



การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช

CONTROLLING OF PLANT PATHOGENIC FUNGI BY
BIOACTIVE COMPOUNDS FROM BLUE-GREEN ALGAE



อธิปัทนาคาร

ห้องสมุดคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

๖๗

๘๓๙๓๓

๒๕๔๐

ค.๙

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. ๒๕๔๐

Copyright by Mahidol University

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช

..... สวรรค์ คำธิชอบ

สวรรค์ คำธิชอบ

ผู้วิจัย

..... ๒๕๖๒

รุ่งจรัส หุตะเจริญ วท.บ., วท.ม.

ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

อาภารัตน์ มหาจันทร์ วท.บ., วท.ม., Ph.D.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... ๒๕๖๒

เตือนใจ บุญหลง กส.บ., M.Sc., Ph.D.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

วิทยา ศรีมโนภาษ วท.บ., วท.ม., D.Sc.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

วิทยา ศรีมโนภาษ วท.บ., วท.ม., D.Sc.

ประธานคณะกรรมการประสาทหลักสูตร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สาขาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม

คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์

.....

อดุลย์ วิริยเวชกุล ราชบัณฑิต, พ.บ.,

น.บ., F.R.C.P.

คณบดี

บัณฑิตวิทยาลัย



วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช

ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม

วันที่ 8 พฤษภาคม พ.ศ. 2540

สวรส ดำริชอบ

สวรส ดำริชอบ

ผู้วิจัย

รุ่งรัส หุดะเจริญ

รุ่งรัส หุดะเจริญ วท.บ., วท.ม.

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาภารัตน์ มหาจันทร์

อาภารัตน์ มหาจันทร์ วท.บ., วท.ม., Ph.D.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

เดือนใจ บุญ-หลง

เดือนใจ บุญ-หลง กส.บ., M.Sc., Ph.D.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

วิทยา ศรีมโนภาษ

วิทยา ศรีมโนภาษ วท.บ., วท.ม., D.Sc.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อคุลย์ วิริยเวชกุล

อคุลย์ วิริยเวชกุล ราชบัณฑิต, พ.บ.,

น.บ., F.R.C.P.

คณบดี

บัณฑิตวิทยาลัย

รุ่งรัส หุดะเจริญ

รุ่งรัส หุดะเจริญ วท.บ., วท.ม.

คณบดี

คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

Copyright by Mahachulalongkornrajavidyalaya University

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ

นางสาวสวรศ คำริชอบ

วัน เดือน ปีเกิด

22 สิงหาคม 2515

สถานที่เกิด

กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, พ.ศ. 2532-2535:

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

มหาวิทยาลัยมหิดล, พ.ศ. 2536-2540:

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการบริหาร
สิ่งแวดล้อม)

ทุนการศึกษา

ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์บางส่วน
จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์รุ่งจรัส หูตะเจริญ ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ดร. อาภารัตน์ มหาจันทร์ ดร. เตือนใจ บุญ-หลง และ ดร. วิทยา ศรีมโนภาส คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบแก้ไข และปรับปรุงวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกๆ ท่านที่ให้การสั่งสอน อบรม ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ และฝ่ายวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง

ขอขอบคุณกองโรคพิษและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราสาเหตุโรคพืชสำหรับการทดลอง

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อ. ตาคลี จ. นครสวรรค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในการทดลอง

ขอขอบคุณญาติ ๆ เพื่อนๆ น้องๆ รวมทั้งเพื่อนนิสิตภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร รุ่นที่ 49 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเพื่อนนักศึกษาคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนการศึกษา ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดมาจนการศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จด้วยดี

สวรส คำริขอบ

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียว แถมำเงินเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช
ผู้วิจัย	สวรส คำธิชอบ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการบริหาร สิ่งแวดล้อม)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	รุ่งจรัส หุดะเจริญ วท.ม. อาภารัตน์ มหาจันทร์ Ph.D. เดือนใจ บุญหลง Ph.D. วิทยา ศรีมโนภาส D. Sc.
วันที่สำเร็จการศึกษา	8 พฤษภาคม พ.ศ. 2540

บทคัดย่อ

นำสาหร่ายสีเขียวแถมำเงินจำนวน 1 สก๊กล์ 161 สายพันธุ์มาแยกและคัดเลือกสาหร่าย
สีเขียวแถมำเงินที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อราโรคพืช 5 สายพันธุ์ โดย
นำสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่นทดสอบ (paper disc) ปริมาตร
20 ไมโครลิตร มาทดสอบกับเชื้อราด้วยวิธี paper disc plate พบว่าสาหร่ายที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้
13 สายพันธุ์ โดยสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อรา
Colletotrichum truncatum สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง รวมทั้งเชื้อรา *Bipolaris*
maydis *Fusarium oxysporum* และ *Macrophomina phaseolina*

เมื่อนำสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 มาเลี้ยงในอาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการ
เติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โซเดียม
คลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร และ pH เริ่มต้น 7.0 ปริมาตร 10 ลิตร ที่บรรจุอยู่ในถังคาร์บอนขนาด
12 ลิตร ฟัน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้ความเข้ม
แสง 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ พบว่า สาหร่ายมีน้ำหนักสดของเซลล์ 2.05 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักสดของ
สารสกัด 1 กรัมเซลล์ต่อลิตร ให้ปริมาณสารสกัด 28 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ
สารสกัดกับสารมาตรฐาน cycloheximide พบว่าสารสกัด 100 มิลลิกรัม มีปริมาณสารออกฤทธิ์
ทางชีวภาพ 43.9 มิลลิกรัม

เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

C. truncatum บนเมล็ดถั่วเหลืองในงานเลี้ยงเชื้อ พบว่าสารสกัดในรูปแบบที่ผสมสารลดแรงตึงผิว ความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ดขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เทียบเท่าสารเคมีแมนโคเซบที่อัตราแนะนำคือ 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด และเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *C. truncatum* ในระดับถุงเพาะกล้า พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนถั่วเหลืองที่มีการปลูกเชื้อราแบบหยดเชื้อลงบนเมล็ด (dipping method) ได้ดีเทียบเท่าสารเคมีแมนโคเซบ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความคงตัวที่ pH 4 ถึง 9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีความคงตัวมากกว่า 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส คงตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และคงตัวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และจากการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน โดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนคือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตรา 7 : 3 : 1 โดยตำแหน่งของสารออกฤทธิ์อยู่ที่ค่า R_f 0.61 และ 0.65 และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับ ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch's test, anthrone test และ unsaturation test เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเป็นสารโมเลกุลใหญ่ มีโครงสร้างที่ซับซ้อน ไม่สามารถทำลายพันธะด้วยวิธีการเหล่านี้ได้

Thesis Title Controlling of Plant Pathogenic Fungi by Bioactive
Compounds from Blue-green Algae

Name Swaros Dumrichob

Degree Master of Science (Technology of Environmental
Management)

Thesis Supervisory Committee

Rungjarat Hutacharoen M.Sc.

Aparat Mahakhant Ph.D.

Tuanchai Boon-Long Ph.D.

Vithya Srimanobhas D.Sc.

Date of Graduation 8 May B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

Each of 20 μ l of 1,000 μ g/disc of extract from 11 genera 161 isolates of nitrogen-fixing blue-green algae (BGA) was applied on paper disc to screen for the antifungal activities against 5 isolates of plant pathogenic fungi. The activities were shown in 13 isolates of BGA. *Calothrix* sp. TISTR 8913 was chosen for further study due to its highest inhibition activity against *Colletotrichum truncatum*, the soybean pathogen causing soybean anthracnose disease, *Bipolaris maydis*, *Fusarium oxysporum* and *Macrophomina phaseolina*.

Calothrix sp. TISTR 8913 incubated at 30 °C for 17 days in a 12-L carboy containing of 10-L modified BGA medium by the addition of NaNO₃ 1.5 g/l, and increase of K₂HPO₄ to 1.5 g/l, reduction of NaCl to 0.03 g/l with the initial pH of 7.0. The cultures were sparged with 5% CO₂ in air at flow rate of approximately 1,000 ml/min under the light intensity of 60 μ E/m²/s. The biomass obtained was 2.05 g/l and 1 g of fresh cells gave 28 mg of the extract. The specific activity of crude extract 100 mg was equivalent to 49.3 mg-cycloheximide.

The effect of algal extract on the infection of *C. truncatum* on soybean seeds (in petridish) by crude algal extract formulated with surfactant (0.1% Tween 20) at the concentration of 700 µg/seed could inhibit the growth of *C. truncatum* as that of the commercial fungicide, mancozeb at the dose of 400 µg/seed. In the pot experiment, the crude algal extract with this formulation and concentration could inhibit the fungal infection that inoculated by dipping method at the same level as mancozeb.

The bioactive compounds were stable when treated at 50 and 70 °C for more than 2 h, stable at 100 °C for 60 min, stable at 121 °C for 45 min and stable at pH 4-9 at 4 °C for 24 h. Purification of bioactive compounds by developing of silica gel thin layer chromatography in the solvent system of CHCl₃: CH₃OH : H₂O at the ratio of 7:3:1 showed the bioactive compounds by two spots with R_f value of 0.61 and 0.65. The negative result from ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch's test, anthrone test, unsaturation test and protease, amylase, lipase inhibition indicated that these bioactive compounds may be a big molecule with a complicate chemical structure.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญแผนภาพ	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. การตรวจเอกสาร	10
3. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	39
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	63
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	100
บรรณานุกรม	103
ภาคผนวก	
ก	112
ข	115
ค	117
ง	121

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. บัญชีสมดุลงั่วเหลืองในประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2525/2526 - 2535/2536	2
2. ปริมาณและมูลค่าสารกำจัดเชื้อราโรคพืชที่นำเข้ามาในปริมาณมาก 10 อันดับ ในปี พ.ศ. 2538	4
3. ลักษณะและตัวอย่างของเชื้อราใน Class ต่างๆ	26
4. สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช	29
5. สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช	32
6. การใช้สารปฏิชีวนะกับการเกษตรในประเทศญี่ปุ่น	34
7. แสดงจำนวนสารหายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	64
8. แสดงสายพันธุ์สารหายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านเชื้อราโรคพืช	65
9. แสดงความกว้างขวางในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากสารหาย สีเขียวเกมน้ำเงิน <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913	69
10. แสดงสูตรอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913	82
11. แสดงการศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากสารหาย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> ในจานเลี้ยงเชื้อ	86
12. แสดงการศึกษารูปแบบของสารสกัดจากสารหาย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนเมล็ดถั่วเหลืองในจานเลี้ยงเชื้อ	87
13. แสดงการศึกษาคความเข้มข้นของสารสกัดจากสารหาย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนเมล็ดถั่วเหลืองในจานเลี้ยงเชื้อ	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

14. แสดงการทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนเมล็ดถั่วเหลือง ในถุงเพาะกล้า	92
15. แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตารางผนวก	99 120



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า	42
2. แสดงลักษณะการขยายการผลิตสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สายพันธุ์ที่คัดเลือกในถังคาร์บอไนต์ขนาด 12 ลิตร	48
3. แสดงลักษณะของสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913	66
4. แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i>	67
5. แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> โดยสารสกัดจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น	70
6. แสดงการยับยั้งเชื้อรา <i>Macrophomina phaseolina</i> โดยสารสกัดจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น	71
7. แสดงการยับยั้งเชื้อรา <i>Bipolaris maydis</i> โดยสารสกัดจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น	72
8. แสดงช่วงเวลาของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ซึ่งเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุ อาหาร BGA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า	76
9. แสดงการศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913	77
10. แสดงการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดที่เหมาะสม ต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913	78

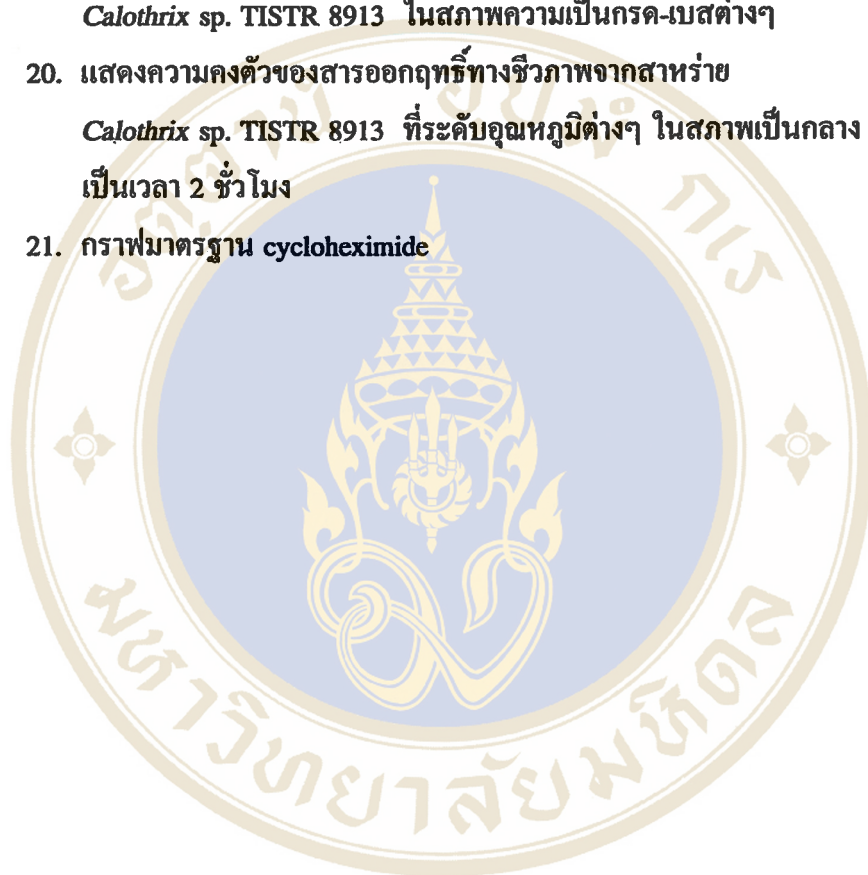
สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

11. แสดงการศึกษาความเข้มข้นของโคปัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ สาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913	79
12. แสดงการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913	80
13. แสดงการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสม ต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913	81
14. แสดงช่วงเวลาของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ซึ่งเลี้ยงในถังคาร์บอนที่ บรรจุอาหาร BGA ดัดแปลง ฟัน 5 %คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ	83
15. แสดงช่วงเวลาของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ซึ่งเลี้ยงในถังคาร์บอนที่ บรรจุอาหาร BGA ฟัน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ	85
16. แสดงการศึกษารูปแบบของสารสกัดจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนเมล็ดถั่วเหลืองในจานเลี้ยงเชื้อ	88
17. แสดงการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนเมล็ดถั่วเหลืองในจานเลี้ยงเชื้อ	91
18. แสดงการทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนเมล็ดถั่วเหลืองในถุงเพาะกล้า	93

สารบัญภาพ (ต่อ)

19. แสดงความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ในสภาพความเป็นกรด-เบสต่างๆ	96
20. แสดงความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย <i>Calothrix</i> sp. TISTR 8913 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ ในสภาพเป็นกลาง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	97
21. กราฟมาตรฐาน cycloheximide	121



สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่	หน้า
1. แสดงขั้นตอนการศึกษารูปแบบของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนเมล็ดถั่วเหลืองที่ทดสอบบนวัสดุเพาะในงานเลี้ยงเชื้อ	50
2. แสดงขั้นตอนการศึกษความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> บนเมล็ดถั่วเหลืองที่ทดสอบบนวัสดุเพาะในงานเลี้ยงเชื้อ	53
3. แสดงขั้นตอนการทดสอบสารสกัดจากสาหร่ายในรูปแบบและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>Colletotrichum truncatum</i> ในถั่วเหลืองในถุงเพาะกล้า	55

บทที่ 1

บทนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทางเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมชนิดหนึ่งของประเทศไทยอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill และชื่อสามัญคือ soybean สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมน้ำมันพืช และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ สำหรับอุตสาหกรรมอาหารนั้นได้มีการนำถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เต้าหู้ เต้าเจี้ยว นมถั่วเหลือง ซีอิ๊ว ซอส ขนมหั่น เป็นต้น

ในพื้นที่ที่มีการปลูกถั่วเหลือง ดินบริเวณนั้นมีความอุดมสมบูรณ์ เพราะถั่วเหลืองสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศนำมาใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นเกษตรกรจึงนิยมปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียนกับพืชหลัก เช่น ข้าว ข้าวโพด ฝ้าย ปอ เพราะจะทำให้พืชหลักเจริญงอกงามดี

เนื่องจากความต้องการบริโภคถั่วเหลืองในรูปของผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีปริมาณสูง และยิ่งจะทวีความต้องการเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ ผลผลิตถั่วเหลืองภายในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจากส่วนใหญ่มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสกัดน้ำมัน และเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ซึ่งปัจจุบันมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น จึงต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ จากตารางที่ 1 จะพบว่าประเทศไทยมีความต้องการใช้ถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 เป็นต้นมา มีความต้องการเพิ่มถึงกว่า 1 ล้านตัน แต่สามารถผลิตได้เองเพียงแค่ 4-5 แสนตันเท่านั้น จึงจำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศในปริมาณสูง ดังในปีเพาะปลูก 2535/2536 มีการนำเข้าสูงถึง 1.1 ล้านตัน ในขณะที่การส่งออกมีปริมาณไม่มากนัก

ตารางที่ 1 บัญชีสมดุลถั่วเหลืองของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2525/26 - 2535/36

ปีเพาะปลูก	ผลผลิต (ตัน)	นำเข้า (ตัน)	ส่งออก (ตัน)	ใช้ในประเทศ (ตัน)
2525/26	113,392	251,116	731	363,777
2526/27	179,126	300,511	1,184	478,453
2527/28	246,448	289,778	1,966	534,260
2528/29	309,421	297,610	2,454	604,577
2529/30	356,483	300,067	338	656,212
2530/31	337,745	343,245	49	680,941
2531/32	516,812	250,128	16	766,924
2532/33	672,368	243,944	21	916,291
2533/34	530,112	605,723	288	1,135,547
2534/35	435,587	767,432	640	1,282,265
2535/36	435,000	1,164,961	750	1,599,211

ที่มา : กองวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,
2537

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่ประสบปัญหาเรื่องเมล็ดพันธุ์อย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของถั่วเหลืองที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ โรคของถั่วเหลืองจะรุนแรงมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ใช้ปลูก ฤดูปลูก ความอุดมสมบูรณ์ของดิน สภาพดินฟ้าอากาศ และระบบการปลูกพืช โดยในประเทศไทยมีรายงานของโรคถั่วเหลืองที่สำคัญ คือ โรคที่เกิดจากเชื้อรา ได้แก่ โรคราน้ำค้าง โรคแอนแทรคโนสหรือใบโกร๋น โรคราสนิม โรคเมล็ดสีม่วง โรครากและโคนเน่า โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ได้แก่ โรคใบจุดนูน และโรคที่เกิดจากไวรัส ได้แก่ โรคใบด่าง ซึ่งวิธีการป้องกันกำจัดที่ได้ผลดีในปัจจุบัน คือการกลูกละลายด้วยสารเคมีแมนโคเซบก่อนลงแปลงปลูก และการใช้สารเคมีที่เพิ่มมากขึ้นก็จะมีผลทำให้มีการค้าขายของเชื้อโรคเกิดขึ้นตลอดเวลา ทำให้ต้องมีการเปลี่ยนชนิดสารเคมี หรือเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้น ซึ่งนอกจากจะเป็นปัญหาในการควบคุมโรคพืชในอนาคตแล้วยังส่งผลกระทบต่ออย่างร้ายแรงต่อระบบนิเวศ เกิดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมด้วย (6)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นจำนวนมากในแต่ละปี ทั้งในรูปของ technical grade ซึ่งต้องนำไปปรุงแต่งก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ และในรูปของสารสำเร็จรูป (finished products) ในกลุ่มของสารกำจัดศัตรูพืชนั้น สารกำจัดเชื้อราโรคพืชเป็นกลุ่มที่มีปริมาณการนำเข้ามากเป็นอันดับ 3 รองจากสารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดแมลง โดยในปี 2530 นั้นสารกำจัดเชื้อราโรคพืช มีปริมาณการนำเข้า 6,524 ตัน มูลค่า 288 ล้านบาท ปี 2532 นำเข้า 5,865 ตัน มูลค่า 367 ล้านบาท ปี 2534 นำเข้า 5,112 ตัน มูลค่า 371 ล้านบาท ในปี 2536 นำเข้า 5,651 ตัน มูลค่า 438 ล้านบาท และในปี 2538 นำเข้า 6,937 ตัน มูลค่า 603 ล้านบาท ดังจะเห็นได้ว่าแนวโน้มความต้องการสูงขึ้นเรื่อยๆ ในปี 2538 นั้นสารกำจัดเชื้อราโรคพืชที่มีการนำเข้าในปริมาณสูง ได้แก่ sulfur, copper oxychloride และ mancozeb โดย mancozeb นั้น มีมูลค่าการนำเข้าสูงที่สุด (ตารางที่ 2) ถึงแม้ว่าสารกำจัดเชื้อราโรคพืชจะไม่ก่อให้เกิดพิษได้เฉียบพลันเท่ากับสารกำจัดแมลง แต่เมื่อใช้ไปในระยะเวลานานๆจะทำให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยา จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณสารมากขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้สารเคมีเกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยสะสมอยู่ในดิน ถ่ายเทลงสู่แหล่งน้ำ ถ่ายทอดสู่ห่วงโซ่อาหาร ก่อให้เกิดพิษต่อตัวเกษตรกรและผู้บริโภค

หลายฝ่ายได้เล็งเห็นความสำคัญของปัญหาเหล่านี้ ดังจะเห็นได้จากความพยายามที่จะค้นคิดสารกำจัดเชื้อราจากพืชธรรมชาติ เช่น การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมเชื้อรา ซึ่งให้ผลในทางปฏิบัติได้บ้าง แต่ก็ยังมีข้อจำกัดทางการผลิตสารเหล่านั้นด้วยเหตุต่างๆ เช่น

ตารางที่ 2 ปริมาณและมูลค่าสารกำจัดเชื้อราโรคพืชที่นำเข้าในปริมาณมาก 10 อันดับในปี พ.ศ.
2538

ลำดับ ที่ No.	ชื่อสามัญ common name	ปริมาณ (ตัน) quantity (ton)	มูลค่า (ล้านบาท) CIF value/million bht	ปริมาณสารออกฤทธิ์ (ตัน) AI quantity (ton)
1	sulfur	1,229	29	993
2	copper oxychloride	1,112	40	883
3	mancozeb	860	67	663
4	zineb	721	23	577
5	carbendazim	438	57	275
6	captan	429	32	235
7	propineb	409	54	287
8	maneb	187	15	145
9	copper hydroxide	178	14	131
10	phosphoric acid	172	10	44

ที่มา : ฝ่ายวัตถุดิบพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร
และสหกรณ์, 2538

