, L. A. 1996. “Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region”. **Molecular Biology and Evolution**. 13(9): 1276-1295.
- Immanuel, G., V.C. Vincybai, V. Sivaram, A. Palavesam and M.P. Marian. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquaculture** . 53–65
- Jensen, G.S., Ginsberg, D.I., Drapeau, C., 2001. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. **Journal of the American Nutraceutical Association**. 3; 24–30.
- Kalp, G.C. 2002. **Cell and Molecular Biology Concept and Experiments**. New York:John.

- Katircioglu, H., Y. Beyatli, B. Aslim, Z.Yüksekdag and T. Atici. 2006. Screening for Antimicrobial Agent Production of Some Microalgae in Freshwater. **The Internet Journal of Microbiology**. Volume 2 Number 2.
- Kim, H. K., Tak, J. H. and Ahn, Y. J. 2004. "Acaricidal activity of *Paeonia suffruticosa* root bark-derived compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae)." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52(26): (Abstr)
- Knight, A. L., E. H. Beers, S.C. Hoyt and H. Riedl. 1990. Acaricides bioassays with spider mites (Acari: Tetranychidae) on pome fruit: evaluation of methods and selection of discriminating concentrations for resistance monitoring. **Journal of Economic Entomology**. 83(3): 1752-1760.
- Kozłowska-Szerenos B., I. Bialuk and S. Maleszewski. 2004. Enhancement of photosynthetic O₂ evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO₂ concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**. 42: 403-409.
- Malgorn, Y. and Coquoz, R. 1999. "DNA typing for identification of some species of Calliphoridae an interest in forensic entomology". **Forensic Science International**. 102: 111-119.
- Namikoshi, M., and K. L. Rinehart. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 17, 373-384.
- Oranday, M.A., Verde., M.J., Martínez-Lozano., S., J and Waksman, N., H. 2004. Active fractions from four species of marine algae. **International Journal of Botanica**.165-170
- Ozdemir, G., Karabay, N. U., Dalay, M. C. and Pazarbasi, B. 2004. Antibacterial activity of volatile components and various extracts of *Spirulina platensis*. **Phytotherapy Research**. 18; 754-757.
- Patra, J. K., A. P., Patra, N. K., Mahapatra, H., Thatoi, S., Das, R. K. Sahu, and G. C. Swain. 2009. Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. **Malaysian Journal of Microbiology**. 5(1) 2009. uncorrected proof
- Patterson, G. M. L., L. K. Larsen, and R. E. Moore. 1994. Bioactive natural products from blue-green algae. **Journal of Applied Phycology**. 6, 151-157.

Pesole G., Gissi C., De Chirico A. and Saccone C. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. **Molecular Biology and Evolution**. 48:427-34.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Platts-Mills, T. A. E. and M. D. Chapman. 1987. Dust Mite : Immunology, allergic disease and environmental control. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 80(3): 755-775
- Ratcliffe, T. S., Webb W. D., Weinzievr, A. R. and Robertson, M. H. 2003. "PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) A generally applicable method". **Forensic Science International**. 48(4):1-3.
- Rungroj, N., Nettuwakul, C., Chongjaroen, N. and Sudtachat, N. 2009. "Genetic Analysis" 9-22 in **Molecular and Cellular Biology Workshop 2009**. Division of Molecular Genetic, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.
- Saad, E.Z., Hussien, R., Saher, F., Ahmed., Z. 2006. Acaricidal activities of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Zhejiang University SCIENCE**. 7(12): 957-962.
- Schiewer, S. and Volesky, B. 2000. **Biosorbption processes for heavy metal Removal** . Chapter 14.
- Schluter, L. 1998. The influence of nutrient addition on growth rates of phytoplankton groups, and microzooplankton grazing rates in a mesocosm experiment **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 228 : 53-71.
- Stehfes, K., Toepel, J. and Wilhelm, C. 2005. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. **Plant Physiology and Biochemistry**. 43 : 717-726.
- Stevens, J. and Wall, R. 2001. "Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance". **Forensic Science International**. 120: 116-123.
- Suggars, A. L., 1987. House dust mites: a review. **J. Entomol. Sci. Suppl**. 1: 3-15.
- Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., Yoshida, Y. 2000. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 54, 112-117.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. "MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0". **Molecular Biology and Evolution**. 24(8): 1596-1599.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Teneva, I., Balik, D., Lyubka, K., Rumen, M. and M. Rumen. 2005. Toxic potential of five freshwater *Phormidium* species (Cyanoprokaryota). **Toxicon**. 45: 711-725.
- Tuney, I., B. H. Cadirci., D. Unal., and Sukatar, A. 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). **Turkish Journal of Biology**. 30: 171-175.
- Vichyanond, P., 2002. Pediatric allergy and immunology at Siriraj Hospital. **Journal of the Medical Association of Thailand**. 85(2): 569-78.
- Voorhorst, R. 1969. House-dust atopy and House mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. Stafeu's Scientific Publishing Company Leiden, The Natherland.
- Welty, C., W. H. Reissig, T. J. Dennehy and R. W. Weires. 1988. Comparison of residual bioassay methods and criteria for assessing mortality of cyhexatin-resistant European red mite (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**. 81(2): 442-448.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรสภายใต้

กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

1.1 สารละลาย 10 xTAE ปริมาตร 1 L

Tris-HCl 48 g

CH₃COONa·3H₂O 16.4 g

Na₂EDTA 7.44 g

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.7 ด้วย glacial acetic acid แล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 1 L เมื่อใช้งานให้เจือจางความเข้มข้นของ 10 xTAE เป็น 1xTAE

1.2 สารละลาย 6X loading buffer

bromophenol blue 0.01 g

Tris-HCl (pH 6.8) 1.25 ml

Glycerol 5 ml

ผสม bromophenol blue และ Tris-HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 ml แล้วเติม glycerol 5 ml เก็บที่ 4 °C

1.3 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 µg/ml

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์จำนวน 0.5 mg ในน้ำกลั่น 1 L เก็บในขวดสีน้ำตาล (เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือเวลาเตรียมสารละลาย)

1.4 DNA มาตรฐาน 1 kb ของบริษัท Fermentas®

1.5 DNA มาตรฐาน 100 bp ของบริษัท Invitrogen®

1.6 DNA มาตรฐาน 50 bp ของบริษัท Fermentas®

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

2.1 บริษัท Invitrogen®

10x PCR buffer Buffer (Tris-HCl 200 mM, (pH 8.4), KCl 500 mM)

2mM dNTP

25 mM MgCl₂

5 U/ µl ของ Taq DNA Polymerase

2.2 บริษัท Fermentas®

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น 1X Taq Buffer (75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20) with (NH₄)₂SO₄

2 mM dNTP

25 mM MgCl₂

5 U/ μ l ของ *Taq* DNA Polymerase

3. ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Kit)

3.1. ชุดสกัด genomic DNA (Genomic DNA from tissue ; Nucleospin® tissue) ของบริษัท

Machery-Nagel ®

3.1.1 บัฟเฟอร์ T1 (Lysis Buffer)

3.1.2 บัฟเฟอร์ B3

3.1.3 บัฟเฟอร์ PB (Proteinase Buffer)

3.1.4 Proteinase K

3.1.5 บัฟเฟอร์ BW (Wash Buffer)

3.1.6 บัฟเฟอร์ B5 (Wash Buffer)

3.1.7 บัฟเฟอร์ BE (Elution Buffer)

3.1.8 100% Ethanol

3.1.9 NucleoSpin Tissue Columns (light green rings)

3.1.10 Collection Tubes (2 ml)

4. ชุดแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ ชุดสกัด DNA ออกจากเจล QIAquick

Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN®

บัฟเฟอร์ QG (Solubilization buffer)

บัฟเฟอร์ PE (Wash buffer)

Isopropanol

น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Spin column

5. ชุดสารเคมีและเอนไซม์ *AluI* ของบริษัท Roch®ที่ใช้ในการย่อยผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกโซโพลีเมอ

เรส

AluI Buffer (100 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂ , 10 mM

Dithioerythritol, pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37° C)

เอกสารนี้เป็น เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ความเข้มข้น 10 U/ μ l ศึกษานี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใด มีตำแหน่งจดจำของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง AG CT อิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11

	ความเข้มข้น(g/l)
สูตรอาหารหลัก	
โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	1.5
ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 7-ไฮเดรต ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.04
แมกนีเซียมซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.075
แคลเซียมคลอไรด์ 2-ไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.036
กรดซิตริก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	0.006
เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต (Ferric ammonium citrate)	0.006
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	0.02
*Trance Metal Mix A5+Co	1 ml
สูตรอาหารรอง	
*Trance Metal Mix A5+Co	
กรดบอริก (H_3BO_3)	2.86
แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.84
ซิงก์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.222
โซเดียมโมลิบเดต 2-ไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.390
คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.079
โคบอลต์ไนเตรต 6-ไฮเดรต [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0.049

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว อภิญญา สโมสร
วัน เดือน ปีเกิด	18 กรกฎาคม 2528
ที่อยู่	87 หมู่ 1 ต. ไสหรีอ อ. ฉวาง จ. นครศรีธรรมราช 80150 โทร 0872757136 E-mail: por_aa@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานวิจัย	กุมภาพันธ์ 2553 ตีพิมพ์งานวิจัย “ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย ขนาดใหญ่ ต่อไรฝุ่น <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart) โดยวิธี สัมผัส” ในการประชุมวิชาการ, สิงหาคม 2553 ตีพิมพ์งานวิจัย “Effectiveness of cyanobacteria extracts on the House Dust Mite, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart) by contact method” ในการประชุมวิชาการ 1 st International Symposium Conference on <i>Agricultural Technology</i> ตุลาคม 2553 ตีพิมพ์งานวิจัย “Effects Of Nitrogen And Phosphorus In Culture Medium On Bioactive Compounds Of <i>Oscillatoria</i> sp. Extracts On The House Dust Mite, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart)” ในการประชุมวิชาการ 8 th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้