การที่ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของพืชสมุนไพร ที่จะนำมาสกัดให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกันตลอด ทำให้สารที่สกัดออกมาได้มีคุณภาพไม่แน่นอน เนื่องจากการปลูกพืชสมุนไพรย่อมมีปัจจัยจาก สภาพดินฟ้าอากาศเข้ามาเกี่ยวข้อง รวมถึงการควบคุมปริมาณแร่ธาตุในดินที่ปลูกทำได้ยาก อีกทั้งยังใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกมาก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาค้นคว้าถึงแหล่งผลิตสารอื่นเพื่อใช้ในการ ป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยสารที่ผลิตได้นั้นต้องไม่มีพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ไม่ตกค้าง ในสิ่งแวดล้อม และควรผลิตจากวัตถุดิบที่หาได้ในประเทศ มีต้นทุนการผลิตที่ไม่สูงมากนักและ สามารถควบคุมคุณภาพของสารให้มีความสม่ำเสมอได้ การใช้สารปฏิชีวนะเป็นอีกทางหนึ่งซึ่ง ในปัจจุบันมีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ การอุตสาหกรรม รวมถึงการเกษตรด้วย ในปัจจุบันมี การค้นพบสารปฏิชีวนะกว่า 8,000 ชนิด โดยส่วนใหญ่ผลิตได้จากแบคทีเรีย โดยสามในสี่ ส่วนนั้นผลิตได้จาก แบคทีเรียสกุล *Streptomyces* สำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่ายต่างๆ นั้น พบว่าในสาหร่ายเซลล์เดียวขนาดเล็ก (microalgae) นั้น แม้ว่าจะ สามารถเลี้ยงภายใต้สภาพที่ควบคุมได้แต่ก็ผลิตสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพได้น้อยมาก รวมถึง ต้นทุนการเก็บเกี่ยวก็เป็นข้อจำกัดด้วย อย่างไรก็ตาม ได้มีการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ผลิต จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ (macroalgae) ซึ่งน่าจะมีศักยภาพเป็นแหล่งสารที่สำคัญ แต่ก็มีข้อ จำกัดในกรณีที่จะผลิตสาหร่ายให้ได้ปริมาณมากๆ นั้นเป็นเรื่องยาก เนื่องจากต้องใช้พื้นที่มาก อาจเป็นพื้นที่ชายฝั่งทะเลที่ปัจจุบันถูกปนเปื้อนด้วยสารพิษ และใช้เวลาเลี้ยงนานรวมทั้งการควบคุมสภาพแวดล้อมก็เป็นไปได้ยาก สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) นั้น พบ ว่า มีหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ มีทั้งเป็นสารยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial) (42) สารยับยั้งเชื้อรา (antifungal) (71) สารยับยั้งไวรัส (antiviral) (65) สารยับยั้งสาหร่าย (antialgal) (53) ถึงแม้ว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเติบโตได้ช้ากว่า แบคทีเรีย และยีสต์ แต่ต้นทุนของอาหารที่ใช้เลี้ยงนั้นราคาถูกกว่า จึงจัดได้ว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นแหล่งสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ในการ ควบคุมเชื้อราโรคพืชทดแทนการใช้สารสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งคาดว่าจะช่วยลดมลภาวะอันเนื่องมา จากสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้

1.2 แนวคิดในการวิจัย

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นอีกทางหนึ่งซึ่งคาดว่าจะสามารถค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชได้ เช่น Bloor, S. (20) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc muscorum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cladosporium herbarum*, *Hormoconis resinae* IMI 322441, *Penicillium brevicompactum* CMI17456 ได้ จากการศึกษาผลงานวิจัยทางด้านการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินประกอบกับการศึกษาวิธีการควบคุมเชื้อราโรคพืชด้วยวิธีต่างๆ นำไปสู่แนวความคิดที่จะนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีอยู่ในสภาพธรรมชาติ นำมาเลี้ยงให้ได้สาหร่ายบริสุทธิ์ (unialgal culture) จากนั้นนำมาเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากแล้วนำมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช และคัดเลือกสาหร่ายที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช นำไปศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมที่สาหร่ายจะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี รวมถึงศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่คัดเลือกได้ ศึกษาการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน และจะต้องมีการนำสารสกัดไปทดสอบกับต้นพืชในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการและในทุ่งเพาะกล้าซึ่งเป็นระดับที่ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติต่อไป คาดว่าผลการทดลองในระดับนี้จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม และใช้เป็นแนวทางในการค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายสายพันธุ์อื่น เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ควบคู่ไปกับการรักษาสภาพแวดล้อมด้วย

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่มีองค์ประกอบของไนโตรเจน จะทำให้สาหร่ายเจริญเติบโต และมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าอาหารที่ไม่มียอดประกอบของไนโตรเจน

1.3.2 ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราตามระดับความเข้มข้นของสาร โดยถ้าใช้ความเข้มข้นที่สูงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราจะสูงตามไปด้วย

1.3.3 วิธีการปลูกเชื้อราแบบ mixing จะก่อให้เกิดการติดเชื้อสูงกว่า วิธีการปลูกเชื้อราแบบ dipping

1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.4.1 คัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช

1.4.2 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือก

1.4.3 ศึกษาความสามารถของสารสกัด (crude extract) จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการยับยั้งเชื้อราบนต้นพืชเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับทุ่งเพาะกล้า

1.4.4 ศึกษาการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนรวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

1.5 ขอบเขตในการวิจัย

1.5.1 ทำให้สาหร่ายบริสุทธิ์ เลี้ยงสาหร่ายให้ได้ปริมาณมาก และนำมาสกัด

1.5.2 คัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี โดยการทดสอบกับเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Colletotrichum truncatum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*

1.5.3 ศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายที่คัดเลือกได้ โดยการคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงที่เหมาะสม ศึกษาความต้องการธาตุอาหารต่างๆ ได้แก่ ไนโตรเจน โดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โซเดียมคลอไรด์ และศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือก

1.5.4 ทดสอบความสามารถของสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชบนต้นพืชเบื้องต้น โดยมีการศึกษารูปแบบ (formula) การใช้สารสกัดที่เหมาะสม และความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อราบนเมล็ดถั่วเหลืองในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับทุ่งเพาะกล้า

1.5.5 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของสารสกัด ได้แก่ ความคงตัวของสารสกัดที่อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-เบสต่างๆ

1.5.6 ศึกษาการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโทกราฟีและทดสอบคุณสมบัติทางเคมีบางประการของสาร

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ใช้เป็นแนวทางในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ ลดปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม ลดปัญหาอันตรายของสารเคมีต่อตัวเกษตรกรและผู้บริโภค รวมทั้งลดการขาดดุลการค้าในด้านการนำเข้าสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชจากต่างประเทศ



แผนผังแสดงขั้นตอนการวิจัย



บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae)

อยู่ใน Division Cyanophyta อาจมีชื่อเรียกเป็นอย่างอื่นว่า Division Myxophyta หรือ Cyanophycophyta หรือ Cyanochloronta (21) ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้น อาจใช้คำว่า Cyanophytes หรือ Cyanobacteria (30)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ จำพวกโปรคาริโอต (prokaryote) ที่มีขนาดเล็ก เป็นกลุ่มสาหร่ายที่มีจำนวนชนิด (species) มากที่สุดคือ 7,500 ชนิด หรืออาจมากกว่านี้ (33) สามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง พบได้ทั่วไปทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล บนบก ตามเปลือกไม้ ใบไม้ และที่ชื้นแฉะทั่วไป สภาพที่อยู่ในน้ำอาจอยู่แบบอิสระหรือเกาะติดกับวัตถุอื่นที่จมอยู่ในน้ำ อาจมีการอยู่ร่วมกันของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกับสิ่งมีชีวิตอื่นบางชนิด เช่น *Anabaena azolla* ในแหนแดง ทำให้เกิดการตรึงไนโตรเจน (N_2 -fixation) สาหร่ายกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญของโปรคาริโอต เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์เอ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ และมีออกซิเจนเกิดขึ้นจากการสังเคราะห์แสงด้วย

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

2.1.1.1 ลักษณะเซลล์

เป็นโปรคาริโอตไม่มีนิวเคลียส มีเฉพาะดีเอ็นเอ ที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ผนังมีชีท (sheath) ซึ่งเป็นสารเมือกหุ้มอยู่ มีความหนาบางต่าง ๆ กัน อาจมีสีหรือไม่มีสีหรือเป็นชั้นๆ การที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีชีทหุ้มทำให้สามารถขึ้นอยู่ที่แห้งแล้งได้ เพราะสามารถดูดซึมและอุ้มน้ำได้ดี ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างในจะเป็นพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ซึ่งห่อหุ้มไซโตพลาสซึมไว้ บริเวณไซโตพลาสซึมนอกจากจะมีดีเอ็นเอ ยังพบรงควัตถุกระจายอยู่ทั่วไป มีแก๊สแวกคิวโอลลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไปในโครโมพลาสซึม (chromoplasm) นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างซึ่งเป็นเม็ดเล็กๆ (granule) ดังนี้

- โพลีฟอสเฟตแกรนูล (polyphosphate granule) ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมฟอสเฟต มีขนาดใหญ่อยู่ใกล้กับ เซนโทรพลาสซึม (centroplasm) แกรนูลชนิดนี้จะไม่พบในสาหร่ายที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมฟอสเฟต อย่างไรก็ตามแกรนูลชนิดนี้จะถูกพบได้อีกหากมีการเติมฟอสเฟตในอาหาร

- ไชยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule) เป็นแกรนูลที่สะท้อนแสงได้พบใน vegetative cell และ akinetes (spore) ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมไนโตรเจน

- คาร์บอกซีโซม (carboxysomes) มีลักษณะเป็นทรงแหริเหลี่ยม (polyhedral) ซึ่งห่อหุ้มด้วยเยื่อบาง ภายในบรรจุเอนไซม์ RBP-carboxylase (ribulase 1,5 - biphosphate carboxysomes) โดย carboxysomes ทำหน้าที่ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 - fixation)

- ไกลโคเจนแกรนูล (glycogen granule) พบอยู่ระหว่าง photosynthetic lamella ในรูปของผลึก แท่ง หรือแผ่น มีหน้าที่เป็น photosynthetic reserve material (carbon และ energy)

2.1.1.2 รงควัตถุ (pigment)

รงควัตถุของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไม่ได้อยู่ในพลาสติด (plastid) แต่อยู่บริเวณเมมเบรนที่เรียกว่า ไทลาคอยด์ (thylakoid) ซึ่งไทลาคอยด์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะแตกต่างจากไทลาคอยด์ของสาหร่ายชนิดอื่นๆตรงที่ไม่มีเยื่อบางๆ หุ้ม รงควัตถุประกอบด้วย

- คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll-a) เป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงซึ่งอยู่ในไทลาคอยด์ ทำหน้าที่จับพลังงานแสง และถ่ายทอดสู่ photosystem I และทำหน้าที่เฉพาะในส่วน of cyclic photophosphorylation

- เบต้าแคโรทีน (β -carotene)

- แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ได้แก่ มิโซแซนทีน (myxoxanthin), มิโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll), ออสซิลลาแซนทีน (oscillaxanthin), ซีอาแซนทีน (zeaxanthin), ลูเตอิน (lutein), ฟลาวิน (flavasin), อะฟานิโซฟิลล์ (aphanizophyll), อะฟานิซิน (aphanycin)

- ไฟโคบิลิน (phycobilin) ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (c-phycocyanin), ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycocyanin) และ ซี-ไฟโคอีริทริน (c-phycoerythrin)

2.1.1.3 เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst)

เป็นเซลล์พิเศษที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเส้นสายบางชนิดเท่านั้น มีลักษณะต่างจากเซลล์ธรรมดาตรงที่มีผนังเซลล์หนา ถ้าดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นว่าส่วนประกอบของเซลล์เป็นเนื้อเดียวกันหมด แต่ถ้าดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบว่าภายในมีเมมเบรนและภายในเซลล์มีลักษณะใสเป็นสีเหลืองจางๆ เนื่องจากขาดรงควัตถุสังเคราะห์แสง เหลือแต่เฉพาะพวกแคโรทีน การเกิดเฮเทอโรซิสต์นั้นเกิดโดยเซลล์หนึ่งในสายจะสะสมอาหารไว้มาก ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์เดิมซึ่งเป็นรูปเหลี่ยมจะเปลี่ยนเป็นกลมขึ้น หลังจากนั้นไซโตพลาสซึมจะไหลผ่านรูเล็กๆ ที่ผนังเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียง ทำให้สีซีดลงและมีแกรนูลเล็กๆ มาปิดรูไว้ เรียก โพลาร์โนตช์ (polar notch) หรือ โพลาร์โนดูล (polar nodule) หน้าที่ของเฮเทอโรซิสต์เดิมที่เชื่อว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สร้างเฮเทอโรซิสต์เท่านั้นที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ทั้งนี้เพราะว่าเฮเทอโรซิสต์มักเกิดขึ้นในขณะที่อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินขาดสารประกอบไนโตรเจน เฮเทอโรซิสต์จะสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย จึงทำให้เชื่อว่าเฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน แต่มีรายงานว่า *Gloeocapsa* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเซลล์เดียวและไม่มีเฮเทอโรซิสต์ก็สามารถตรึงไนโตรเจนได้ และต่อมาพบว่า *Plectonema boryanum* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดที่เป็นเส้นสาย แต่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์ก็สามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นกัน เฮเทอโรซิสต์ยังเป็นจุดอ่อนที่ทำให้เกิดการขาดท่อน แต่ละท่อนที่ขาดออกมานี้เรียก ฮอร์โมโกน (hormogone) หรือ ฮอร์โมโกเนีย (hormogonia) ซึ่งอาจเป็นสายยาว หรือเป็นสายสั้นๆ ประกอบด้วยเซลล์เพียง 2 หรือ 3 เซลล์ แต่ละท่อนสามารถเจริญเติบโต และแบ่งเซลล์ให้เป็นสายที่ยาวต่อไปได้ หน้าที่สำคัญอีกประการคือ ช่วยในการสร้างสปอร์ เนื่องจากพบว่าเซลล์ที่สร้างสปอร์ หรือ ออซีนิต มักติดอยู่กับเฮเทอโรซิสต์และได้รับการถ่ายทอดอาหารมาจากเฮเทอโรซิสต์

2.1.1.4 การแตกแขนง (branching)

การแตกแขนงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่พบมี 2 ประเภท ได้แก่

ก. การแตกแขนงแท้ (true branching) มี 3 แบบ คือ

- การแตกแขนงข้าง (lateral branching) เกิดจากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในสายทำการแบ่งตัวในแนวตั้งฉากกับแนวการแบ่งเซลล์ปกติ หลังจากนั้นเซลล์ที่เกิดใหม่จะแบ่งเซลล์ต่อไปอีก ทำให้เกิดแขนงงอกยาวออกไปทางด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน

- การแตกแขนงคู่ (dichotomous branching) เกิดจากการแบ่งเซลล์ยอด (apical cell) ของเส้นสาย โดยทำการแบ่งตามแนวแขนงกับแนวแกนได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ และจะแบ่งตัวต่อไปอีกได้แขนงใหม่อยู่ตรงปลายเป็นคู่

- การแตกแขนงแบบตัว V คว่ำ (mastigocladaceous หรือ reverse “v” shape branching) เกิดจากการแบ่งเซลล์จากปกติ หลังจากนั้นเซลล์ที่เกิดใหม่ทั้ง 2 เซลล์จะยึดตัวและดันออกไปทางเดียวกัน แล้วจึงทำการแบ่งเซลล์ต่อไปอีกให้แขนงสั้นๆ ชนกัน และชะงักการเจริญเติบโตทำให้มีลักษณะเป็นรูปตัว “v” คว่ำ

ข. การแตกแขนงเทียม (false branching)

การแตกแขนงเทียมพบเฉพาะในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเท่านั้น เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ในเส้นสายแบ่งตัวตามปกติได้เซลล์ใหม่สองเซลล์ หนึ่งเซลล์ส่วนที่ชนกันจะโค้งมน หลังจากนั้นเซลล์ใหม่ทั้งสองเซลล์หรือเพียงเซลล์เดียวจะทำการแบ่งตัวเกิดเป็นแขนงใหม่ดันออกไปทางด้านข้างของสายเดิมเกิดเป็นแขนงเทียม ถ้าเจริญเพียงแขนงเดียวเรียกว่า แขนงเทียมเดี่ยว (false branch in single) หากเจริญทั้งสองแขนงเรียกแขนงเทียมคู่ (false branch in pair) การเกิดแขนงเทียมนี้ แขนงที่แตกใหม่อาจค้นชีวิตที่หุ้มติดไปด้วยหรืออาจแทงทะลุชีวิตออกไป ทำให้เกิดมีรอยขาดของชีวิตเดิม เรียกรอยนี้ว่า โอครี (ocrea)

2.1.1.5 การสืบพันธุ์

พบเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ วิธีการสืบพันธุ์ที่พบ ได้แก่ การแบ่งเซลล์ และการสร้างสปอร์

- การแบ่งเซลล์ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเส้นสายจะเกิดการขาดท่อนตรงบริเวณรอยต่อของเฮเทอโรซิสต์กับเซลล์ที่อยู่ติดกัน สำหรับเซลล์ที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์เกิดขึ้นภายในเส้นสายจะมีเซลล์ตาย (dead cell) ซึ่งเป็นจุดอ่อนให้เกิดการขาดท่อน

- การสร้างสปอร์ มีการสร้างสปอร์ 2 แบบ คือ เอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์ และเมื่อหลุดออกจากเซลล์ก็จะเจริญขึ้นใหม่ได้ อีกแบบหนึ่งเรียกว่า เอกโซสปอร์ (exospore) ซึ่งเกิดขึ้นจากการตัดแบ่งบริเวณส่วนปลายของเซลล์ออกมา อาจจะตัดเพียงหนึ่งเซลล์หรือหลายๆ เซลล์ติดต่อกัน

2.1.1.6 แหล่งที่อยู่

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สามารถขึ้นอยู่ได้ทุกแห่งทั่วโลก ไม่ว่าในเขตร้อนหรือเขตหนาว ในน้ำหรือบนบก โดยจำแนกแหล่งที่อยู่ได้ดังนี้

- น้ำจืด (fresh-water habitat)
- น้ำทะเล (marine habitat)
- น้ำพุร้อน (hot spring)
- ที่แห้งแล้ง (arid soil)

นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอาจขึ้นอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอย่างอื่น ทั้งพืชและสัตว์ได้ (1,12)

2.1.2 ความต้องการธาตุอาหารของสาหร่าย

2.1.2.1 ธาตุอาหารหลัก (macronutrient)

ก. ออกซิเจน จำเป็นสำหรับสาหร่ายทุกชนิดเพราะเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างและการสร้างพลังงาน เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในการสังเคราะห์ทางชีวภาพ สาหร่ายอาจได้รับออกซิเจนโดยตรงจากอากาศหรือจากออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ

ข. ไฮโดรเจน (อิเล็กตรอน) สาหร่ายส่วนใหญ่ได้รับอิเล็กตรอนจากการแตกตัวของโมเลกุลน้ำดังสมการ $2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง

ค. คาร์บอน

- อนินทรีย์คาร์บอน สาหร่ายจะใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่ละลายอยู่ในของเหลวเพื่อการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ เมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ละลายอยู่ในน้ำ จะปรากฏในรูปต่างๆ เช่น H_2CO_3 , HCO_3^- หรือ CO_3^{2-} โดยขึ้นอยู่กับช่วงความเป็นกรด-เบส การให้คาร์บอนไดออกไซด์ อาจทำได้ในลักษณะของการพ่นคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์หรือคาร์บอนไดออกไซด์ผสมอากาศ (CO_2 -enriched air) ลงในอาหารเลี้ยง ซึ่งจะใช้ต้นทุนการเลี้ยงต่ำ (66)

- อินทรีย์คาร์บอน ได้แก่ คาร์บอนในรูปของ กลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส มอลโตส ซูโครส ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการสังเคราะห์เซลล์ของ *Chlorella pyrenoidosa* ระหว่าง autotrophic metabolism โดยใช้ CO_2 และ heterotrophic metabolism โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เซลล์รวมถึงร้อยละ 55 (59)

ง. ไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบสำคัญของส่วนเซลล์แห้ง ในน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบตั้งแต่ 1-10 เปอร์เซ็นต์ สารประกอบไนโตรเจนทั้งในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์สามารถนำมาใช้เพื่อการเจริญของสาหร่ายได้ทั้งสิ้น

- การใช้แอมโมเนียม (ammonium) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน จะทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อสาหร่าย สาหร่ายบางชนิดจะไวต่อแอมโมเนียมซึ่งการเจริญของสาหร่ายอาจถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 1 มิลลิโมล

- ไนไตรต์ (nitrite) สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสาหร่ายหลายสายพันธุ์ โดยใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ เพียง 1 มิลลิโมล หากใช้ในไตรต์ที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญ

- สาหร่ายหลายกลุ่มสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของสารประกอบอินทรีย์ในไนโตรเจน เช่น เอมีด (amides) ยูเรีย (urea) กลูตามีน (glutamine) และแอสพาราจีน (asparagine) ซึ่งยูเรียนั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้อัตราการเจริญของสาหร่ายใกล้เคียงกับ ไนเตรตและแอมโมเนีย

- ยังมีแหล่งไนโตรเจนในรูปของ อะมิโนแอซิด (amino acid) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไกลซีน (glycine) เซอรีน (serine) อลานีน (alanine) กลูตามิกแอซิด (glutamic acid) และแอสพาทิกแอซิด (aspartic acid)

- เพียวรีน (purines) อนุพันธ์ของเพียวรีน (purine derivatives) แซนทีน (xanthine) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) และ ยูริกแอซิด (uric acid) ก็มีรายงานว่าสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้

- ผลของการขาดธาตุไนโตรเจน จะเกิดผลเสียต่อเซลล์สาหร่ายอย่างมาก อาจทำให้เกิดการเสื่อมของโมเลกุลที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อมีการขาดธาตุไนโตรเจน เซลล์ที่ขาดธาตุไนโตรเจนจะนำไนโตรเจนจากกลุ่มของสารประกอบที่เก็บไนโตรเจนไว้มาใช้ ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิด คือ ไซยาโนไฟซินแกรนูลโพลีเปปไทด์ (cyanophycin granules polypeptide ; CGP) และ ไฟโคไซยานิน (phycocyanin ; PC) cyanophycin จะมีการสะสมในช่วง stationary phase ของสภาพการเลี้ยงที่มีไนโตรเจนเพียงพอ และจะหมดไปเมื่อขาดแคลนไนโตรเจน ส่วนไฟโคไซยานินจะลดลงอย่างรวดเร็วในเซลล์ที่ขาดแคลนไนโตรเจน และจะปรากฏขึ้นมาเมื่อมีไนโตรเจนเพียงพอ นอกจากนี้การขาดแคลนไนโตรเจนยังมีผลทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์เปลี่ยนไป และมีผลต่อการสร้างเฮเทอโรซิสต์นั้นคือเมื่อสารประกอบไนโตรเจนลดลง จะมีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ และเอนไซม์ไนโตรจีนัสจะทำงานเพื่อเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง ultrastructure

ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยทำให้ไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) หายไป มีการสะสมของโพลีแซคคาไรด์ มีการจัดเรียงไทลาคอยด์ใหม่และมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนขององค์ประกอบภายในเซลล์

จ. ฟอสฟอรัส เป็นหนึ่งธาตุอาหารหลักที่จำเป็นสำหรับสาหร่าย โดยมีบทบาทสำคัญในการสร้างพลังงาน ATP และการสังเคราะห์นิวคลีอิกแอซิด สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีความต้องการปริมาณฟอสฟอรัสแตกต่างกันไป การนำฟอสฟอรัสไปใช้จะถูกกระตุ้นโดยแสง อัตราการนำไปใช้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-เบสชนิดของสาหร่าย และปริมาณ Na^+ K^+ หรือ Mg^+ ที่มีอยู่

ลักษณะของการขาดฟอสฟอรัส อาการจะคล้ายคลึงกับการขาดแคลนไนโตรเจน องค์ประกอบของโปรตีน คลอโรฟิลล์เอ อาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอ จะลดลงในขณะที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐาน เช่น ขนาดและรูปร่างของเซลล์ ไตรโคม (trichome) ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดจะมีการสะสมของไซยาโนไฟซินแกรนูล การขาดฟอสฟอรัสยังชักนำให้มีการสร้างอะคินีต และยับยั้งการสร้างเฮเทอโรซิสต์ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิด

ฉ. ซัลเฟอร์ ซัลเฟอร์จำเป็นสำหรับการสร้างอะมิโนแอซิดที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ เมไทโอนีน (methionine) ซีสทีน (cystine) และซิสเตอีน (cysteine) รวมทั้ง ไบโอติน (biotin) แพนโททีนิก แอซิด (pantothenic acid) ไทอะมิน (thiamin) ไลโปอิก แอซิด (lipoic acid) และ สารกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factor) บางตัว เช่น ซัลโฟไลปิด (sulfolipids) เป็นต้น สาหร่ายเกือบทั้งหมดได้รับซัลเฟอร์ในรูปของอนินทรีย์ซัลเฟต มีเพียงบางชนิดที่ได้รับซัลเฟอร์จากสารประกอบอินทรีย์ซัลเฟต เช่น *Chlorella vulgaris* สามารถใช้ซัลเฟอร์จากเมไทโอนีน เป็นต้น

ช. แคลเซียม จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งหน้าที่ที่แท้จริงของแคลเซียมนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน

ซ. โซเดียม โพแทสเซียม และคลอรีน สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อาศัยอยู่ในน้ำเค็มจะมีความต้องการโซเดียมมากกว่ากลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด โซเดียมจะเป็นตัวกระตุ้น (activator) สำหรับเอนไซม์หลายชนิด เซลล์สาหร่ายที่ขาดโพแทสเซียมจะสามารถทดแทนได้ด้วยโซเดียม ส่วนโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบร่วมของเอนไซม์หลายชนิด เป็นส่วนประกอบ

ของโครงสร้างไรโบโซม การสังเคราะห์โปรตีนและการเคลื่อนย้ายสาร การนำคลอรีนไปใช้ของสาหร่ายจะเกิดขึ้นร่วมกันกับการใช้โปแตสเซียมและโซเดียม

ณ. แมกนีเซียม มีความสำคัญสำหรับขบวนการเมแทบอลิซึม มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายพลังงาน ATP

2.1.2.2 ธาตุอาหารรอง (micronutrient)

ก. เหล็ก มีส่วนเกี่ยวข้องกับการนำไนโตรเจนไปใช้ โดยเฟอริดอกซิน (ferredoxin) จะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับไนเตรตและไนไตรต์รีดักเตส เหล็กยังมีความสำคัญสำหรับขบวนการสังเคราะห์แสงโดยมีส่วนในการสังเคราะห์รงควัตถุ คือ คลอโรฟิลล์เอ และซี-ไฟโคไซยานิน เป็นองค์ประกอบของฮีมริง (heme ring) จึงมีส่วนร่วมในการสังเคราะห์ไซโตโครม (cytochrome)

เหล็กนั้นจะถูกนำไปใช้ 2 ช่วงเวลาด้วยกัน ครั้งแรกคือช่วงที่เริ่มใส่กล้าเชื้อสาหร่ายลงในอาหารเลี้ยง อีกช่วงหนึ่งคือช่วงที่สาหร่ายเจริญจนหนาแน่นในอาหารเลี้ยงและหยุดเจริญ หากว่าเหล็กมีอยู่จำกัดในอาหารเลี้ยง จะทำให้ ซี-ไฟโคไซยานิน และคลอโรฟิลล์เอเสื่อมลงพร้อมๆกัน ในสาหร่ายบางชนิดจะทำให้ภายในเซลล์เกิดการสะสมพอลิแซ็กคาไรด์ ตามมาด้วยการเสื่อมของไรโบโซมและไทลาคอยด์เมมเบรน

ข. โบรอน จำเป็นสำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม แต่ไม่จำเป็นสำหรับสาหร่ายสีเขียว

ค. แมงกานีส คอปเปอร์ และสังกะสี แมงกานีสและคอปเปอร์ เป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ธาตุเหล่านี้ยังมีหน้าที่ในเซลล์โดยเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด

ง. โมลิบดีนัม โคบอลต์

โมลิบดีนัมมีหน้าที่ในกระบวนการไนไตรต์รีดักเตส และการตรึงไนโตรเจนสำหรับสาหร่ายที่ได้รับไนโตรเจนด้วยขบวนการเหล่านี้

ส่วนโคบอลต์จะเป็นที่ต้องการของสาหร่ายหลายชนิดโดยเฉพาะ *Nostoc muscorum*, *Calothrix parietina*, *Coccochloris peniocyctis* และ *Diplocystis aeruginosa* ซึ่งหากไม่เติมโคบอลต์ในอาหารเลี้ยงจะทำให้อัตราการเจริญลดลง ร้อยละ 20 ถึง 75

2.1.3 ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

2.1.3.1 แสง

เมื่อมีการให้แสงในการเลี้ยงสาหร่ายมากเกินไปจะทำให้สาหร่ายมีอัตราการสังเคราะห์แสงลดลง โดยสาหร่ายจะมีการตอบสนองต่อแสงใน 2 รูปแบบ คือ photoinhibition และ photoinactivation การให้แสงที่มีความเข้มสูงเป็นระยะเวลานานๆ จะทำให้เกิด photoinhibition เกิดการยับยั้งขบวนการหายใจภายในเซลล์

ในสาหร่ายน้ำเค็ม *Amphidinium carterae* จะมีอัตราการสังเคราะห์แสงสูงสุดเมื่อได้รับแสงในอัตรา $15 \mu\text{E} / \text{m}^2 / \text{s}$ แต่จะเกิด photoinhibition เมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มแสง 80 ถึง $150 \mu\text{E} / \text{m}^2 / \text{s}$

สำหรับคุณภาพของแสงก็มีผลต่อเซลล์ ทั้งช่วงแสง UV และ visible light ก็สามารถสร้างความเสียหายแก่เซลล์ได้ แสงสีฟ้าสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ DNA รวมทั้งสามารถทำลายไซโตโครม

- การบดบังแสงต่อการปรับตัวของสาหร่าย

เมื่อมีการบดบังแสง (light-shade) ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุภายในเซลล์ สาหร่ายจะมีการปรับตัวเพื่อตอบสนองใน 2 ลักษณะ คือ

ลักษณะที่ 1 เป็นลักษณะของความสัมพันธ์ผกผันระหว่างความเข้มของแสงที่สาหร่ายได้รับกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอที่มีอยู่ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุเกิดขึ้น

ลักษณะที่ 2 เป็นลักษณะของความสัมพันธ์ผกผันระหว่างความเข้มของแสงที่สาหร่ายได้รับกับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

- ผลของแสงต่อการเคลื่อนที่ของสาหร่าย

เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแสงให้สูงขึ้นอย่างทันทีทันใด อาจจะทำให้สาหร่ายเกิดการหยุดนิ่ง หรืออาจมีลักษณะการตอบสนองแตกต่างกันไปตามแต่ละลักษณะสัณฐานและลักษณะการเคลื่อนที่ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งจะมีการเคลื่อนที่ช้าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของแสงอย่างทันทีทันใด หรือสาหร่ายอาจจะหยุดนิ่ง ซึ่งลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะ

การเคลื่อนที่แบบหนีแสง (passive movement) ส่วนการเคลื่อนที่ของสาหร่ายอีกลักษณะหนึ่งคือ การเคลื่อนที่เข้าหาแสง (active movement) จะเกิดขึ้นเมื่อสาหร่ายได้รับความเข้มแสงต่ำ

2.1.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อเมแทบอลิซึม ความต้องการธาตุอาหารและองค์ประกอบของชีวมวล (biomass) ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเพิ่มของน้ำหนักเซลล์ มี 2 ประการ ประการแรกคือ ผลที่มีต่อองค์ประกอบโครงสร้างเซลล์โดยเฉพาะในส่วนของโปรตีนและไขมัน ประการที่สอง คือ ผลต่อปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และมีการค้นพบว่าอุณหภูมิยังเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมัน

2.1.3.3 ความเป็นกรด-เบส

ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงสาหร่ายมีผลโดยตรงต่อการเจริญของสาหร่าย สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จะต้องการค่าความเป็นกรด-เบสที่แตกต่างกันไป สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-เบส 7.0 ถึง 10.0 เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้สามารถใช้ไบคาร์บอเนตไอออนในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic carbon fixation)

2.1.4 สารเคมีที่พบในเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

2.1.4.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารพิษที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เป็นสารที่ผลิตจากเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ ซึ่งเป็นเมแทบอลิซึมที่ไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต ถึงแม้ว่าบางครั้งจะช่วยในการอยู่รอดในธรรมชาติก็ตาม สารเหล่านี้ถูกเรียกว่า สารทุติยภูมิ (secondary metabolites ; idiolites) ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในช่วงที่การเจริญอย่างรวดเร็ว (exponential phase) ของสิ่งมีชีวิตเกือบจะสิ้นสุด

ได้มีการศึกษาพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งแบคทีเรียและสาหร่าย (42,48,51,52) ยับยั้งไวรัส (65) ยับยั้งเชื้อรา (71) เป็นสารกำจัดสาหร่าย (53) รวมถึงเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ (23) และเป็นสารพิษเฉียบพลันอยู่ในแหล่งน้ำซึ่งเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและการตายของสัตว์ในหลายพื้นที่ทั่วโลก (15)

Bloor, S. และ England, R.R. (20) ได้รายงานการผลิตสารปฏิชีวนะจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc muscorum* โดยเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปหมฟุ้งขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้แสงที่มีความเข้ม $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR และพ่นด้วย 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ในอากาศ นำสารสกัดจากสาหร่ายในระยะ post-exponential มาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนั้น ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarum* และ *Hormocornis resinae* รวมไปถึงเชื้อยีสต์ สายพันธุ์ *Candida albicans* และ *C. pseudotropicalis* โดยสารปฏิชีวนะที่พบนั้น มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 2,000-3,000 ดาลตัน (Daltons)

Chetsumon (35) ได้ศึกษาถึงสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Scytonema* sp. TISTR 8208 ที่ถูกตรึงบนแผ่นโพลียูรีเทน โดยตัดแปลงอาหารเลี้ยง BGA ด้วยการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร เพิ่มความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต เป็น 0.025 กรัมต่อลิตร ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ รวมทั้งปรับ pH เริ่มต้นเป็น 7.0 เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้แสงที่มีความเข้ม $90 \mu\text{mol photon}/\text{m}^2/\text{s}$ จากการศึกษาพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดนี้ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (BGA) ถึง 20 เท่า โดยจะผลิตสารปฏิชีวนะดีที่สุดในช่วง post-exponential ของการเจริญเติบโต และสารนี้จะทนความร้อนโดยจะคงสภาพเดิม ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 2 ชั่วโมง แต่จะสูญเสียสภาพเดิมเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 75 นาที

Florence, K.Gleason และ Deborah, E case (43) รายงานว่า สาร cyanobacterin เป็นกลุ่มของสาร diaryl - substituted gamma lactone ที่มีคลอรีนเกาะอยู่ที่วงหนึ่งของ aromatic ring ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Scytonema hofmanni* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยใช้สารที่ความเข้มข้น $5 \mu\text{M}$ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชชั้นสูง ซึ่งรวมถึงพืชน้ำ *Lemma gibba* และ พืชบก เช่น ข้าวโพด และถั่ว จากการศึกษาพบว่าสาร cyanobacterin นี้ ไปยับยั้งปฏิกิริยาฮิลล์ (Hill reaction) ในกระบวนการ photosystem II โดยสารนี้จะเข้าไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิเจน และใช้ความเข้มข้นของสารน้อยกว่าสารยับยั้งตัวเดิมที่ใช้กันอยู่ คือสาร 3-(3,4- dichlorophenyl) -1,1- dimethylurea หรือ DCMU

Surk-Sik Moon และคณะ (67) รายงานว่าสาร calophycin ที่ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix fusca* EU-10-1 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี disc-diffusion soft agar plate โดยใช้สาร calophycin ที่ความเข้มข้น 1.2 µg/disc พบว่า ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Trichophyton mentagrophytes* โดยให้ขนาดโซนยับยั้ง 13, 7, 12, 12 และ 15 มิลลิเมตร ตามลำดับ สาร calophycin มีค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans*, *T. mentagrophytes* และ *Aspergillus fumigatus* เท่ากับ 1.25, 2.5 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการจัดจำแนกสาร calophycin โดยหาสูตรโครงสร้างทางเคมี พบว่าเป็นสารจำพวก cyclic decapeptide, cyclic (L-Ala-D-Asp-L-Asn-L-Gln-Gly-L-Arg-L-N-MeAsn-L-Pro-(2R,3R,4S)-Hamp-L-Val โดย Hamp คือ (2R, 3R,4S)-3-amino-2-hydroxy-4-methylpalmitic acid unit และ MeAsn คือ N-methylasparagine residue

Walter P. Frankmole และคณะ (70) รายงานว่า สาร laxaphycin A และ B เป็นสาร cyclic peptide ที่ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena laxa* FK-1-2 สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราได้

สาร tjipanazoles ซึ่งแยกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Tolypothrix tjipanensis* โดยสาร tjipanazoles นี้เป็นสารจำพวก indolo [2,3-9] carbazoles มีโครงสร้างที่คล้ายกับสารที่พบในแอคตินอมัยซิสท์ และราเมือก แต่ไม่มีวงของ pyro [3,4-C] สารนี้จะยับยั้งเชื้อราเซลล์เล็กน้อย แต่ในระดับ in vivo แล้วจะไม่สามารถต่อต้านเชื้อ *Candida albicans* ได้ อย่างไรก็ตาม tjipanazoles A และ A₂ สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราโรคไหม้ของข้าวและโรคราสนิมของข้าวสาลีด้วย

Boris V.Gromov และคณะ (22) รายงานว่าสาร cyanobacterin LU-1 ที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc linckia* CALU 892 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น *Synechococcus* sp. R-2 PCC 7942, *Anabaena variabilis* ATCC 27829, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc punctiforme* str. Gromov 1964/1 และยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายชั้นสูง (eukaryotic algae) บางตัว เช่น *Ankistrodesmus acicularis* str. Basleva อัตราที่น้อยที่สุดที่สารจะมีผลยับยั้ง (minimum effective dose) การเจริญเติบโตของสาหร่ายดังกล่าว คือ ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

อย่างไรก็ตามสารปฏิชีวนะ cyanobacterin LU-1 นั้น ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย, รา รวมทั้งไม่มีพิษต่อหนูด้วย

Elisabeth M.Gross (39) รายงานว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Fischerella muscicola* (thur.) Gom. UTEX 1829 สามารถสังเคราะห์สารโดยให้ชื่อว่า fischerellin ซึ่งสารนี้สามารถยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่นๆ เช่น *Anabaena variabilis* P9 derivative of ATCC 29413, *Anabaena* sp. ATCC 27893 PCC 7120, *Synechococcus* sp. PCC 6911, *Synechocystis* sp. CB-3 รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตในสาหร่ายสีเขียบบางตัว ได้แก่ *Ankistrodesmus falcatus*, *Nannochloris* sp. SAG 55-81 และ *Scenedesmus obliquus* โดยวิเคราะห์ได้ว่าสารออกฤทธิ์ตัวหลักเป็นสารไลโปฟิลิก (lipophilic) มีคุณสมบัติทนกรด ทนความร้อน แต่จะสลายตัวในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 ชั่วโมง คุณสมบัติอื่นๆ ของ fischerellin คือ สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์หลายๆชนิด รวมไปถึง methanol, ethanol, acetonitrile, acetone, diethylether และ tert-butylmethylether แต่ละลายในน้ำได้น้อย เซลล์ที่ทำให้แห้งในสภาพแข็งที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol รวมทั้งสารสกัดที่บริสุทธิ์แล้วสามารถเก็บรักษาไว้ได้หลายเดือนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่เสื่อมประสิทธิภาพ

Barchi (18) ได้แยกสารกลุ่ม macrolide จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินน้ำจืด ชื่อว่า *Oscillatoria acutissima* ได้สาร 2 ชนิด คือ acutiphycin และ 20,21- didehydroacutiphycin ซึ่งมีพิษสูงในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง KB และ NIH /3T3 อีกทั้งยังมีผลในการต่อต้านการเกิดเนื้องอกในสัตว์ทดลอง สารกลุ่ม macrolide อื่นที่มีพิษต่อเซลล์และมีผลต่อการยับยั้งเชื้อรา คือ สาร scytophycines A,B,C,D และ E เป็นสาร macrolide ซึ่งวงของ C₂₁- lacton อยู่ด้วย สารเหล่านี้แยกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่อยู่บริเวณชายฝั่งที่ชื่อว่า *Scytonema pseudohofmanni* (55)

Kashiwagi และคณะ (49) พบว่า *Lyngbya majuscula* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อาศัยอยู่ในน้ำเค็ม แพร่กระจายอยู่ทั้งในน้ำตื้นและน้ำลึกนั้น มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจคือ สารที่ผลิตจากสาหร่ายชนิดนี้ทำให้เกิดการแพ้ทางผิวหนังแก่ผู้คนที่ลงเล่นน้ำ (62) สารสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบและผื่นตามผิวหนังมีชื่อว่า lyngbyatoxins, aplysiatoxins และ oscillatoxins ส่วนสารองค์ประกอบที่มีความสำคัญรองลงมา คือ lipophilic malyngamide A (25), B และ C (24) ซึ่งเกิดแพร่กระจายในบริเวณน้ำตื้นและ malyngamide D และ E ซึ่งพบ

แพร่กระจายบริเวณน้ำลึก (56) สำหรับสาร O-methyl acid ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (44) และ lacton(-)- malyngolide นั้น เป็นสารปฏิชีวนะหลักในสารสกัดจากไขมันที่สกัดได้จาก สายพันธุ์ที่พบบริเวณน้ำตื้น (26)

สาร malyngamide D จาก *Lyngbya majuscula* ซึ่งลักษณะไม่เหมือนกันที่ เดียวกับ malyngamide D ที่กล่าวถึงโดย Mynderse และ Moore (56) สารนี้เป็นพิษต่อเซลล์ KB ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (44) มีการพบสาร lipodipeptides majusculamide A และ B ใน บริเวณน้ำตื้นแต่เป็นสาร ไม่มีพิษ แต่ในบริเวณน้ำลึกจะพบสายพันธุ์ที่ผลิตสาร depsipeptide majusculamide C ซึ่งสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้จำนวนหนึ่ง (31,54)

Anabaena flos-aquae นั้นเป็นที่ยอมรับกันว่า มีพิษต่อสัตว์ปีก รวมถึงสัตว์อื่นๆ ด้วย เหตุการณ์เช่นนี้เกิดขึ้นบ่อยๆ ในทะเลสาบทางตะวันตกของ ประเทศแคนาดา และสหรัฐอเมริกา สารที่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันนี้ได้ถูกตรวจสอบโดยแยกจาก *A. flos-aquae* (47) และได้รับการพิสูจน์ชี้ชัดว่าเป็นสารพวก alkaloid (+)-anatoxin-a สารนี้มีผลต่อระบบประสาท และ ระบบกล้ามเนื้อ (29)

สารปฏิชีวนะ tubercidin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเซลล์นั้น เดิมพบใน *Streptomyces tubercidicus* และยังพบใน *Tolypothrix byssoidea* ด้วย สารนี้มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (19) ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Aphanizomenon flos-aquae* ผลิตสาร aphanatoxin ซึ่งเป็นสาเหตุการแพร่ของสารพิษในน้ำ (60)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายๆตัวผลิตสารพิษพวกเปปไทด์ (28) สารที่รู้จักกัน ดีที่สุดคือสารที่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อตับซึ่งผลิตจาก *Microcystis aeruginosa* แต่บางสายพันธุ์ซึ่ง พบทางตอนเหนือของอเมริกานั้น ทำให้เกิดพิษต่อระบบประสาทด้วย การแพร่กระจายเป็น จำนวนมากของ *Microcystis* นั้น เกี่ยวพันกับการล้มตายของสัตว์ปีก สัตว์ป่า ในหลายๆ พื้นที่ทั่วโลก (29)

2.1.4.2 ไขมัน (lipids) และกรดไขมัน (fatty acid)

ไขมันของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ประกอบด้วย glycerolipid 4 ชนิด ได้แก่ monogalactosyl diglycerides (MGDG), digalactosyl diglycerides (DGDG), sulfoquinovosyl diglycerides (SQDG), phosphatidyl glycerol (PG) เป็นส่วนใหญ่

มีการศึกษาถึง sulfolipids ในส่วนของ glycolipids ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Lyngbya*, *Phormidium*, *Oscillatoria* เพื่อใช้เป็นสารต่อต้านมะเร็งและโรคเอดส์

ไขมันสำคัญของสาหร่ายคือ polyunsaturated fatty acid (PUFA) โดยเฉพาะกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid; EFA) โดยไขมันที่มีความจำเป็นต่อมนุษย์ได้แก่ linoleic acid (18:2), γ -linolenic acid (GLA, 18:3-6,9,12), dihomogamma-linolenic acid (DGLA, 20:3-8,11,14), arachidonic acid (AA, 20:4-5,8,11,14) และ eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5-5,8,11,14,17) ซึ่งใน *Spirulina platensis* พบกรดไขมัน γ -linolenic acid (18:3) 21 เปอร์เซ็นต์ของไขมันทั้งหมด (36)

2.1.4.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators, PGR)

PGR เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ควบคุมหรือมีผลกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืช รวมถึงฮอร์โมนและยากำจัดวัชพืช มีการทดสอบ PGR จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดที่เป็นเส้นสายและตรึงไนโตรเจนได้ โดยทดสอบกับพริกไทย ผักกาด และมะเขือเทศ (36)

2.1.4.4 เอนไซม์ (enzyme)

เอนไซม์ phosphoglycerate kinase (PGK) ซึ่งใช้ในการตรวจหา ATP นั้นสามารถผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina platensis* และยังพบว่า restriction endonuclease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายสารพันธุกรรมที่แปลกปลอมเข้าไปในเซลล์สามารถผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดเช่น *Anabaena*, *Mastigocladus* และ *Microcoleus* (58)

2.2 เชื้อราสาเหตุโรคพืช

จัดอยู่ในควิชั้น ไมโคต้า (Division Mycota) เป็นพืชชั้นต่ำที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ ไม่มีระบบสังเคราะห์อาหารเช่นในพืชชั้นสูง มีขนาดเล็กมองเห็นได้โดยกล้องจุลทรรศน์ ดำรงชีพโดยอาศัยอาหารจากพืชและสัตว์อื่นๆ ลักษณะโดยทั่วไปของราส่วนใหญ่จะเป็นเส้นใย (hypha) แต่ในรบบางชนิดอาจพบลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยว เช่น ราน้ำ เป็นต้น ราชจะมีนิวเคลียสที่มีผนังห่อหุ้ม (nuclear membrane) และมีนิวคลีโอลัส (nucleolus) ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารไคติน (chitin) หรือ เซลลูโลส (cellulose) หรือทั้งสองอย่างรวมกัน และมีสารประกอบอื่นๆ พวก complex polysaccharides การขยายพันธุ์ทั่วไป มีทั้งแบบใช้เพศและไม่ใช้เพศ สิ่งที่ใช้ในการแพร่พันธุ์เรียกว่า สปอร์ (spore) ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของรา

มีมากกว่า 8,000 สายพันธุ์ ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช รบบางชนิดจะอยู่บนพืชอาศัยที่มีชีวิต (living host tissue) ตลอดวงจรชีวิตของรานั้น เรียกว่า obligate parasite ราชชนิดนี้ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ส่วนรบบางชนิด อาจมีชีวิตอยู่ได้บนอินทรีย์วัตถุที่เน่าเปื่อยผุพังในดิน และในบางระยะในวงจรชีวิตของมันอาจเข้าทำลายพืชได้ ราชพวกนี้เรียกว่า facultative saprophyte (หรือ facultative parasite) สามารถเจริญเติบโตจนครบวงจรบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ลักษณะราที่เป็นสาเหตุโรคพืช ส่วนมากจะมีเส้นใยที่เรียกว่า hypha เมื่อ hypha เกิดรวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า mycelium เส้นใยของราชจะมีขนาดความกว้างแตกต่างกันไปตั้งแต่ 0.5-100 ไมครอน ส่วนความยาวของเส้นใยก็อาจแตกต่างกัน เช่น อาจมีความยาว 2-3 ไมครอน จนถึงยาวหลายๆ เมตร เช่น ไรโซมอร์ฟ (rhizomorph) เส้นใยของรบบางชนิดจะมีผนังกั้นขวาง (septum) แบ่งเส้นใยออกเป็นหลายๆ เซลล์ (septate hypha) ในเซลล์หนึ่งอาจจะมีหนึ่งหรือสองนิวเคลียส ส่วนในรบบางอย่างเส้นใยจะไม่มีผนังกั้นขวาง (coenocytic hypha) และราชพวกนี้จะมีนิวเคลียสเป็นจำนวนมาก การเจริญเติบโตของราชโดยทั่วไปจะเกิดที่บริเวณปลายสุดของเส้นใย (14)

2.2.1 การจำแนกชั้น (classification) ของราชที่เป็นสาเหตุโรคพืช (plant pathogenic fungi)

Division Mycota แบ่งเป็น 5 class (16) ได้แก่

1. Class Myxomycetes
2. Class Phycomycetes
3. Class Ascomycetes
4. Class Basidiomycetes
5. Class Deuteromycetes

ลักษณะและตัวอย่างของเชื้อราในชั้น (class) ต่างๆ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลักษณะและตัวอย่างของเชื้อราในชั้นต่างๆ (14)

ลักษณะเชื้อรา	ตัวอย่างเชื้อรา	ชื่อโรค
Class Myxomycetes ได้แก่ ราเมือก ราพวกนี้จะไม่สร้าง hypha vegetative structure แต่จะมีลักษณะเป็น plasmodium การแพร่พันธุ์เกิดโดย zoospore	<i>Plasmodiophora brassicae</i> <i>Spongospora subteranae</i>	โรครากเน่าของพืชตระกูลกะหล่ำ โรค powdery scab ของหัวมันฝรั่ง
Class Phycomycetes ได้แก่ราชั้นต่ำ ส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ในน้ำ (water mould or aquatic fungi) มีบางชนิดที่อาศัยอยู่ในดิน ซึ่งกลุ่มหลังนี้ก่อให้เกิดโรคกับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจมาก ลักษณะของราพวกนี้ส่วนใหญ่จะสร้าง coenocytic mycelium การขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ จะสร้าง zoospore ภายใน zoosporangium ส่วนการขยายพันธุ์แบบใช้เพศ จะสร้าง oospore และ zygospore	<i>Pythium debaryanum</i> <i>Phytophthora palmivora</i> <i>Plasmopara viticola</i> <i>Peronospora parasitica</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	โรคเน่าคอดินของกล้าพืช โรครากเน่าของทุเรียน โรคน้ำค้ำขององุ่น โรคน้ำค้ำของพืชตระกูลกะหล่ำ โรค soft rot ของผลไม้และผักต่างๆ
Class Ascomycetes ได้แก่ ราชั้นสูง มีวิวัฒนาการสูงขึ้น ลักษณะโดยทั่วไปจะสร้าง septate mycelium การขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศจะสร้าง conidium ซึ่งเกิดโดยตรงบน conidiophore หรือเกิดภายใน fruiting body แบบต่างๆ ซึ่งได้แก่ pycnidium, sporodochium และ acervulus ส่วนการขยายพันธุ์แบบใช้เพศจะเกิดโดยสร้าง ascospores ภายใน ascus โดยจะเกิดใน fruiting body แบบต่างๆกัน ได้แก่ cleistothecium, perithecium และ apothecium	<i>Erysiphe graminis</i> <i>Microsphaera alni</i> <i>Podosphaera leucotricha</i> <i>Sphaerotheca pannosa</i> <i>Ucinula necator</i>	โรคราแป้งขาวของพืชตระกูลหญ้า โรคราแป้งขาวของ lilac โรคราแป้งขาวของ apple โรคราแป้งขาวของกุหลาบและ peach โรคราแป้งขาวขององุ่น

ตารางที่ 3 ลักษณะและตัวอย่างของเชื้อราในชั้นต่างๆ (ต่อ)

ลักษณะเชื้อรา	ตัวอย่างเชื้อรา	ชื่อโรค
Class Basidiomycetes เป็นราที่มีวิวัฒนาการสูงสุด ได้แก่ ราสาเหตุโรคสนิมเหล็ก และโรคเหี่ยวดำของธัญพืช รวมทั้งพวกเห็ดต่างๆ vegetative structure ของราพวกนี้ ส่วนใหญ่จะเป็น dikaryotic mycelium การขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศเกิดโดยสร้าง conidium ตัวอย่างเช่นในเห็ดบางชนิด หรือโดยการสร้าง sclerotium และอื่นๆ ส่วนการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ จะเกิดโดยการสร้าง basidiospores จำนวน 4 อัน บน basidium อาจจะมีหรือไม่มี fruiting body หุ้มห่อ เช่นในราสนิมเหล็กและราเหี่ยวดำจะไม่สร้าง basidiocarp	<i>Ustilago scitaminea</i> <i>Ustilago maydis</i> <i>Puccinia graminis tritici</i> <i>Phragmidium mucronatum</i> <i>Phakopsora sojae</i>	โรคเหี่ยวดำของอ้อย โรคเหี่ยวดำของข้าวโพด โรคสนิมเหล็กของข้าวสาลี โรคสนิมเหล็กของกุหลาบ โรคสนิมเหล็กของถั่ว
Class Deuteromycetes (fungi imperfecti) ได้แก่ราชั้นสูงที่พบเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศแต่เพียงอย่างเดียว โดยจะสร้าง spore เรียก conidium ซึ่งอาจเกิดโดยตรงบน conidiophore หรือเกิดบนหรือใน fruiting body แบบต่างๆ ซึ่งได้แก่ pycnidium acervulus, sporodochium และ synnemata เป็นราที่มีจำนวนมากที่สุด และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคพืชมากที่สุด	<i>Alternaria brassicae</i> <i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Bipolaris maydis</i> <i>Macrophomina phaseolina</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	โรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำ โรคแอนแทรคโนสในถั่วเหลือง โรคที่เกิดกับเมล็ดธัญพืช โรคยอดฝักดาบข้าว โรคเหี่ยวในพืชล้มลุก โรคใบไหม้ในข้าวโพด โรคเหี่ยวดำของถั่ว โรคเน่าของพืชล้มลุก

2.2.2 การป้องกันและกำจัดโรคพืชในปัจจุบัน

การป้องกันและกำจัดโรคพืชในปัจจุบันมีอยู่หลายวิธี เช่น ปลุกพืชในพื้นที่ที่ไม่เคยมีการระบาดของโรคมามาก่อน การกีดกันหรือขจัดทำลายต้นตอที่มาของโรค การกำจัดทำลายโรคให้หมดไปจากแหล่งปลุกพืช การป้องกันไม่ให้พืชเกิดโรค การใช้พันธุ์พืชที่มีความต้านทาน หากกระทำวิธีการดังกล่าวแล้วยังไม่สามารถกำจัดโรคพืชให้หมดไปได้ จะต้องทำการรักษาโรคพืชหรือลดอาการของโรคลงไม่ให้ระบาดไปยังต้นอื่น

การรักษาโรคพืชมียุ่หลายวิธี

1) การใช้สารเคมี

สารเคมีที่นำมาใช้กับพืชแล้วสามารถป้องกันโรคได้นั้น กล่าวได้ว่าเป็นไปใน 3 ลักษณะคือ 1) ไปฆ่าทำลายเชื้อโรคโดยตรง 2) ช่วยทำให้พืชจากสาร (toxic substance) ที่เชื้อสร้างขึ้นแล้วปล่อยออกมาขณะที่เจริญเติบโตอยู่ในพืชอ่อนแอลงจนไม่สามารถก่อให้เกิดอาการผิดปกติขึ้นได้ และ 3) สารเคมีอาจไปก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในพืชจากเดิมที่มีลักษณะอ่อนแอให้กลับเป็นคงทนหรือต้านทานต่อโรคได้ดีขึ้น

การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชเป็นวิธีที่แพร่หลายมากที่สุดแต่ไม่ได้เป็นวิธีที่ดีที่สุด เพราะการป้องกันกำจัดด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ผู้ใช้จะต้องมีความรู้เกี่ยวกับยาพอสมควร ต้องทราบเกี่ยวกับวิธีการใช้อย่างละเอียด รวมทั้งต้องรู้จักวิธีป้องกันแก้ไขเมื่อได้รับพิษจากสารเคมี เนื่องจากเป็นกลุ่มของสารที่มีอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และสภาพแวดล้อม ในปัจจุบันมีสารเคมีมีอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชได้ โดยอยู่ในรูปแบบต่างๆ กัน เช่น ใช้ในแบบพ่นเป็นละอองน้ำ พ่นเป็นผง (dust) ใช้ในลักษณะเหลวคล้ายแป้งเปียก (paste) ใช้วิธีหว่านขานชนิดเม็ด (granule) และขานชนิดดูดซึม (systemic)

ตัวอย่างสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีการแนะนำให้ใช้ในปัจจุบันแสดงดัง

ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช (4)

ชื่อสามัญของสารเคมีป้องกัน กำจัดเชื้อรา	เชื้อราสาเหตุโรคพืช
benomyl	<i>Botryodiplodia theobromae</i> , <i>Cercospora canescens</i> , <i>Colletotrichum musae</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>Fusarium</i> sp. <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Nigrospora</i> sp., <i>Oidium</i> sp., <i>Phyllactinia corylea</i>
captan	<i>Bipolaris</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., <i>Cercospora nicotianae</i> , <i>Curvularia</i> <i>lunata</i> , <i>Colletotrichum dematium</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pythium</i> sp., <i>Ustilago maydis</i>
carbendazim	<i>Acrocyldrium oryzae</i> , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Cercospora</i> <i>oryzae</i>
carboxin	<i>Sclerotium</i> sp., <i>Ustilago maydis</i>
copper oxychloride	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp. , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Macrophomina</i> sp. , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotium</i> sp.
maneb	<i>Bipolaris</i> sp., <i>Cercospora arachidicola</i> , <i>Cercospora</i> <i>nicotianae</i> , <i>Cercospora capsici</i> , <i>Phytophthora capsici</i>
mancozeb	<i>Albugo ipomoeae-aquaticae</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp., <i>Curvularia lunata</i> , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Cercospora nicotianae</i> , <i>Peronospora parasitica</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Plasmopara</i> <i>viticola</i> , <i>Puccinia porri</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Uromyces</i> <i>phaseoli</i>

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช (ต่อ)

ชื่อสามัญของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา	เชื้อราสาเหตุโรคพืช
metalaxyl	<i>Phytophthora nicotianae</i> , <i>P. palmivora</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i>
PCNB	<i>Phytophthora palmivora</i> , <i>P. infestan</i> , <i>P. parasitica</i> <i>Pythium debaryanum</i> , <i>P. ultimum</i>
phosetyl Al	<i>Phytophthora</i> sp., <i>Pythium</i> sp.
sulfur	<i>Alternaria</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
thiram	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Cercospora capsici</i> , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fulvia fulva</i> , <i>Bipolaris</i> sp. , <i>Pseudocercospora fuligina</i> , <i>Septoria lycopersici</i> ,
thiophanate-methyl	<i>Alternaria</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp. <i>Cercospora canescense</i> , <i>Colletotrichum</i> sp.,
triadimefon	<i>Ustilago scitaminea</i> , <i>Puccinia recondita</i>
tridemorp	<i>Oidium</i> sp.
zineb	<i>Alternaria</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp., <i>Cercospora nicotianae</i> , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Curvularia lunata</i> , <i>Peronospora destructor</i> , <i>Phytophthora infestan</i> , <i>Puccinia porri</i>

2) โดยใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotic)

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ สามารถที่จะยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์อื่นๆได้ โดยใช้ในปริมาณที่ต่ำมาก และไม่รวมถึงสารสกัดจากพืชหรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะการใช้สารเหล่านั้นในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูง ประโยชน์ของยาปฏิชีวนะมีมาก ใช้ในการรักษาโรคของมนุษย์ ใช้ในทางการเกษตร เช่น การใช้ในการรักษาโรคพืช โดยยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้รักษาโรคพืชในระยะแรกนั้น มี streptomycin, tetracyclin, cycloheximide, griseofulvin เป็นต้น การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราจะใช้ cycloheximide และ griseofulvin ต่อมาก็มียาปฏิชีวนะใหม่ๆ ตามมา เช่น kasugamycin, blasticidin, polyoxins และ validamycin โดยนำมาใช้แทนวัตถุมีพิษ เช่น arsenic fungicide และ mercuric fungicide ซึ่งมีพิษตกค้างสูง ประโยชน์ของการใช้ยาปฏิชีวนะในการเกษตรแทนวัตถุมีพิษก็คือ ปริมาณของยาที่ใช้ต่ำมาก ประมาณ 10-50 ppm และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารที่ฉีดพ่นไปหนึ่งหน่วยพื้นที่นั้น ก็จะน้อยกว่าการใช้วัตถุมีพิษมาก ที่สำคัญ คือ ไม่เป็นพิษกับพืช หรือถ้าเป็นก็น้อยมาก และยาปฏิชีวนะจะถูกย่อยสลายรวดเร็วโดยจุลินทรีย์ดิน จึงไม่มีปัญหาเรื่องมลพิษ นอกจากจะใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคพืชแล้ว การใช้ในปริมาณที่ต่ำมากๆ จะช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชด้วย (8)

ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในทางการเกษตร แสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช (18)

สารปฏิชีวนะ	แหล่งที่มาและการใช้ประโยชน์
aureofungin	เป็นสารปฏิชีวนะพวก heptaene ซึ่งสกัดจาก <i>Streptomyces cinamomeus</i> var. <i>terricola</i> ซึ่งออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราหลายชนิด เช่น เชื้อ <i>Phytophthora citrophthora</i> ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค citrus gummosis โดยผสมสารฉีดพ่นในอัตรา 20 มก/มล - ใช้ในการควบคุมเชื้อรา <i>Diplodia</i> sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าของมะม่วง โดยการจุ่มผลมะม่วงในสารปฏิชีวนะ aureofungin ความเข้มข้น 100-500 ppm. ซึ่งจะช่วยป้องกันผลเน่าได้ 11-20 วัน - ใช้ควบคุมโรคผลเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา <i>Alternaria</i> sp. - ใช้ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pyricularia oryzae</i> โดยใช้พ่นในอัตรา 7.5 กรัม/เฮกตาร์ 3 วันต่อครั้ง - ใช้ควบคุมโรคตราแข่งขาวของแอปเปิ้ล ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Podosphaera leuotricha</i> - ใช้ควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดข้าว ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Bipolaris oryzae</i> โดยก่อนหว่านข้าวให้นำเมล็ดข้าวไปแช่ในสารละลาย aureofungin ที่งัวข้ามคืน แล้วจึงนำมาหว่าน
antimycin A	สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อรา <i>Alternaria solani</i>
bacillomycin	ยับยั้งเชื้อรา <i>Bipolaris turcicum</i> สาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าวโพด



ตารางที่ ๕ สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดเชื้อราโรคพืช (ต่อ)

สารปฏิชีวนะ	แหล่งที่มาและการใช้ประโยชน์
blastidicin s	เป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก <i>Streptomyces griseochromogens</i> ซึ่งสามารถยับยั้งทั้งเชื้อราและแบคทีเรียได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น โรคไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> โดยพบว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้
cycloheximide	เป็นผลพลอยได้จากการผลิต streptomycin มีชื่อทางเคมีคือ 3-[2-(3,5-dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxy-ethyl]glutarimide ลักษณะเป็นผลึก มีจุดหลอมเหลว 115.5-117 องศาเซลเซียส ละลายได้เล็กน้อยใน อะซิโตน แอลกอฮอล์ ใช้เป็นสารป้องกันเชื้อราในไม้ดอก รวมถึงเชื้อราในดิน
gliotoxin	แยกได้จาก <i>Gliocladium fimbriatum</i> โดยพบว่า สาร gliotoxin สามารถยับยั้งเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าของมันฝรั่งและมะเขือเทศ
griseofulvin	ในประเทศญี่ปุ่น มีการนำมาใช้ยับยั้งโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงที่เกิดจากเชื้อ <i>Fusarium</i> sp.
kasugamycin	เป็นสารที่มีคุณสมบัติรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อรา สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว (<i>Pyricularia oryzae</i>) และแบคทีเรียบางชนิด
nikkomycin	สามารถยับยั้งการสร้างไคตินและยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Ceratocystis ulmi</i>

ตารางที่ 6 การใช้สารปฏิชีวนะกับการเกษตรในประเทศไทยปี (8)

ปีที่ขึ้นทะเบียน	สารปฏิชีวนะและรูปแบบการใช้	รายชื่อโรคพืช	ปริมาณที่ใช้ในปี ค.ศ.1974	
			ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (พันเยน)
1959	cycloheximide - wettable powder	โรคราน้ำค้างในหัวหอม โรคกล้าต้นไหม้ ใน Japanese larch	17	35,020
1959	griseofulvin - paste	โรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตง	2	4,700
1961	blasticidin S - dust - w.p. - solution	โรคไหม้ในข้าว	1,250 3 152	75,000 2,547 102,426
1965	kasukamycin - dust - w.p. - solution	โรคไหม้ในข้าว	7,930 265 10	507,762 221,805 8,820
1967	polyoxins - dust - w.p. - solution	โรคกาบใบแห้งในข้าว โรคของผักและผลไม้ที่เกิดจากเชื้อรา	387 418 34	32,121 960,982 38,216
1970	ezomycin - w.p.	โรคกล้าต้นเน่าในถั่วแดง	0	0
1972	validamycin - dust - w.p.	โรคกาบใบแห้งในข้าว	3,893 94	513,876 143,256

2.8 โรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง

โรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง แพร่ระบาดในสภาพอากาศอบอุ่นและเขตร้อนชื้น มีรายงานความเสียหายครั้งแรกที่ประเทศเกาหลี ในปี ค.ศ. 1917 และพบระบาดทั่วไปในพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองทั่วโลก เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการระบาดตั้งแต่ทางภาคตะวันออกเฉียงใต้จนถึงภาคตะวันตก โดยทำให้จำนวนต้นสมบูรณ์ลดลง ลดคุณภาพเมล็ด และลดปริมาณผลผลิตไปร้อยละ 20 หรือมากกว่านี้ และได้มีรายงานความสูญเสียร้อยละ 30-50 ในประเทศไทย และสูญเสียถึงร้อยละ 100 ในประเทศอินเดีย (63) โรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองมีรายงานการพบในประเทศไทยครั้งแรกโดย ประเทือง สง่างศ์ ในปี 2515 (10)

2.3.1 เชื้อราสาเหตุของโรค

โรคแอนแทรคโนสเกิดจากเชื้อราสาเหตุ 2 ชนิด ซึ่งก่อให้เกิดอาการคล้ายกัน คือ

1) *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fr.) Grove var. *truncatum* (Schw.) Arx.

มี synonym คือ *C. dematium* (Pers. ex Fr.) Grove var. *truncata* (Schw.) Arx.

C. truncatum (Schw.) Andrus & W. D. Moore

C. glycines Hori

C. caulivorum Heald and Wolf

C. viciae Dearn and Overh.

Vermicularia truncata (Schw.)

V. polytricha Cke.

2) *Glomerella glycines* (Hori) Lehman & Wolf.

แต่เชื้อ *C. dematium* var. *truncatum* นั้นพบแพร่หลายมากกว่า *G. glycines* (63)

เชื้อรา *C. truncatum* จำแนกได้โดยดูจากการสร้าง *acervuli* สีดำ บน *stromata* ที่เจริญแล้วโดย *acervuli* จะมีรูปเกือบกลม รูปวงรี หรืออาจเป็นรูปกรวยตัด มี *setae* ที่มีลักษณะคล้ายเข็ม มีทั้งสั้นและยาว ขนาด 3-8 x 60-300 ไมครอน *conidia* จะเกิดขึ้นเดี่ยวเป็นเชลล์ใส บน *conidiophore* มีรูปร่างโค้ง ปลายเรียว มีขนาด 3-4.5 x 17-31 ไมครอน (63) แต่มีขนาดแตกต่างกับที่ศึกษาพบในประเทศไทย โดย ชูติมันต์ (7) ได้รายงานว่า จากการเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรคโนส จากแหล่งปลูกถั่วเหลืองในท้องที่ต่างๆของประเทศไทย พบว่า *setae* ของ เชื้อรา

C. truncatum ที่พบมีขนาด 2-3 x 262-525 ไมครอน และ conidia ที่พบ มีขนาด 2.5-3.75 x 20-25 ไมครอน

การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อนี้พบว่า เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้อย่างรวดเร็วดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ ที่อุณหภูมิ 28-34 องศาเซลเซียส เริ่มแรกโคโลนีมีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ (63) เส้นใยมีการแผ่กระจายตัวดี สร้าง acervulus กลม ดำบน concentric ring โดยพบมากบนส่วนของเส้นใยที่แก่ ต่อมาจะสร้าง conidial mass คลุม มี setae สีน้ำตาลเข้ม ขาวแหลม (68) หุตินันต์ (7) ได้ศึกษาการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อนี้บนเมล็ดพืช พบว่า เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้ดีบนเมล็ดข้าวโพด เมื่ออายุได้ 30 วัน และอุณหภูมิช่วงที่เชื้อราเจริญได้ดีที่สุดอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส และยังศึกษาพบว่าเมื่อนำเมล็ดถั่วเหลืองมาแช่ในสปอร์ของเชื้อรา *C. truncatum* นานเกิน 15 นาที เมล็ดจะเน่าตายหมด และต้นกล้าถั่วเหลืองจะเกิดโรค

2.3.2 การเข้าทำลายพืช

conidia จะสร้าง germ tube และเจริญเป็น appressoria เมื่อแทงทะลุพืช โดยจะเข้าทำลายได้ดีเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะเมื่อผิวพืชเปียกชื้น หรือที่ความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่าร้อยละ 70 โดยการแทงทะลุพืชจะแทงผ่าน cuticle และผนังเซลล์ จากนั้นเส้นใยจะแผ่ไปทั่ว ในพืชอายุน้อยที่ยังแข็งแรง อัตราการลุกลามของเส้นใยจะช้า และเชื้อจะยังคงอยู่ที่จุดที่เชื้อราเข้าทำลาย แต่หากเป็นต้นถั่วเหลืองที่อยู่ในระยะออกดอกแล้ว เชื้อราจะเจริญอย่างรวดเร็ว รุนแรง และแพร่ไปยังลำต้น ก้านใบ ใบ และเข้าสู่ฝักทำลายเมล็ดที่กำลังเจริญ (63)

2.3.3 อาการของโรค

ถั่วเหลืองจะอ่อนแอต่อโรคแอนแทรคโนสในทุกระยะการเจริญ (45) โดยจะพบอาการทั่วไปทั้งบริเวณลำต้น ฝัก ใบ ก้านใบ ซึ่งจะปรากฏรูปร่างผิดปกติและกลายเป็นสีน้ำตาล หรือบริเวณต่างๆ ที่ติดเชื้อมันอาจยังไม่ปรากฏอาการ แต่จะปรากฏอาการเมื่อมีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ในขั้นที่ติดเชื้อรุนแรงนั้น เนื้อเยื่อส่วนที่ติดเชื้อ จะถูกปกคลุมด้วย fruiting body สีดำ (acervuli) ซึ่งมีลักษณะคล้ายที่ปักเข็มหมุดขนาดเล็กๆ ปกคลุมด้วยขนานหรือที่เรียกว่า setae ซึ่งสามารถมองเห็นได้โดยใช้แว่นขยาย

อาการที่เมล็ด มีอาการลีบ ย่น สีน้ำตาลหรือดำ ถ้าเป็นมาก อาจฝ่อ หรือไม่ติดฝักเลย การที่เชื้อราสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในเมล็ดถั่วเหลืองได้นั้น เนื่องจากเปลือกหุ้มเมล็ดถั่ว

เปลือกที่สมบูรณ์จะประกอบด้วย cuticle และเซลล์เนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ palisade (exodermis) hourglass (hypodermis) และ parenchyma (72) Schneider (61) พบว่าในชั้น hourglass นั้นประกอบด้วย amorphous (starch-rich matrix) ซึ่งจะให้ธาตุอาหารแก่จุลินทรีย์ การทำลายเปลือกหุ้มเมล็ด จะเป็นการเปิดช่องทางให้เชื้อราเข้าทำลายง่ายขึ้น เมล็ดที่เชื้อติดมาอาจไม่แสดงอาการของโรค แต่เมื่อนำเมล็ดที่ติดเชื้อไปปลูกจะปรากฏอาการกล้าเน่าล้ม โดยจะเริ่มปรากฏแผลสีน้ำตาลลิบบน cotyledon ของเมล็ดที่งอก โดยแผลนี้จะลามสู่ ทั้ง epicotyl และลุกลามไปยังราก หากสภาพอากาศชื้นก็จะพบว่า cotyledon หนึ่งข้างหรือทั้งสองข้างจะมีอาการช้ำน้ำ เหี่ยวอย่างรวดเร็ว และหลุดร่วงไปในที่สุด

อาการบนใบนั้นอาการจะแตกต่างกับโรคอื่นทั่วไปคือ แทนที่จะเกิดอาการแผลที่ส่วนของเนื้อใบ (leaf blade) แต่แอนแทรกโนสของถั่วเหลืองจะเกิดอาการขึ้นที่เส้นใบ (vein) โดยเส้นใบจะถูกทำลายเป็นแผลสีน้ำตาลเข้ม หรือดำ หรือเรียกว่าอาการ vein necrosis เส้นใบแห้งหรือใบม้วนงอ ก้านใบเป็นแผล ใบร่วงเร็วกว่าปกติ อาการมักเริ่มจากปลายหรือขอบใบเข้ามา อาจทำให้ใบฉีกขาด (6) อาการบนใบสามารถลุกลามได้หลังจากได้รับความชื้นสูงเป็นเวลานาน

อาการที่กิ่ง ก้าน ลำต้น จะพบแผลสีน้ำตาลเข้ม เนื้อเยื่อยุบตัวลงเล็กน้อย บนเนื้อเยื่อพืชส่วนที่ถูกโรคเข้าทำลายที่แห้งตายสนิทจะพบ acervulus เกิดขึ้นเป็นสีดำกลมเล็ก เชื้อราเริ่มเข้าทำลายเนื้อเยื่อรอยต่อระหว่างก้านกับใบ ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นไหม้แห้งตายและใบร่วงโกร๋น

อาการที่ฝัก เริ่มแรกจะพบจุดน้ำ ขนาด 1-2 มิลลิเมตร แล้วจะขยายลุกลามออกเป็นสีน้ำตาลอ่อน เนื้อเยื่อที่ถูกทำลายแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเข้ม การขยายของแผลจะเห็นเป็นชั้นๆ (zonate) ชัดเจน สามารถตรวจพบ acervulus เป็นจุดดำกลมเล็กๆทั่วไป

2.3.4 วงจรของโรคและการแพร่ระบาด

เชื้อราจะอยู่ข้ามฤดูโดยเส้นใยจะติดอยู่กับเศษซากพืช หรือติดไปกับเมล็ด (seed-borne) เมล็ดที่ติดเชื้อ เมื่อนำปลูกจะทำให้เกิดอาการกล้าเน่า หรือเส้นใยนั้นอาจจะอยู่ที่ต้นกล้าโดยที่ต้นกล้าไม่แสดงอาการ จนกระทั่งต้นโตเต็มที่จึงแสดงอาการก็ได้ การระบาดระหว่างฤดูปลูกหรือระหว่างแปลงอาจเกิดได้โดยคนงาน เสื้อผ้า เครื่องนุ่งห่ม เครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ ในการกลั่นกรอง โดยเฉพาะระหว่างที่พืชเปียกน้ำจะทำให้การติดเชื้อเป็นไปได้ง่ายและเร็วขึ้น รวมถึงแมลงต่างๆ ลม และการสาดกระเซ็นของน้ำ ก็เป็นตัวการระบาดที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง

2.3.5 การป้องกันกำจัด

- 1) ปลุกพืชหมุนเวียน
- 2) ใช้เมล็ดพันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรคและมีความงอกสูง
- 3) ทำความสะอาดแปลงปลูกโดยเก็บเศษซากต้นถั่วเหลืองเผาไฟ
- 4) การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา

4.1) การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา

การใช้สารกำจัดเชื้อราสามารถลดปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดได้ รวมทั้งช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกให้กับเมล็ดที่มีคุณภาพต่ำ Kirkpatrick และ Sinclair (50) พบว่า thiophanate-methyl, BD-18645 และ methyl 2-benzimidazole carbamate สามารถดูดซึมผ่านเมล็ดถั่วเหลืองที่กำลังจะงอกภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง Ellis (39) พบว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อรา captan และ thiram เมื่อนำมาใช้เป็น seed-treatment จะสามารถเคลื่อนสู่ภายในเปลือกหุ้มเมล็ด แต่ไม่สามารถผ่านสู่เนื้อเยื่อของ embryo ในขณะที่ benomyl ซึ่งเป็นสารกำจัดราชนิดดูดซึมสามารถเคลื่อนผ่านเข้าไปใน seed coat และเนื้อเยื่อของ embryo ได้ รวมถึงมีการใช้สาร mancozeb ในการคลุกเมล็ดด้วย (13) แต่สาร mancozeb นั้น มีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่น โดยทำให้ระคายเคืองผิวหนัง โพรงจมูกและลำคอ และมีรายงานว่าถ้าใช้ในปริมาณมากๆ จะเป็นพิษต่อต้นกล้ายาสูบ แอปเปิ้ล พืชตระกูลแตง กะหล่ำ พริก มะเขือเทศ อาจทำให้เมล็ดที่คลุกสารนี้มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง

4.2) การฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา

จากรายงานการวิจัยของภัทราและคณะ(11) ถึงการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง พบว่า แปลงทดลองที่ฉีดพ่นด้วยสารกำจัดโรคพืช myclobutanil+mancozeb อัตรา 30 และ 60 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จะให้ผลผลิตดีที่สุด รองลงมาคือ carbendazim propiconazole และ mancozeb

benomyl สามารถดูดซึมเข้าสู่เมล็ดถั่วเหลืองในช่วงที่กำลังงอกและดูดซึมเข้าสู่ต้นกล้า benomyl สามารถละลายในน้ำ ให้ methyl benzimidazole-2-yl carbamate (MBC) ในสารละลายและในพืชอย่างรวดเร็ว Ellis และ Sinclair (41) พบว่า MBC จะซึมผ่านผนังฝักของถั่วเหลืองที่กำลังพัฒนา และเข้าสู่เมล็ดภายใน 23 ชั่วโมง หลังจากฉีดพ่นสาร benomyl แต่ก็มีรายงานว่า สารเหล่านี้สามารถทำให้การแบ่งเซลล์พืชผิดปกติ เพราะจะไปรบกวนการสร้างสปินเดิล ไฟเบอร์ (spindle fiber) และก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อราด้วย (9)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. สารเคมีสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็น laboratory grade ของ Fluka, Sigma และ Merck
2. สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น น้ำยาแอนโทรน น้ำยาโมลิสซ์ น้ำยานินไฮดริน น้ำยาไบยูเรต เอนไซม์โปรตีเอส เอนไซม์อไมเลส และเอนไซม์ไลเปส เป็น laboratory grade ของ Merck และ Sigma
3. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ของบริษัท Thai industrial gas (TIG)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar (PDA) ของ Difco
5. ผงแป้ง (talc powder) ขนาด 325 mesh ของ White Swan Brand “KS grade”
6. สารลดแรงตึงผิว (tween 20)
7. งานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ของ Bibby Sterilin LTD. U.K.
8. แผ่นทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (BBL blank paper discs ของ Becton Dickinson)
9. ผ้ากรองไนลอน ขนาดช่อง 108 ไมครอน
10. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman filter paper No.1)
11. TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ ของ Merck
12. TLC plates silica gel 60 F₂₅₄ แบบ preparative ขนาดกว้าง ยาว 20x20 เซนติเมตร ความหนา 2 มิลลิเมตร ของ Merck
13. เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ปีกเกอร์ กรวยกรอง ขวดเตรียมอาหาร แท่งแก้วคน ฯลฯ
14. เข็มฉีดยา
15. ถังคาร์บอย (Nalgene) ขนาดความจุ 12 ลิตร
16. เครื่องเขย่า (shaker)

17. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ Sorvall รุ่น SS-3
18. เครื่องทำให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer) ของ Polytron PT 205
19. เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator) ของ Buchi
20. เครื่องทำแห้งในสภาพแข็ง (freeze-dried) ของ Edwards super modulyo pirani 501
21. เครื่องบดนม
22. ตู้อบเครื่องแก้ว (oven) ของ Memmert model 600
23. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ของ Tomy SS-245
24. กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น CH 30
25. ดินสิดา
26. เชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 161 สายพันธุ์ ได้รับจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
27. ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อ. คาคิล จ. นครสวรรค์
28. เชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญทางเศรษฐกิจโดยได้รับความเอื้อเฟื้อจากกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีรายชื่อดังนี้

<i>Colletotrichum truncatum</i>	สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง ใบไหม้ในถั่วเขียว
<i>Curvularia lunata</i>	สาเหตุโรคในเมล็ดธัญพืช
<i>Fusarium oxysporum</i>	สาเหตุโรคเหี่ยวของยาสูบ
<i>Fusarium moniliforme</i>	สาเหตุโรคถอดฝักดาบในข้าว
<i>Macrophomina phaseolina</i>	สาเหตุโรคน้ำดำในถั่วเขียว ถั่วเหลือง งา ทานตะวัน และละหุ่ง

วิธีการวิจัย

3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช

3.1.1 การคัดเลือกสาหร่ายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการทดสอบกับเชื้อรา

3.1.1.1 การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

นำสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA (ภาคผนวก ก. ข้อ 1) ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีอัตราการปลูกกล้าเชื้อสาหร่ายประมาณ 0.02% (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร) ตั้งบนเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็ว 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 1)

เก็บเกี่ยวสาหร่ายโดยการกรองสาหร่ายที่เลี้ยงได้ด้วยการใช้ ผ้ากรองไนลอนที่มีขนาดช่อง 108 ไมครอน แต่ถ้าหากเป็นสาหร่ายที่มีขนาดเล็ก ให้นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลล์สาหร่ายออกจากอาหารเลี้ยง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง ก่อนนำไปสกัด

สกัดสาหร่ายโดยนำเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงได้มาทำให้เซลล์แตก ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วนปริมาตร 1:1 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลาย (thaw) โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง homogenizer เมื่อเซลล์สาหร่ายแตกรวมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วนปริมาตร คลอโรฟอร์ม : เมทานอล เท่ากับ 1:2 ซึ่งอัตราส่วนโดยรวมระหว่าง คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ จะเท่ากับ 1:2:1 กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองหมายเลข 1 นำส่วนที่ได้จากการกรอง (filtrate) มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสาร (rotary evaporator) ภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยหมด นำสารสกัดที่ได้มาละลายในส่วนผสมของตัวทำละลายเดิม ให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะใช้ทดสอบต่อไป



ภาพที่ 1 การเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า
ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่
 $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

3.1.1.2 การเตรียมเชื้อราสำหรับทดสอบ

เลี้ยงเชื้อราโดยนำเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละสายพันธุ์จากหลอดอาหารเอียงมาเลี้ยงให้เจริญบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเชื้อราเจริญเกือบเต็มจานโดยระยะเวลานั้นจะขึ้นอยู่กับเชื้อราแต่ละชนิดว่ามีการเจริญเติบโตเร็วหรือช้าเพียงใด จากนั้นนำคอร์กบอร์เรอร์ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดเส้นใยบริเวณรอบๆโคโลนีซึ่งเป็นส่วนที่เพิ่งจะเจริญ นำมาปลูกบนกึ่งกลางของอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตรเช่นกัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเชื้อราเจริญเต็มจาน

นำเชื้อราที่เลี้ยงได้มาเตรียมเชื้อราแขวนลอยด้วยการนำน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วเทลงบนโคโลนีของเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อที่ได้ ขูดส่วนที่เป็นเชื้อราทั้งหมดโดยไม่ให้เศษวันติดมาด้วย นำเชื้อราแขวนลอยที่ได้มาตรวจนับด้วย haemocytometer จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หรือ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามแต่ลักษณะของเชื้อรา

3.1.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี paper disc plate method (34)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จานละ 15 มิลลิลิตร รองอาหารแข็ง นำสำลีพันปลายไม้ที่นิ่งมาเชื้อแล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยของเชื้อราที่ได้จากข้อ 3.1.2.2 นำมาถู (swab) ไปมาบนผิวหน้าของอาหาร PDA โดยถูเป็น 3 ระบายจนทั่วทั้งพื้นผิว ทั้งไว้จนแห้ง

นำสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบ ตัวอย่างละ 2 แผ่น ทั้งไว้จนแห้ง ส่วนชุดควบคุมทำโดยใช้ตัวทำละลาย หยดบนแผ่นทดสอบ 2 แผ่นเช่นกัน

นำแผ่นทดสอบ มาวางลงบนผิวหน้าของอาหาร PDA ที่ปลูกเชื้อแล้ว โดยวางในแนวตรงกันข้ามแบบทแยงมุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยวัดขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (inhibition zone) โดยวัดผ่านเส้นผ่านศูนย์กลางของเปเปอร์ดิสด้วย คัดเลือกสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา

สาเหตุโรคพืช รวมทั้งคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่สารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์นั้น สามารถยับยั้งได้ดีด้วย เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

3.1.2 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือก

3.1.2.1 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเจริญของสาหร่าย

นำสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร BGA 100 มิลลิลิตร โดยปลูกกล้าเชื้อสาหร่ายในอัตรา 0.02 % (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร) จำนวนทั้งหมด 21 ขวด ตั้งบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ เก็บเกี่ยวสาหร่ายทุกวันในเวลาเดียวกัน เป็นเวลา 20 วัน นำสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้มากรองด้วยผ้ากรองไนลอนที่มีขนาด 108 ไมครอน ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง นำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปทำให้แห้งในสภาพแข็ง เมื่อเซลล์แห้งแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักเซลล์ที่ได้ จัดบันทึกไว้ทุกวัน จนครบ

3.1.2.2 การศึกษาช่วงเวลาที่มีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำเซลล์สาหร่ายแห้งที่ได้จากข้อ 3.1.2.1 มาสกัดตามวิธีเดิม นำสารสกัดที่ได้มาละลายในตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ปิเปิดลงบนแผ่นทดสอบ ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ทั้งไว้จนแห้ง ทดสอบกับเชื้อราสายพันธุ์ซึ่งได้จากการคัดเลือกในข้อ 1 ด้วยวิธี paper disc plate method โดยนำจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA ซึ่งแข็งแล้วมาปลูกเชื้อราโดยใช้สำลีจุ่มสปอร์แขวนลอยของเชื้อราป้ายไปมาโดยดูเป็น 3 ระบายจนทั่ว วางแผ่นเปเปอร์ดิสทั้งสองลงบนผิวหน้าอาหารในแนวตรงกันข้ามแบบทแยงมุม ในจานเลี้ยงเชื้อเดียวกัน และปิเปิด cycloheximide มาตรฐาน (standard cycloheximide) ที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นทดสอบ 2 แผ่น และนำไปวางบนผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อเดิมในแนวทแยงมุมอีกแนวหนึ่ง ซึ่งแต่ละจานเลี้ยงเชื้อจะวางเปเปอร์ดิสได้ 4 แผ่น บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ จากนั้นวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยนำค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากการใช้ cycloheximide มาตรฐานเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรไปเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของ

บริเวณยับยั้งที่เกิดจาก cycloheximide มาตรฐานเข้มข้นเดียวกันในกราฟมาตรฐานของ cycloheximide (ภาคผนวก ค.)

นำค่าที่ได้จากข้อ 3.1.2.1 และ 3.1.2.2 มาเขียนกราฟเพื่อหาช่วงเวลาที่มีการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือก

3.1.3 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3.1.3.1 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารสูตรต่างๆดังนี้ Allen's, BGA, BGA+N และ BG-11 (ภาคผนวก ก ข้อ 1-4) โดยปลูกเชื้อสาหร่ายในอัตรา 0.02% (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร) ลงในอาหารสูตรต่างๆปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ตั้งบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 14 วัน เก็บเกี่ยวสาหร่ายตามวิธีเดิม ซึ่งน้ำหนักของเซลล์ที่ได้จากอาหารแต่ละสูตร จดบันทึกไว้ จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายที่ได้มาสกัดโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และทดสอบหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้เทียบกับ cycloheximide นำข้อมูลของน้ำหนักเซลล์และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการใช้อาหารเลี้ยงแต่ละสูตรมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาสูตรอาหารที่ดีที่สุด

3.1.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายที่คัดเลือก

เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสูตรที่ศึกษาได้จากข้อ 3.1.3.1 และให้มีการเติมโซเดียมไนเตรดซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร โดยให้มีปริมาณกล้ำเชื้อสาหร่าย สภาพการเลี้ยง วิธีการตรวจวัดการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3.1 เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของโซเดียมไนเตรดเพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

3.1.3.3 การศึกษาความเข้มข้นของไคโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายที่คัดเลือก

เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสูตรที่ศึกษาได้จากข้อ 3.1.3.1 เดิมโซเดียมไนเตรด ความเข้มข้นเดียวกันกับที่ได้จากข้อ 3.1.3.2 และให้มีการเติมไคโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.0 0.3 0.6 0.9 1.2 1.5 1.8 และ 2.1 กรัมต่อลิตร โดยให้มีปริมาณกล้าเชื้อสาหร่าย สภาพการเลี้ยง วิธีการตรวจวัดการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3.1 เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของไคโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

3.1.3.4 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายที่คัดเลือก

เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสูตรที่ศึกษาได้จากข้อ 3.1.3.1 เดิมโซเดียมไนเตรด และไคโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเดียวกันกับที่ศึกษาได้จากข้อ 3.1.3.2 และ 3.1.3.3 ตามลำดับ และให้มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0 0.03 0.05 0.07 0.09 0.11 0.13 และ 0.15 กรัมต่อลิตร โดยให้มีปริมาณกล้าเชื้อสาหร่าย สภาพการเลี้ยง วิธีการตรวจวัดการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3.1 เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของโซเดียมคลอไรด์เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

3.1.3.5 การศึกษาสภาพความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายที่คัดเลือก

เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสูตรที่ศึกษาได้จากข้อ 3.1.3.1 เดิมโซเดียมไนเตรด ไคโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นเดียวกันกับที่ศึกษาได้จากข้อ 3.1.3.2 3.1.3.3 และ 3.1.3.4 ตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 และ 10.0 โดยให้มีปริมาณกล้าเชื้อสาหร่าย สภาพการเลี้ยง วิธีการตรวจวัดการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกันกับข้อ 3.1.3.1 เลือกค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.1.4 การขยายการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ที่คัดเลือกในถังคาร์บอนขนาด 12 ลิตร

นำสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาเลี้ยงในถังคาร์บอนขนาด 12 ลิตร ที่บรรจุอาหาร BGA ดัดแปลงที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1.3 ปริมาตร 10 ลิตร โดยศึกษาควบคุมไปกับสูตรอาหาร BGA โดยปลูกกล้าเชื้อสาหร่ายในอัตรา 0.02% (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร) ฟัน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ อัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (ภาพที่ 2) เก็บเกี่ยวสาหร่าย ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เวลาเดียวกันทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน นำสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้มากรองด้วย ผ้ากรองในลอนขนาด 108 ไมครอน ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ 2-3 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไป ทำให้แห้งในสภาพแห้ง เมื่อเซลล์แห้งแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักเซลล์ที่ได้ จดบันทึกไว้ทุกวัน นำมา เขียนกราฟหาช่วงเวลาของการเจริญ

ส่วนการตรวจวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทำได้โดยนำเซลล์สาหร่ายแห้งที่ได้ มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลเพียงอย่างเดียว นำสารสกัด ที่ได้มาละลายด้วยเมทานอลให้ ได้ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น นำมาทดสอบหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 3.1.2.2 นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟหาช่วงเวลาผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1.5 การศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือก ที่สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชที่คัดเลือกได้

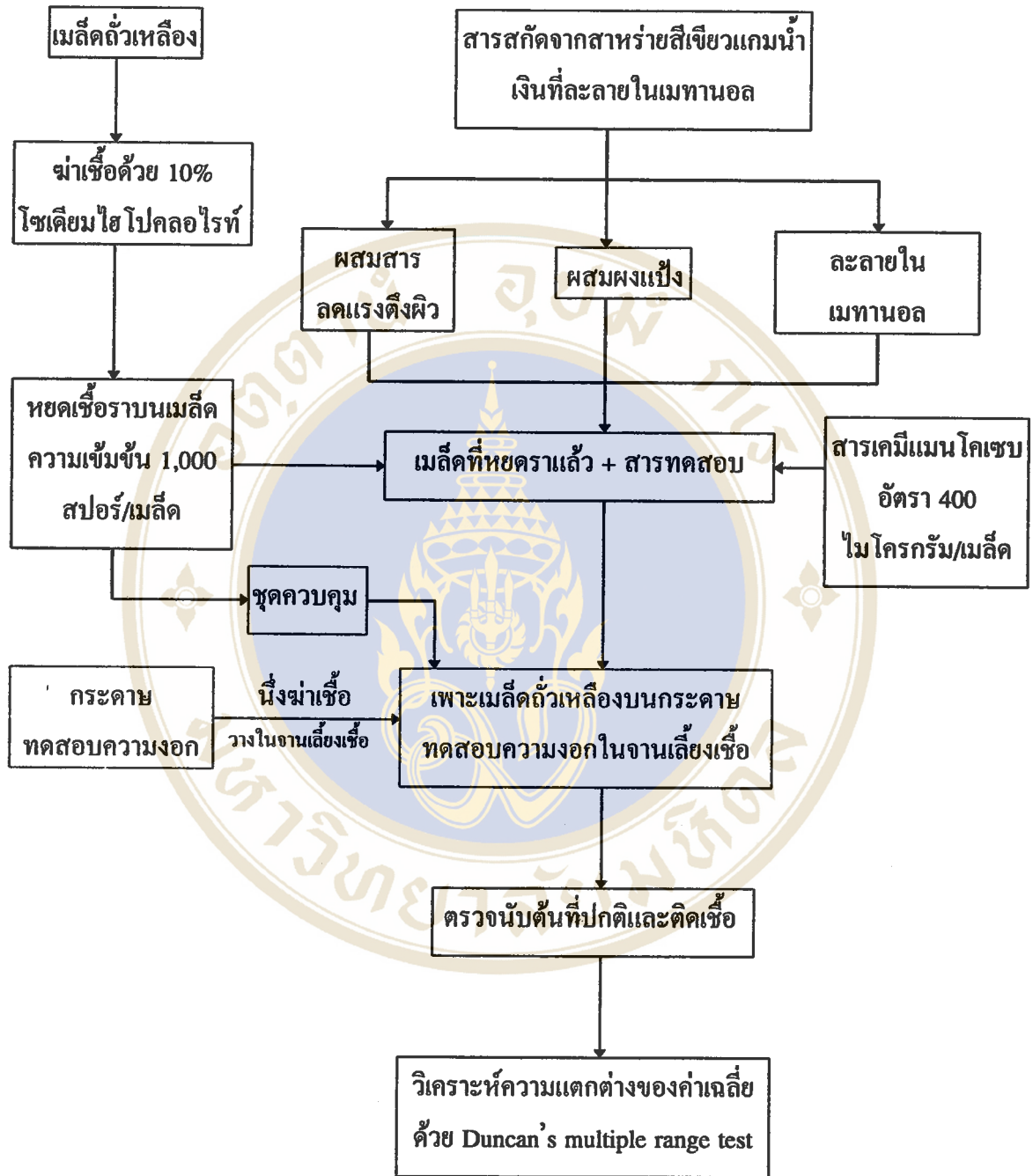
นำสารสกัดจากสาหร่าย มาละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้น ต่างๆ ตั้งแต่ 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น จนถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น นำสารที่ได้มาทดสอบกับ เชื้อราด้วยวิธี paper disc plate เช่นเดียวกับข้อ 3.1.2.2

3.2 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ที่คัดเลือกในการควบคุม เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง

3.2.1 การศึกษารูปแบบของสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองที่ทดสอบบนวัสดุเพาะใน งานเลี้ยงเชื้อ (แผนภาพที่ 1)



ภาพที่ 2 การขยายการผลิตสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ที่คัดเลือก ในถังคาร์บอย ขนาด 12 ลิตร ที่บรรจุอาหาร BGA คัดแปลง ปริมาตร 10 ลิตร ฟัน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$



แผนภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการศึกษาหาารูปแบบของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองที่ทดสอบบนวัสดุเพาะในงานเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 ขั้นตอนเตรียมการ

1) การเตรียมวัสดุเพาะ

ตัดกระดาษทดสอบความงอกเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 85 มิลลิเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ วางลงในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว จานละ 4 แผ่น รดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนชุ่มทุกๆ จาน

2) การเตรียมเมล็ดถั่วเหลือง

ใช้เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 ซึ่งได้รับการทดสอบจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อ.ตาคลี จ.นครสวรรค์ แล้วว่ามีความชื้นไม่เกินร้อยละ 18 ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99 เปอร์เซนต์ความงอก 83 เปอร์เซนต์ นำเมล็ดถั่วเหลืองแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ เพื่อฆ่าเชื้อที่อยู่บริเวณผิวเมล็ด เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้งเพื่อให้โซเดียมไฮโปคลอไรท์หมดไป ชั้เมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษทดสอบความงอกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3) การเตรียมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราใช้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายกับสารเคมีที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยสารเคมีที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบ มีชื่อสามัญคือ mancozeb และมีชื่อการค้าว่า dithane M-45 มีอัตราการใช้ที่แนะนำคือ 3 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม หรือประมาณ 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด

4) การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่ความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูงซึ่งคาดว่าจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยละลายในตัวทำละลายเมทานอล (จากการทดสอบเมล็ดพบว่าพื้นที่ผิวของเมล็ดถั่วเหลืองจะสัมผัสกับของเหลวปริมาณ 10 ไมโครลิตรได้ทั่วถึงพอดีดังนั้นจึงจะมีปริมาณสารสกัด 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด) แบ่งสารสกัดเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

- สารสกัดที่ละลายในเมทานอลตามปกติ
- สารสกัดที่ละลายในเมทานอลและผสมกับสารลดแรงตึงผิว

อัตรา 1 ไมโครลิตรต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร
- ผสมสารสกัดกับผงแป้ง (talc) ในอัตราผงแป้ง 0.12 กรัมต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร

5) การเตรียมเชื้อรา

เตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ในน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อราที่ 10^5 นี้ จะทำให้เมล็ดถั่วเหลืองในชุดควบคุมติดเชื้อทั้งหมด และจากการทดสอบเมล็ดพบว่าพื้นที่ผิวของเมล็ดถั่วเหลืองจะสัมผัสกับของเหลวปริมาณ 10 ไมโครลิตร ได้ทั่วถึงพอดี ดังนั้นเมื่อนำสปอร์ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 ไมโครลิตร มาบีบเปิดลงบนเมล็ดก็จะมีปริมาณสปอร์ต่อเมล็ดเท่ากับ 1,000 สปอร์

3.2.1.2 ขั้นตอนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) โดยวางเมล็ดถั่วเหลืองจานละ 10 เมล็ด จำนวน 40 จ้า ต่อ 1 ชุดการทดลอง (treatment)

แบ่งชุดการทดลอง ดังนี้

1. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ละลายในเมทานอล + เชื้อรา
2. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ผสมผงแป้ง + เชื้อรา
3. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ละลายในเมทานอลและผสมสารลดแรงตึงผิว + เชื้อรา
4. เมล็ดถั่วเหลือง + แมนโคเซบ + เชื้อรา

จัดให้มีชุดควบคุม (control) ดังนี้

1. เมล็ดถั่วเหลือง + น้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว
2. เมล็ดถั่วเหลือง + เชื้อรา
3. เมล็ดถั่วเหลือง + เมทานอล + เชื้อรา
4. เมล็ดถั่วเหลือง + ผงแป้ง + เชื้อรา

แต่ละชุดการทดลองจะทำการหยดสปอร์แขวนลอยลงบนเมล็ดที่เตรียมไว้ ซึ่งจะได้ประมาณ 1,000 สปอร์ต่อเมล็ด ทั้งไว้จนแห้ง หยดสารสกัดปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนเมล็ดถั่วเหลือง โดยค่อยๆหยดจนทั่วเมล็ด ทั้งไว้จนแห้ง สำหรับการทดลองที่ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา ให้กลูเมล็ดกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราตามอัตราที่แนะนำ วางเมล็ดลงบนกระดาษทดสอบ

ความงอกในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 10 เมล็ด จำนวน 40 จาน ต่อ 1 การทดลอง วางจานเลี้ยงเชื้อที่เพาะเมล็ดแล้วในที่ที่มีแสงพอเหมาะ ให้แสง 12 ชั่วโมง สลับมืด 12 ชั่วโมง รดน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อทุกวัน อย่าให้กระดาษแห้ง เมื่อครบ 7 วัน นับจำนวนต้นกล้าที่ปกติ และจำนวนต้นกล้าที่ติดเชื้อ โดยเขียนเชื้อดูได้กล้องจุลทรรศน์ และนำส่วนที่ติดเชื้อมาวางบนอาหาร PDA และตรวจดูการเจริญของเชื้อรา วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นที่ปกติโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกรูปแบบของสารสกัดที่ให้จำนวนต้นกล้าปกติของถั่วเหลืองมากที่สุดเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองที่ทดสอบบนวัสดุเพาะในจานเลี้ยงเชื้อ (แผนภาพที่ 2)

3.2.2.1 ขั้นตอนเตรียมการ

1) การเตรียมสารสกัด

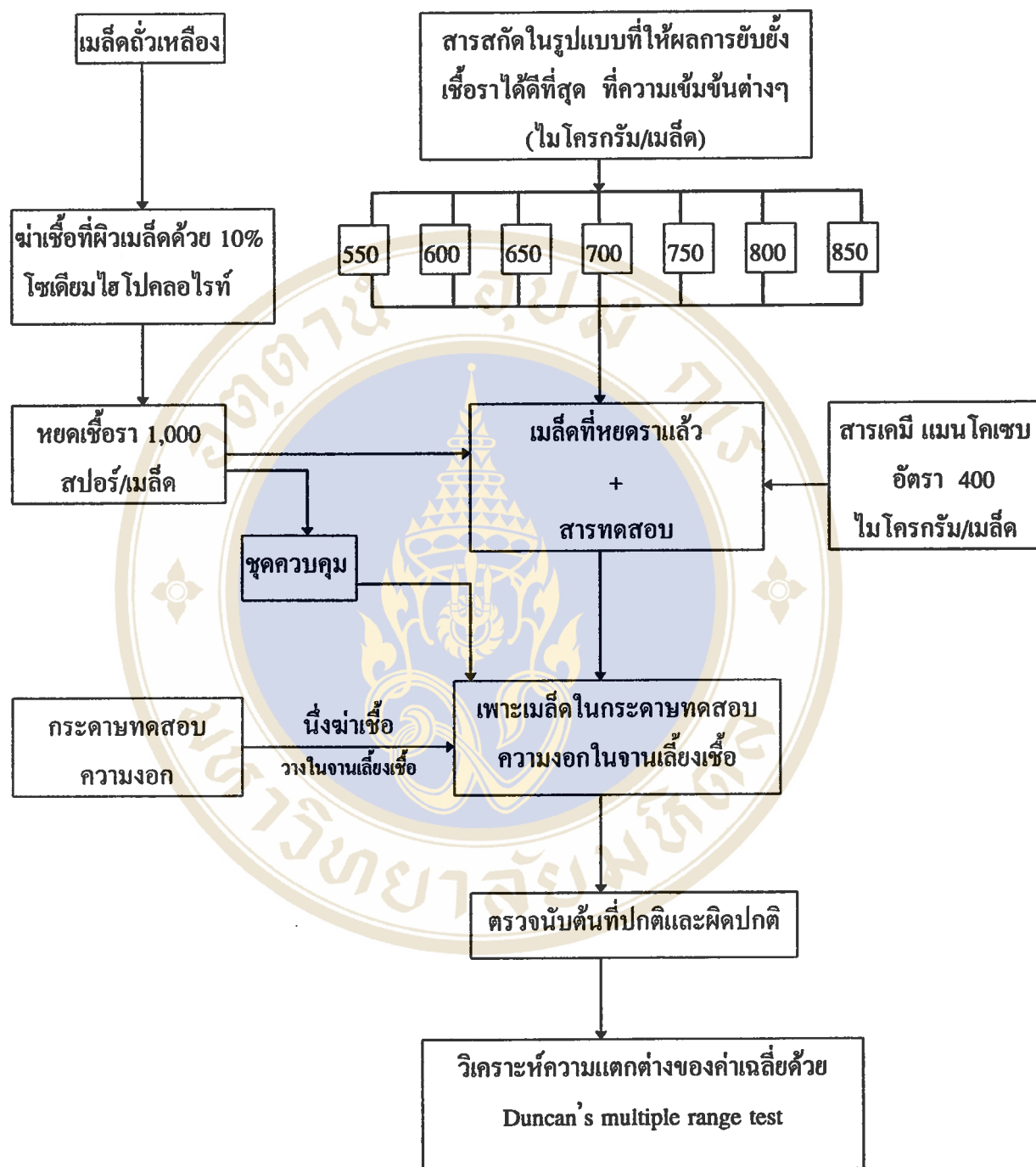
เตรียมสารสกัดจากสาหร่ายในตัวทำละลายเมทานอลในรูปแบบที่คัดเลือกได้จากการทดลองในข้อ 3.2.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 550 600 650 700 750 800 และ 850 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร (หรือต่อเมล็ด)

2) การเตรียมเมล็ดถั่วเหลือง เชื้อรา สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา วัสดุเพาะเมล็ด เตรียมเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2.1.1

3.2.2.2 ขั้นตอนทดลอง

แบ่งชุดการทดลองดังนี้

1. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ 550 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + เชื้อรา
2. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ 600 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + เชื้อรา
3. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ 650 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + เชื้อรา
4. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + เชื้อรา
5. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ 750 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + เชื้อรา
6. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ 800 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + เชื้อรา



แผนภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดกล้วยเหลืองที่ทดสอบบนวัสดุเพาะในจานเลี้ยงเชื้อ

7. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัดที่ 850 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + เชื้อรา
 8. เมล็ดถั่วเหลือง + แมนโคเซบอตรา 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + เชื้อรา
- และให้มีชุดควบคุมคือ
1. เมล็ดถั่วเหลือง + น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ
 2. เมล็ดถั่วเหลือง + เชื้อรา
 3. เมล็ดถั่วเหลือง + เมทานอล + สารผสมเพื่อให้อยู่ในรูปแบบที่ได้จากข้อ 3.2.1 + เชื้อรา

แต่ละการทดลองทำโดยหดยเชื้อราลงบนเมล็ดถั่วเหลือง ทั้งไว้ให้แห้ง จากนั้นหดยสารสกัดตามความเข้มข้นของแต่ละชุดการทดลอง ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อเมล็ด โดยค่อยๆหดยจนทั่วทั้งไว้จนแห้ง ส่วนการทดลองที่ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราแมนโคเซบ ให้นำเมล็ดที่จุ่มเชื้อราจนแห้งแล้วมาคลุกกับสารแมนโคเซบ นำเมล็ดไปวางเรียงบนวัสดุเพาะในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 10 เมล็ด จำนวน 40 จาน ต่อ 1 ชุดการทดลอง ให้แสงและน้ำเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา เมื่อครบ 7 วัน นับจำนวนต้นกล้าที่ปกติ และจำนวนต้นกล้าที่ติดเชื้อ โดยเขียนข้อมูลได้กล้องจุลทรรศน์ และนำส่วนที่ติดเชื้อมาวางบนอาหาร PDA และตรวจดูการเจริญของเชื้อรา วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นที่ปกติโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกสารสกัดที่ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีเพื่อทดลองในขั้นต่อไป

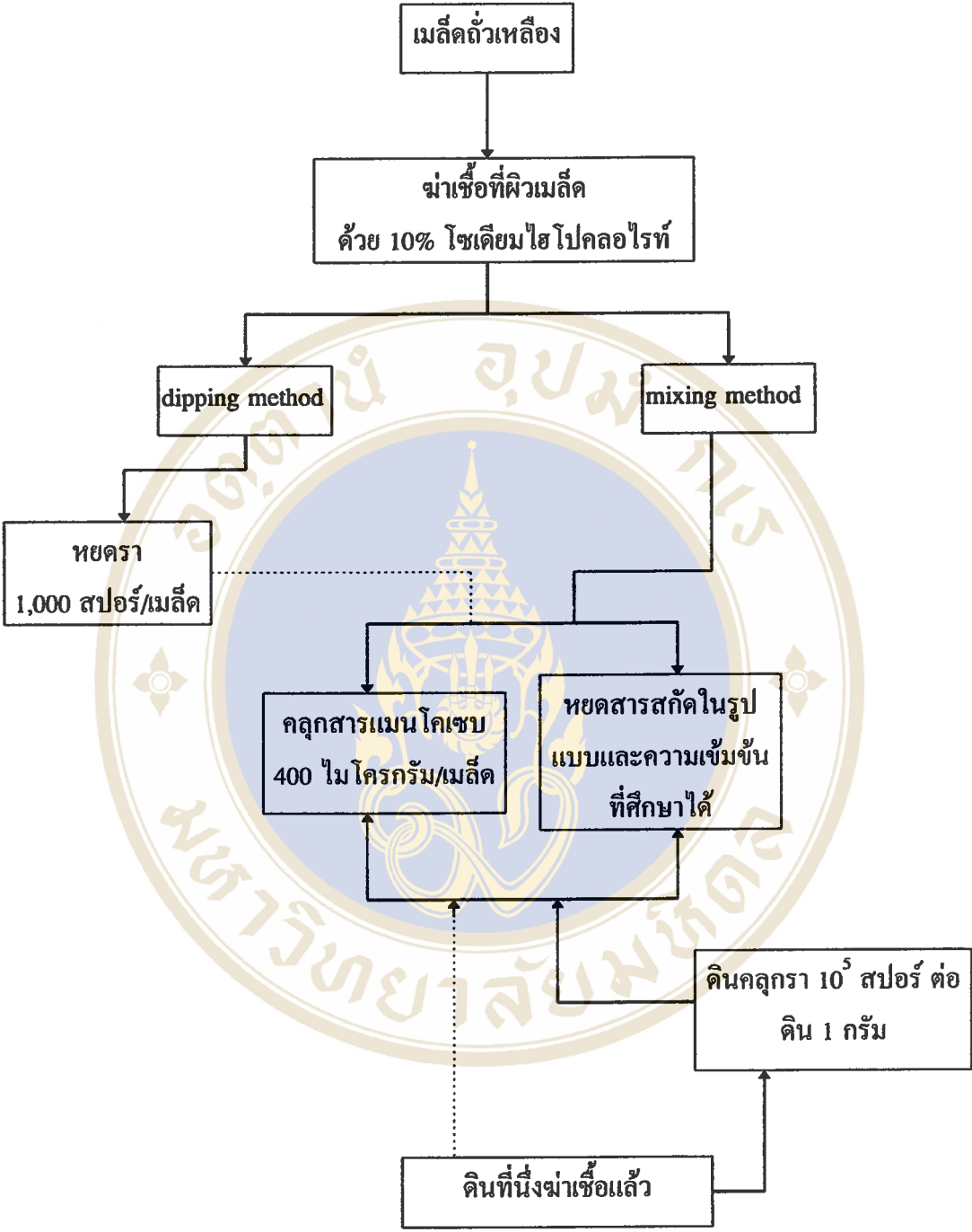
3.2.3 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนต้นถั่วเหลืองในระดับถุงเพาะกล้า (แผนภาพที่ 3)

จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการจะได้ทราบถึงรูปแบบของสารสกัดที่เหมาะสม รวมทั้งความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา จากนั้นจะนำรูปแบบและความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมมาทดสอบกับเมล็ดถั่วเหลืองในสภาพที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติ เพื่อทราบถึงความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้จริง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 5 เมล็ด

3.2.3.1 ขั้นตอนเตรียมการ

- 1) การเตรียมวัสดุปลูก



แผนภาพที่ 3 แสดงขั้นตอนการทดสอบสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913 ในรูปแบบและความเข้มข้นที่คัดเลือกต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ในถั่วเหลืองในถุงเพาะกล้า

นำดินสิดาไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาพักไว้ 1 วัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อให้สปอร์ของจุลินทรีย์ถูกทำลายไป

2) การเตรียมเมล็ด

นำเมล็ดถั่วเหลืองแช่ใน โซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อฆ่าเชื้อที่อยู่บริเวณผิวเมล็ด เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง เพื่อให้โซเดียมไฮโปคลอไรท์หมดไป ชั้เมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษทอสอบความงอกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3) การเตรียมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา

เตรียมสารป้องกันกำจัดเชื้อราแมนโคเซบที่อัตรา 3 กรัมต่อเมล็ดถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม ซึ่งประมาณได้เท่ากับ 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด

4) การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดในรูปแบบที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.1 และเตรียมในความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.2

5) การเตรียมเชื้อรา

เตรียมเชื้อราในรูปแบบแขวนลอยของ *Colletotrichum truncatum* ที่อัตรา 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใช้เพื่อนำเมล็ดมาจุ่มซึ่งจะได้อัตราสปอร์ต่อเมล็ดเท่ากับ 1,000 สปอร์ต่อเมล็ด อีกส่วนหนึ่งใช้เพื่อคลุกดิน (mixing) ปลุกเชื้อราในอัตราสปอร์ 1 มิลลิลิตรต่อดิน 1 กรัม (ปริมาณสปอร์แขวนลอย 200 มิลลิลิตรต่อถุง)

3.2.3.2 ขั้นตอนทดลอง

แบ่งชุดการทดลองดังนี้

1. เมล็ดถั่วเหลือง + สารสกัด + เชื้อรา (แบบหยดและแบบคลุกดิน)
2. เมล็ดถั่วเหลือง + แมนโคเซบ + เชื้อรา (แบบหยดและแบบคลุกดิน)

และให้มีหุคควบคุมคือ

1. เมล็ดถั่วเหลือง + เชื้อรา (แบบหยดและแบบคลุกดิน)

2. เมล็ดถั่วเหลืองปลูกลงในดินที่ไม่มีเชื้อ 25 เมล็ด

- การทดลองแบบคลุกเชื้อรากับดิน (mixing method) (46) ทำโดยนำเชื้อราที่เตรียมไว้มาคลุกกับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราสปอร์ 1 มิลลิลิตรต่อดิน 1 กรัม นำดินที่คลุกเชื้อราแล้วใส่ในถุงเพาะกล้าถุงละ 200 กรัม นำเมล็ดถั่วเหลืองมาหยดสารสกัดที่เตรียมไว้ ทั้งไว้ให้แห้ง นำเมล็ดที่หยดสารสกัดแล้วมาปลูกลงในดิน ถุงละ 5 เมล็ด จำนวน 20 ถุง ต่อ 1 การทดลอง ไรยดินกลบบางๆ รดน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร วางเรียงถุงเพาะกล้าเป็นสี่เหลี่ยมจตุรัส 6 บล็อก บล็อกละ 20 ถุง ไว้ในเรือนเพาะชำที่มีการพรางแสง ให้แสงผ่านเพียงร้อยละ 60 สังเกตการเกิดโรคทุกวัน และตรวจสอบจำนวนต้นที่ปกติเมื่อครบ 14 วัน สำหรับการทดลองที่ทดสอบกับสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ทำโดยคลุกสารแมนโคเซบกับเมล็ด นำมาปลูกลงและตรวจสอบโรคเช่นกัน

วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นที่ปกติโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

- การทดลองแบบหยดสปอร์แขวนลอยลงบนเมล็ด (dipping method) (32) นำเมล็ดถั่วเหลืองมาหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่เตรียมไว้ ทั้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำเมล็ดที่หยดเชื้อราแล้วมาหยดสารสกัดที่เตรียมไว้ ทั้งไว้จนแห้ง นำดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในถุงเพาะกล้า ถุงละ 200 กรัม นำเมล็ดที่เตรียมไว้มาปลูกลงในดินไรยดินกลบบางๆ รดน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อถุง จัดวางเช่นเดียวกับการปลูกลงแบบ mixing ส่วนการทดสอบกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราทำโดย นำเมล็ดที่หยดเชื้อราแล้ว มาคลุกกับแมนโคเซบ นำมาปลูกลงเช่นกัน สังเกตการเกิดโรคทุกวันและตรวจสอบจำนวนต้นที่ปกติเมื่อครบ 14 วัน และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นที่ปกติโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

8.3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR

8913

3.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

คุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารที่ศึกษาได้แก่ ความคงตัวของสารในสภาพความเป็นกรด-เบสต่างๆและความคงตัวของสารที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ ซึ่งมีวิธีการศึกษาดังนี้

3.3.1.1 การศึกษาความคงตัวของสารในสภาพความเป็นกรด-เบสต่างๆ (pH stability)

นำสารสกัด ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร มาปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 ด้วย 2 N HCl หรือ 2 N NaOH ตามลำดับ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเป็นกรด-เบสให้เป็นกลาง นำไปตรวจสอบหาประสิทธิภาพของสาร โดยวิธี paper disc plate และวิเคราะห์ผลในลักษณะเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์ (relative inhibition) กับชุดควบคุมคือปริมาณสารออกฤทธิ์จากสารสกัดที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนี้

$$\% \text{ การยับยั้งสัมพัทธ์} = \frac{\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ทดสอบได้}}{\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์จากชุดควบคุม}} \times 100$$

3.3.1.2 การศึกษาความคงตัวของสารที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ (heat stability)

นำสารสกัด ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.0 แล้ว ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ ปรับอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยในช่วงเวลา 2 ชั่วโมงนี้จะมีการตรวจประสิทธิภาพของสารโดยวิธี paper disc plate ทุกๆ 15 นาที และศึกษาเช่นเดียวกันนี้ ที่อุณหภูมิ 70 100 และ 121 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลในลักษณะเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์กับสารสกัดที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1

3.3.2 การทดสอบทางเคมี

3.3.2.1 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน โดยใช้วิธีทินแลเยอร์ โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography)

3.3.2.1.1 การเลือกกระบวนการทำให้ละลายที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน (63,68)

นำสารสกัดจากสาหร่ายที่มีความเข้มข้นสูงมาหยด (spot) ลงบนแผ่นซิลิกาเจล (TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄, MERCK) ขนาดกว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร โดยตำแหน่งที่หยดอยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นซิลิกาเจลประมาณ 1.0 เซนติเมตร นำไปตีเวลลอป (develop) ในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยสารละลายผสม โดยให้ส่วนปลายล่างของแผ่นแช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยสารละลายผสมที่ใช้ คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วนต่างๆกันดังนี้ 6:4:1, 7:3:1 และ 10:3:1 เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร นำมาตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ตรวจสอบตำแหน่งของสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธีออโตไบโอกราฟี (autobiograph) กับเชื้อราที่คัดเลือก โดยเทอาหาร PDA อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ลงบนแผ่นซิลิกาเจลที่ต้องการตรวจสอบตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งวางอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก รองอาหารแข็ง จากนั้นจึงปลูกเชื้อราความเข้มข้น 10⁷ สปอร์ต่อมิลลิตรด้วยการใช้ไม้ปั่นสำลีนำเชื้อ จุ่มเชื้อรามาถูไปมาบนผิวหน้าของอาหาร PDA ให้ทั่วทั้ง 3 ระบาย บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบตำแหน่งที่มีบริเวณยับยั้งการเจริญเกิดขึ้น และตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยส่องดูได้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เปรียบเทียบตำแหน่งของสารที่ปรากฏด้วยวิธีออโตไบโอกราฟี และภายใต้แสง UV เลือกระบบสารละลายที่เมื่อตีเวลลอปแล้วให้ส่วนที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราแยกจากส่วนปะปนมากที่สุด

3.3.2.1.2 การใช้วิธีทินแลเยอร์ โครมาโทกราฟีในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน

นำสารสกัดจากสาหร่ายที่มีความเข้มข้นสูงมาหยดเป็นแนวตรง (streak) ตลอดความกว้างของแผ่นซิลิกาเจล แบบ preparative (TLC plate silica gel 60 F₂₅₄, MERCK) ซึ่งมีความหนา 2 มิลลิเมตร กว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร โดยให้ห่างจากขอบด้านข้างด้านละ 1 เซนติเมตร และสูงจากปลายด้านล่าง 1.5 เซนติเมตร นำไปตีเวลลอปในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยสารละลายผสมที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.3.2.1.1 เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2 เซนติเมตร นำออกมาทำให้แห้ง ขูดซิลิกาเจลตำแหน่งที่ทราบแล้วว่า มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิตร จากนั้น เติมนเมทานอลลงในขวดรูปชมพู่เดียวกันให้พอเหมาะกับปริมาณซิลิกาเจลเพื่อละลายสารออกจากซิลิกาเจล กรองแยกส่วนที่เป็นเมทานอลและซิลิกาเจลออกจากกันนำส่วนที่เป็นเมทานอลไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อให้ได้สารที่มีความเข้มข้นมากขึ้น (ซึ่งความเข้มข้นนี้ต้อง

มากพอที่จะทำให้เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อราเมื่อนำสารดังกล่าวไปทดสอบตามวิธี paper disc plate) เตรียมไว้เพื่อทดสอบต่อไป

3.3.2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโทกราฟี

3.3.2.2.1 การทดสอบปฏิกิริยากับนินไฮดริน (ninhydrin reaction) (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

เป็นการตรวจหากรดอะมิโน ทำการทดสอบโดยนำสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยานินไฮดริน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด ประมาณ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินถึงม่วงแสดงว่าผลการทดลองเป็นบวก

3.3.2.2.2 Biuret test (ภาคผนวก ข. ข้อ 2)

เป็นการทดสอบทั่วไปของพวก peptide ซึ่งโมเลกุลมีกรดอะมิโนมากกว่า 3 หน่วย (tripeptide) ขึ้นไปจะให้ผลบวก โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้ ผสมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดสอบ หยดสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 หยดลงในหลอดทดสอบ ผสมให้เข้ากันเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์อีกหนึ่งหยดผสมเช่นเดิมอีก ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนกระทั่งเกิดสีชมพูอย่างชัดเจน ก็แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก หากเกิดตะกอนสีฟ้าของของคิวปริคไฮดรอกไซด์ขึ้นแสดงว่าผลการทดสอบเป็นลบ หากสีชมพูเกิดขึ้นไม่ชัดเจนให้ตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาที

3.3.2.2.3 Fehling test

เป็นการทดสอบเพื่อหา reducing sugar มีวิธีการดังนี้ นำ Fehling solution I (CuSO_4 aqueous) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Fehling solution II (Rochelle salt in NaOH) (ภาคผนวก ข. ข้อ 3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกันในหลอดทดสอบ ต้มจนเดือดเบาๆ ค่อยๆหยดสาร

ตัวอย่างที่จะทดสอบ 2-3 หยดลงในหลอดทดสอบ ต้มต่อประมาณ 1 นาที สังเกตการเปลี่ยนสี แล้วค่อยๆหยดสารตัวอย่างที่จะทดสอบลงไปอีกทีละน้อย สังเกตสีของตะกอน ถ้าให้ผลการทดสอบเป็นบวก สีน้ำเงินของสารละลายจะค่อยๆหมดไปและเกิดตะกอนสีน้ำตาลอมแดง

3.3.2.2.4 Molisch's test

เป็นการทดสอบเพื่อตรวจหาคาร์โบไฮเดรต มีวิธีการดังนี้ ผสมสารตัวอย่างที่จะทดสอบ 0.5 มิลลิลิตร กับ α -naphthol 1 เปอร์เซ็นต์ในแอลกอฮอล์ 1 หยด แล้วค่อยๆเทกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงข้างๆหลอดที่เอียงจนเกิดเป็นสองชั้นขึ้น สังเกตสีตรงรอยต่อถ้ามีคาร์โบไฮเดรต จะเกิดวงแหวนสีม่วงขึ้นบริเวณรอยต่อ

3.3.2.2.5 การทดสอบแอนโทรน (anthrone test)

ผสมสารตัวอย่างที่จะทดสอบ 0.5 มิลลิลิตร กับ anthrone reagent (2 เปอร์เซ็นต์ anthrone ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น) 1 มิลลิลิตร ผสมทันทีและตั้งทิ้งไว้ ความร้อนจากการผสมจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้น สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าเป็นคาร์โบไฮเดรตจะให้สีน้ำเงินอมเขียว แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.2.2.5 การทดสอบความไม่อิ่มตัวของลิปิด (unsaturation test)

ใส่คลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำสารละลายตัวอย่าง 2 หยดลงในหลอดทดลองดังกล่าว จากนั้น ค่อยๆ หยดสารละลายโบรมีนลงไปทีละหยดผสมให้เข้ากัน โดยเคาะหลอดทดลองด้วยฝ่ามือ ถ้าสารตัวอย่างเป็นลิปิดที่มีพันธะคู่ จะพอกจากสีโบรมีนได้ ให้บันทึกผลเป็นบวก

3.3.2.2.6 การทดสอบการยับยั้งโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ (38)

ใส่สารตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด ใส่เอนไซม์โปรติเอสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทั้ง 2 หลอด จากนั้นนำหลอดหนึ่งไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้เอนไซม์ถูกทำลาย ส่วนอีกหลอดหนึ่งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำสารจากทั้ง 2 หลอด หยดบนแผ่นทดสอบ นำไปวางบนผิวหน้าของอาหาร PDA ที่ปลูกเชื้อราโรคพืชแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบผลโดยสังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น สารจากหลอดที่ได้ถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จะ

ต้องเกิดบริเวณขั้วขั้วเนื่องจากเอนไซม์ถูกทำลายด้วยความร้อนไม่สามารถย่อยทำลายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงสามารถออกฤทธิ์ขั้วขั้วเชื้อราได้ ส่วนหลอดที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนั้น หากไม่เกิดบริเวณขั้วขั้วเชื้อรา ให้รายงานผลเป็นบวก ส่วนตัวควบคุม จะใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหยดบนแผ่นทดสอบ ทดสอบเช่นเดียวกัน ซึ่งชุดควบคุมจะต้องเกิดบริเวณขั้วขั้วเชื้อรา

ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ โดยเปลี่ยนชนิดของเอนไซม์เป็น ไลเปสและอไมเลส





บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช

4.1.1 การคัดเลือกสาหร่ายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการทดสอบกับเชื้อรา

จากตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 11 สกุล 161 สายพันธุ์ พบว่ามีสาหร่าย 13 สายพันธุ์ หรือ ร้อยละ 8.07 แสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา (ตารางที่ 7) ซึ่ง Carmichael, W. W. (27) ได้รายงานว่าความเป็นไปได้ที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในจุลินทรีย์ประมาณร้อยละ 7 ของจำนวนทั้งหมดที่ศึกษา ดังนั้นผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้ถือได้ว่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยเล็กน้อย โดยพบว่าในสกุล *Tolypothrix* จะมีสายพันธุ์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราสูงที่สุด รองลงมาคือ *Fischerella* และ *Hapalosiphon* ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 25, 16 และ 11.76 ตามลำดับ ส่วนในสกุลที่ไม่พบว่ามีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อราเลย คือ สกุล *Cylindrospermum*, *Gloeotrichia*, *Mastigocladus*, *Scytonema* และ *Stigonema* สำหรับสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อราโรคพืช รวมทั้งประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อราโรคพืชสายพันธุ์ต่างๆ แสดงในตารางที่ 8 ซึ่งจะพบว่า สารสกัดจากสาหร่าย 11 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8901, *Calothrix* sp. TISTR 8911, *Calothrix* sp. TISTR 8912, *Calothrix* sp. TISTR 8914, *Fischerella* sp. TISTR 8917, *Fischerella* sp. TISTR 8918, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8920, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8921, *Nostoc* sp. TISTR 8923, *Tolypothrix* sp. TISTR 8928 และ *Tolypothrix* sp. TISTR 8929 สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่งได้ 1 สายพันธุ์ มีสารสกัดจากสาหร่าย 1 สายพันธุ์ คือ *Nostoc* sp. TISTR 8924 สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้ 2 สายพันธุ์ และพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Calothrix* sp. TISTR 8913 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 3 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 5 สายพันธุ์

จากผลการศึกษานี้จึงคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ *Calothrix* sp. TISTR 8913 (ภาพที่ 3) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์กว้างในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช รวมทั้งคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ *Colletotrichum truncatum* (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ในถั่วเหลือง เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบกับสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ดังกล่าวต่อไป

ตารางที่ 7 จำนวนสาหร่ายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สกุล	จำนวนสายพันธุ์ ที่นำมาคัดเลือก	จำนวนสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารออก ฤทธิ์ทางชีวภาพด้านเชื้อรา	
		จำนวน	ร้อยละ
<i>Anabaena</i>	15	1	6.67
<i>Calothrix</i>	48	4	8.30
<i>Cylindrospermum</i>	3	0	0.00
<i>Fischerella</i>	12	2	16.00
<i>Gloeotrichia</i>	1	0	0.00
<i>Hapalosiphon</i>	17	2	11.76
<i>Mastigocladus</i>	1	0	0.00
<i>Nostoc</i>	35	2	5.70
<i>Scytonema</i>	12	0	0.00
<i>Stigonema</i>	9	0	0.00
<i>Tolypothrix</i>	8	2	25.00
รวม 11	161	13	8.07

ตารางที่ 8 สายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อราโรคพืช และประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์

สายพันธุ์สาหร่าย	สายพันธุ์เชื้อราโรคพืช				
	Colletotrichum truncatum	Curvularia lunata	Fusarium moniliforme	Fusarium oxysporum	Macrophomina phaseolina
Anabaena sp. TISTR 8901	-	+	-	-	-
Calothrix sp. TISTR 8911	-	-	-	++	-
Calothrix sp. TISTR 8912	+++	-	-	-	-
Calothrix sp. TISTR 8913	+++	-	-	++	+++
Calothrix sp. TISTR 8914	-	-	-	-	+
Fischerella sp. TISTR 8917	+	-	-	-	-
Fischerella sp. TISTR 8918	-	+	-	-	-
Hapalosiphon sp. TISTR 8920	-	-	-	-	++
Hapalosiphon sp. TISTR 8921	-	-	+	-	-
Nostoc sp. TISTR 8923	-	-	-	-	++
Nostoc sp. TISTR 8924	+++	-	-	-	++
Tolypothrix sp. TISTR 8928	++	-	-	-	-
Tolypothrix sp. TISTR 8929	-	-	-	-	++

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ, + เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ 6-10 มิลลิเมตร, ++ เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ 11-15 มิลลิเมตร,

+++ เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ 16-20 มิลลิเมตร, ++++ เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ มากกว่า 20 มิลลิเมตร



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 กำลังขยาย 200 เท่า



ภาพที่ 4 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* กำลังขยาย 200 เท่า

สำหรับความกว้างขวางในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913 แสดงดังตารางที่ 9 และภาพที่ 5-7

4.1.2. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Calothrix* sp. TISTR 8913

จากการเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร BGA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตั้งอยู่บนเครื่องเขย่า เก็บเกี่ยวสาหร่ายปริมาณเท่ากันทุกวัน เวลาเดียวกัน ตรวจวัดการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดังแสดงในภาพที่ 8 จากภาพจะพบว่า สาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 จะเริ่มมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในช่วงแรกของระยะ exponential phase คือตั้งแต่วันที่ 5 ของการเลี้ยง และผลิตสูงสุดในช่วง stationary phase โดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 14 ของการเลี้ยง ซึ่งช่วงเวลาในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ สาหร่ายสายพันธุ์นี้จะคล้ายคลึงกับการผลิตสาร cyanobacterin LU-1 ของสาหร่าย *Nostoc linckia* CALU 892 (22) ซึ่งจะผลิตสาร cyanobacterin LU-1 ในช่วงที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วของสาหร่าย แต่จะไม่เป็นไปในทางเดียวกันกับสาหร่ายสายพันธุ์ *Scytonema* sp. TISTR 8208 ซึ่งผลิตสาร scytonemin X (35) และสาหร่าย *Nostoc muscorum* (20) โดยสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์นี้จะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระยะ post-exponential

4.1.3 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913

4.1.3.1 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ในอาหารสูตรต่างๆ คือ BG-11, Allen's, BGA และ BGA+N แสดงในภาพที่ 9 จะพบว่า สูตรอาหาร BGA+N เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุด สามารถให้น้ำหนักเซลล์สูงรวมทั้งให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงด้วย ถึงแม้ว่าสาหร่ายสายพันธุ์นี้จะสามารถตรึงไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตได้ แต่จะพบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในสภาพที่ไม่เติมไนโตรเจนในสูตรอาหาร BGA ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chetsumon (35) ซึ่งพบว่า การเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Scytonema* sp. TISTR 8208 ในสูตรอาหารที่มีการเติมไนโตรเจนจะทำให้สาหร่าย

ตารางที่ ๑ ความกว้างขวางในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

Calothrix sp. TISTR 8913

สายพันธุ์เชื้อราโรคพืช ¹	ประสิทธิภาพ ²
<i>Colletotrichum falcatum</i> จากอ้อย ใน จ.กาญจนบุรี	++++
<i>Fusarium</i> sp. จากข้าวโพด ใน จ. นครสวรรค์	++
<i>Fusarium</i> sp. จากข้าวโพด ใน จ. สระบุรี	++
<i>Bipolaris maydis</i> จากข้าวโพด ใน จ. นครราชสีมา	++++
<i>Macrophomina</i> sp. จากถั่วเขียว ใน จ. เพชรบูรณ์	++++
<i>Macrophomina</i> sp. จากถั่วเขียว จ. นครสวรรค์	++++

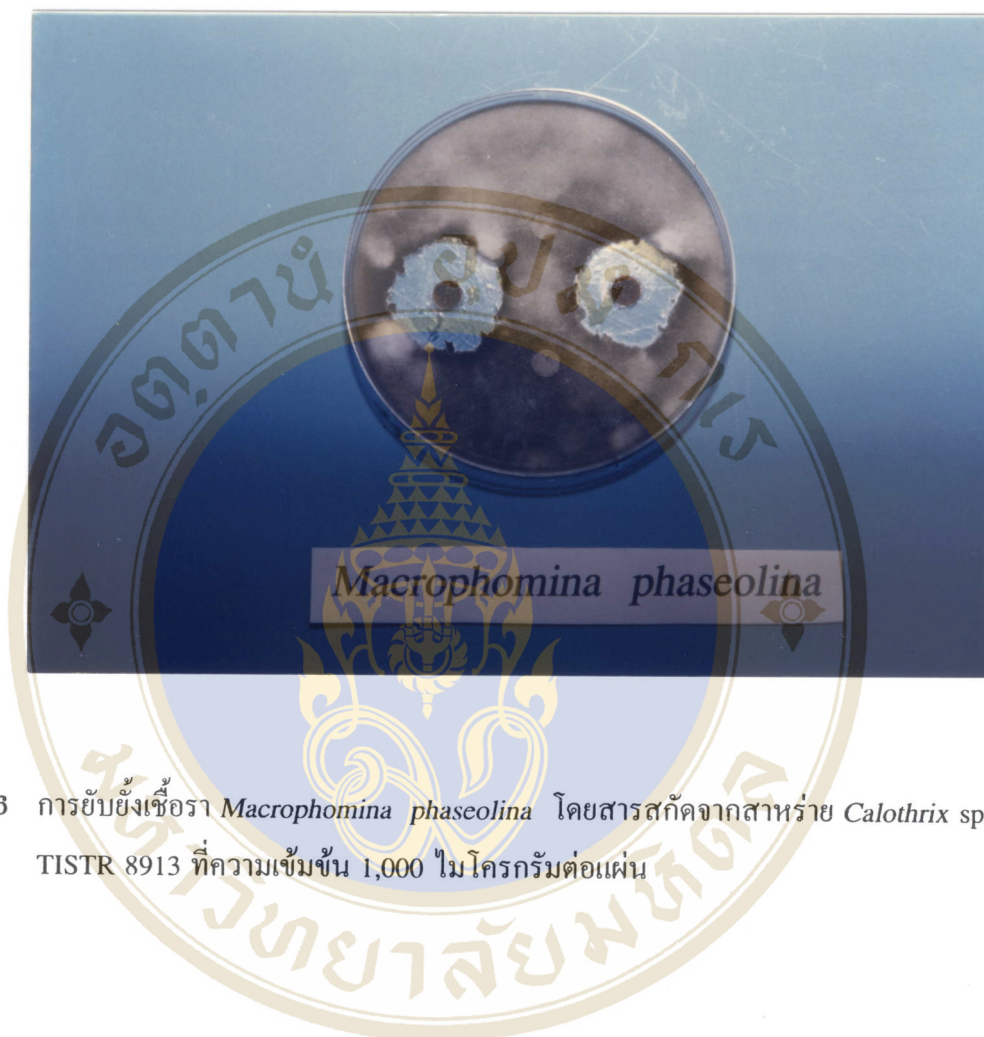
¹ : ความเข้มข้นของเชื้อราที่ 10⁷ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

² : ประสิทธิภาพของสารแสดงในรูปของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

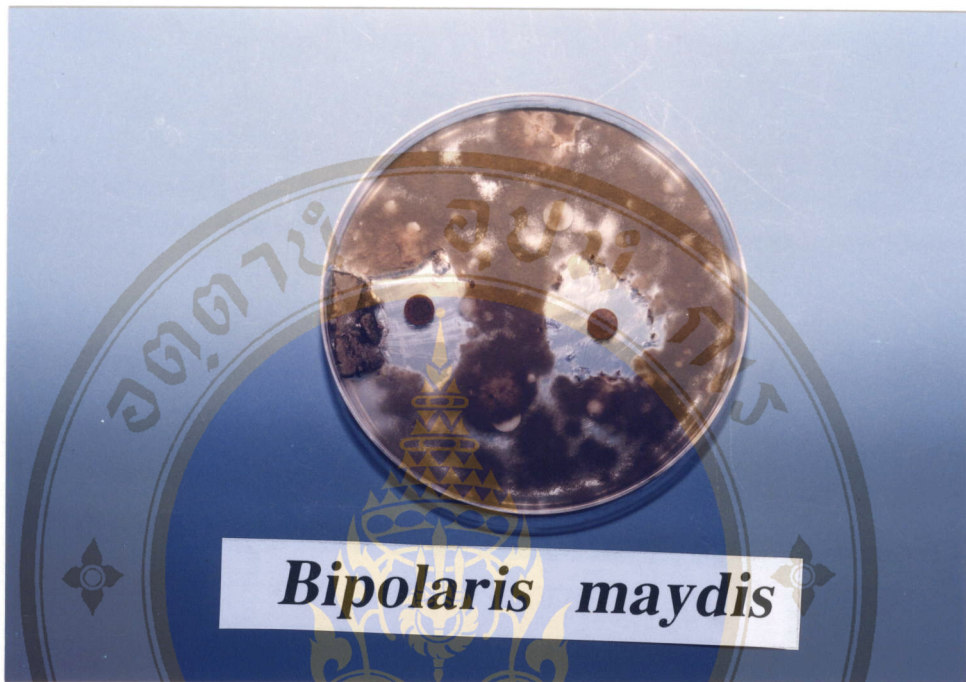
- ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง
- + เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ 6-10 มิลลิเมตร
- ++ เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ 11-15 มิลลิเมตร
- +++ เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ 16-20 มิลลิเมตร
- ++++ เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญมากกว่า 20 มิลลิเมตร



ภาพที่ 5 การยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น



ภาพที่ 6 การยับยั้งเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น



ภาพที่ 7 การยับยั้งเชื้อรา *Bipolaris maydis* โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น

สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ scytonemin X ได้สูงกว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่เติมไนโตรเจน

4.1.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดที่ 1.5 กรัมต่อลิตร จะทำให้สาหร่ายเจริญสูงสุดและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงสุดด้วย โดยน้ำหนักแห้งของเซลล์เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารซึ่งไม่ใส่ไนโตรเจน 2.5 เท่า (จาก 0.16 กรัมต่อลิตร เป็น 0.41 กรัมต่อลิตร) และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 15 เท่า (จาก 0.58 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 8.84 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดเป็น 2.0 กรัมต่อลิตร และ 2.5 กรัมต่อลิตรก็ไม่ได้ทำให้สาหร่ายเจริญดีขึ้น และไม่ได้เพิ่มความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่อย่างใด โดยความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดที่ 1.5 กรัมต่อลิตร จะเท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในสูตรอาหาร BGA+N ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chetsumon (35) ซึ่งพบว่า การเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Scytonema* sp. TISTR 8208 ในอาหารที่มีการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตรนั้น จะทำให้สาหร่ายมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดด้วย

4.1.3.3 การศึกษาความเข้มข้นของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 โดยใช้สูตรอาหาร BGA เติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร และเติมไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ความเข้มข้นของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ทำให้สาหร่ายเจริญสูงสุด คือ 1.5 กรัมต่อลิตร รวมถึงทำให้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงสุดด้วย แสดงดังภาพที่ 11 ความเข้มข้นที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ แตกต่างจากความเข้มข้นเดิมของสูตรอาหาร BGA ซึ่งใช้ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นที่ศึกษาได้นี้ทำให้น้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น 1.5 เท่า (จาก 0.35 กรัมต่อลิตร เป็น 0.53 กรัมต่อลิตร) รวมทั้งทำให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นกว่าเดิม 1.9 เท่า (จาก 9.28 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 17.96 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลการทดลองนี้แตกต่างจากที่ Chetsumon (35) ศึกษาได้จากการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Scytonema* sp. TISTR 8913 ซึ่งพบว่า *Scytonema* sp. TISTR 8913 นั้นสามารถเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อใช้ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของ

Rodhe (57) พบว่าสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีความต้องการฟอสเฟตแตกต่างกันไป ดังนั้นคาดว่าสาหร่ายในสกุล *Calothrix* นั้นเป็นสาหร่ายที่มีความต้องการฟอสเฟตในอัตราสูงกว่าสาหร่ายสกุลอื่นจึงจะสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของไดโปตัสเซียมฟอสเฟตที่ 1.5 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาต่อไป

4.1.3.4 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 โดยใช้สูตรอาหาร BGA เติมโซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร และใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.03 กรัมต่อลิตร จะทำให้สาหร่ายผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด ดังภาพที่ 12 ซึ่งมีน้ำหนักแห้งของเซลล์เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารเดิมซึ่งเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.07 กรัมต่อลิตร 1.3 เท่า (จาก 0.49 กรัมต่อลิตร เป็น 0.65 กรัมต่อลิตร) โดยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ศึกษาได้ในครั้งนี้จะแตกต่างจากที่ใช้ในสูตร BGA และถือว่าสอดคล้องกับรายงานของ Chetsumon (35) ส่วนหนึ่งที่ได้มีการศึกษาถึงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Scytonema* sp. TISTR 8208 โดยพบว่าหากไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยง จะเพิ่มปริมาณการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้นอีก 47 เปอร์เซ็นต์

4.1.3.5 การศึกษาสภาพความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการศึกษาโดยใช้สูตรอาหาร BGA ดัดแปลง โดยเติมโซเดียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสต่างๆกัน พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 จะทำให้สาหร่ายมีการเจริญสูงสุดและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบสอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 13

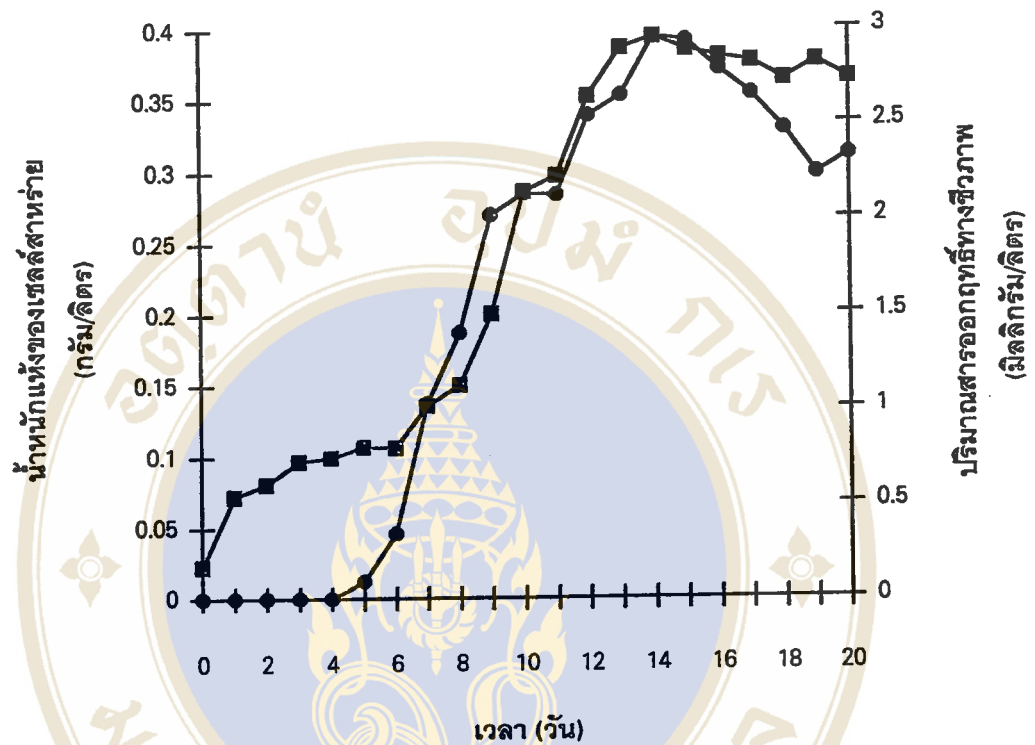
จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมและปริมาณองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า การใช้สูตรอาหาร BGA ดัดแปลงโดยเติม โซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร เติมไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 1.5 กรัมต่อลิตร ลดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ลงเหลือ 0.03 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ที่

7.0 จะทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้น 2 เท่า และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 9 เท่า (ตารางที่ 10)

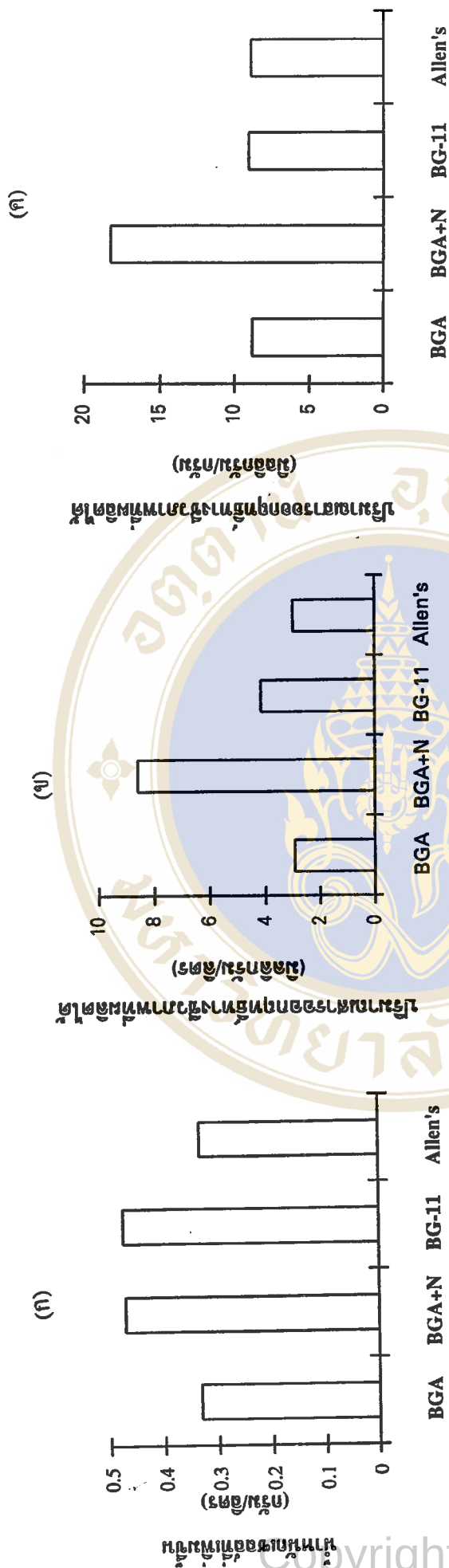
3.1.4 การขยายการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913 ในถังคาร์บอนขนาด 12 ลิตร

จากการขยายการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ในถังคาร์บอนขนาด 12 ลิตร ที่บรรจุอาหาร BGA ดัดแปลง ปริมาตร 10 ลิตร พ่น 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ ตรวจวัดการเจริญของสาหร่ายและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุกวัน แสดงผลดังภาพที่ 14 จากภาพจะพบว่าสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 จะเริ่มมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในช่วงแรกของระยะ exponential phase คือเริ่มตั้งแต่วันที่ 7 ของการเลี้ยง และผลิตสูงสุดในช่วงวันที่ 17 ของการเลี้ยง โดยในวันที่ 17 ของการเลี้ยงนี้ สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายในรูปของน้ำหนักแห้งได้ 0.24 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบเท่า cycloheximide เท่ากับ 20.97 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงด้วยอาหาร BGA ในสภาพการเลี้ยงเดียวกันซึ่งแสดงดังภาพที่ 15 พบว่า สาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 จะเริ่มผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพช้ากว่าการเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BGA ดัดแปลง คือเริ่มมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระยะ exponential ในช่วงวันที่ 11 ของการเลี้ยง และผลิตสารออกฤทธิ์สูงสุดในช่วง stationary phase คือ วันที่ 17 ของการเลี้ยง ซึ่งในวันที่ 17 ของการเลี้ยงนี้สามารถตรวจวัดเซลล์สาหร่ายในรูปของน้ำหนักแห้งได้ 0.10 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบเท่า cycloheximide เท่ากับ 3.16 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหาร BGA และ BGA ดัดแปลง ในวันที่ 17 เช่นเดียวกันแล้วจะพบว่า การเลี้ยงสาหร่ายด้วยสูตรอาหาร BGA ดัดแปลง จะให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์มากกว่าการเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BGA 2.4 เท่า และสูตรอาหาร BGA ดัดแปลง จะให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบเท่า cycloheximide มากกว่าสูตรอาหาร BGA ถึง 6.6 เท่า แสดงให้เห็นว่าการเติมไนโตรเจนให้แก่อาหารเลี้ยงนั้นสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของส่วนเซลล์แห้งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในการเจริญเติบโต และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่งผลให้มีการผลิตสารเมแทบอไลต์ขึ้น

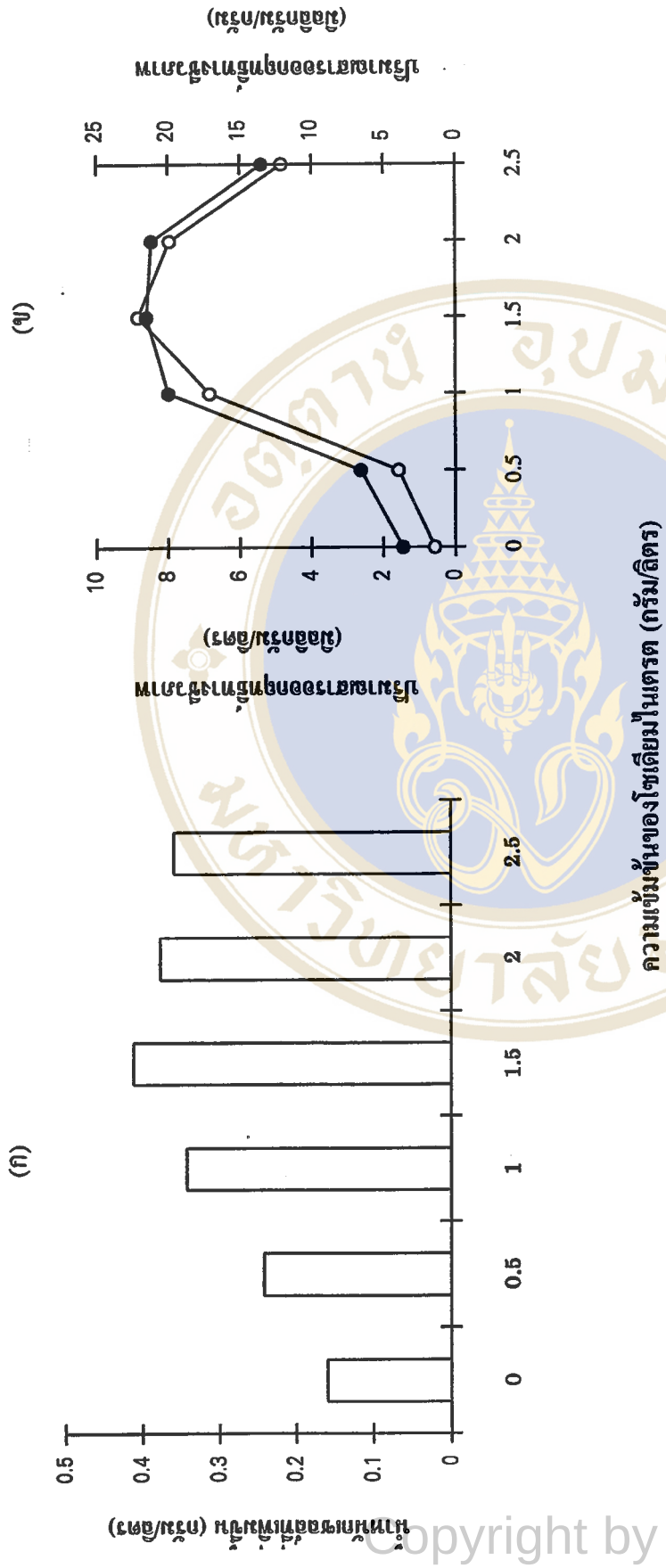


ภาพที่ 8 ช่วงเวลาของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Calothrix* sp. TISTR 8913 ซึ่งเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร BGA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$



ภาพที่ 9 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 โดยเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารสูตรต่างๆ ได้แก่ BGA BGA+N BG-11 และ Allen's ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 14 วัน

- (ก) การเจริญของสาหร่ายซึ่งตรวจวัดโดยการชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์
- (ข) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหน่วยปริมาตร (volumetric production)
- (ค) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำหนักเซลล์สาหร่าย (specific production)



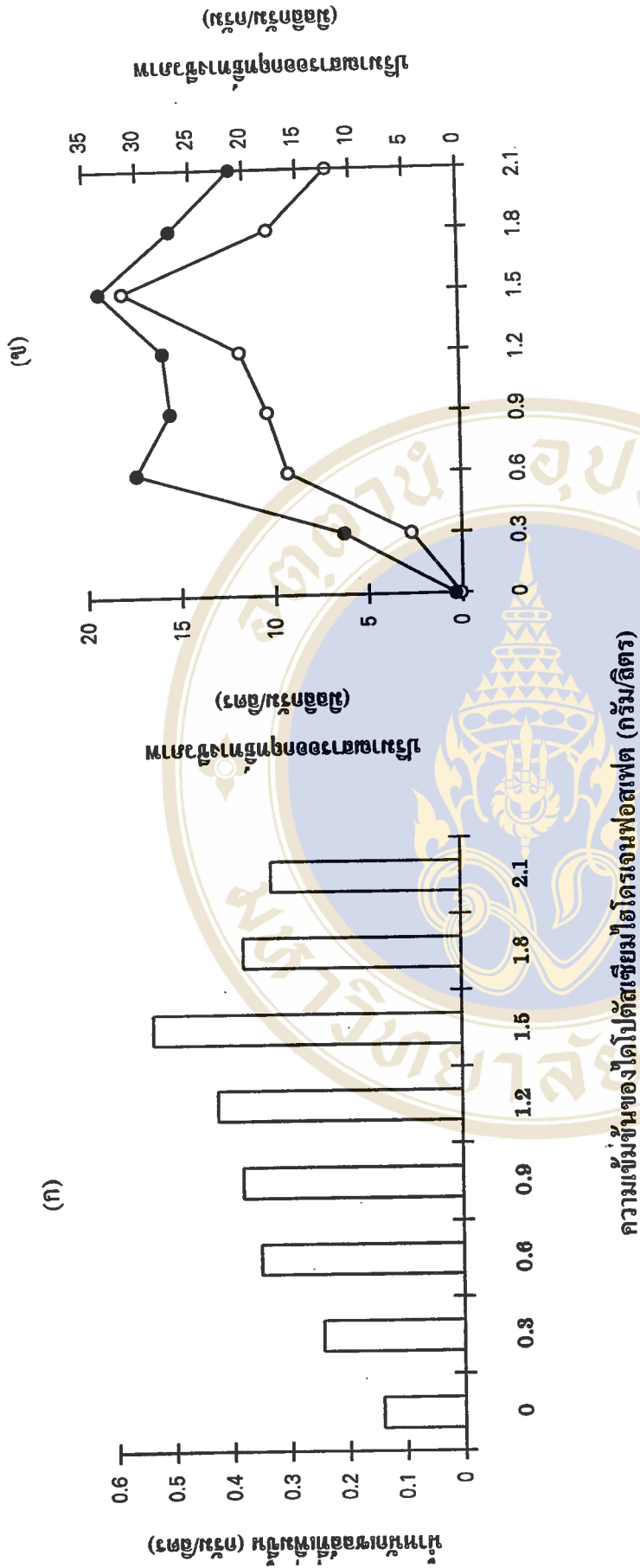
ภาพที่ 10 ผลของความเข้มข้นของไซโตมโนเตรต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Calothrix* sp. TISTR 8913 เมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมไซโตมโนเตรความเข้มข้นต่างๆ ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 14 วัน

(ก) การเจริญของสาหร่ายซึ่งตรวจวัดโดยชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์

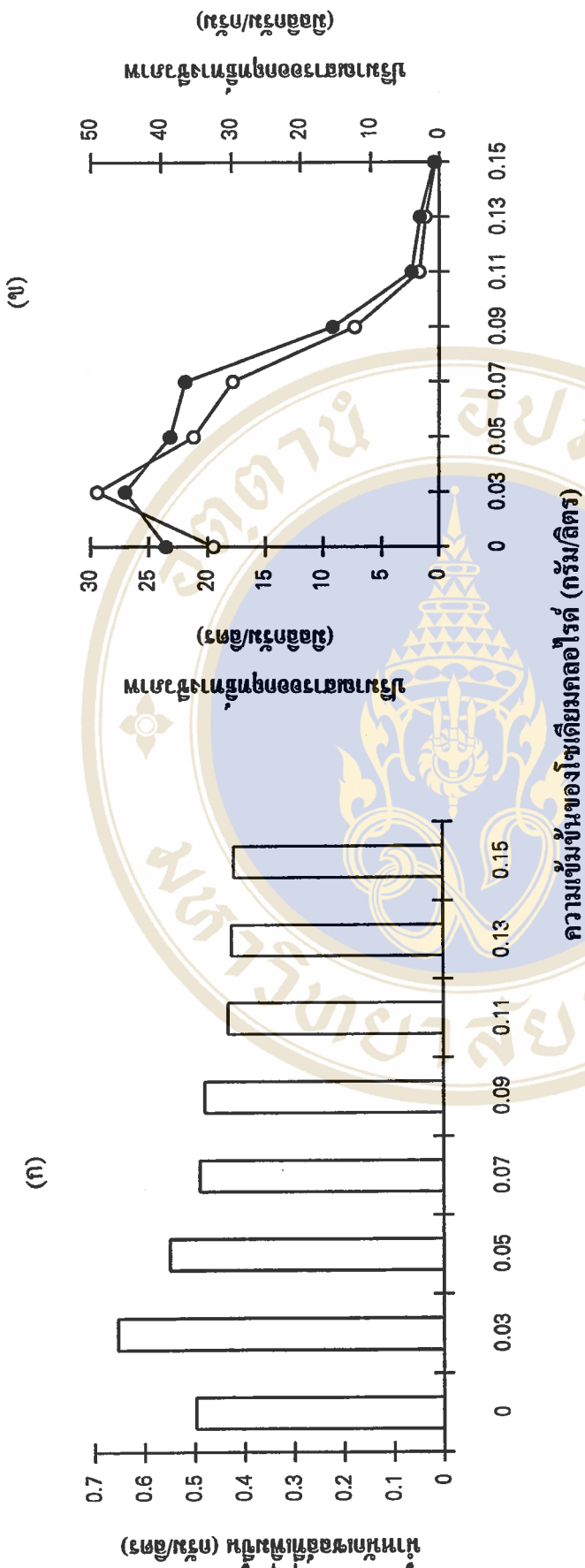
(ข) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

(๑) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหน่วยปริมาตร

(๒) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย

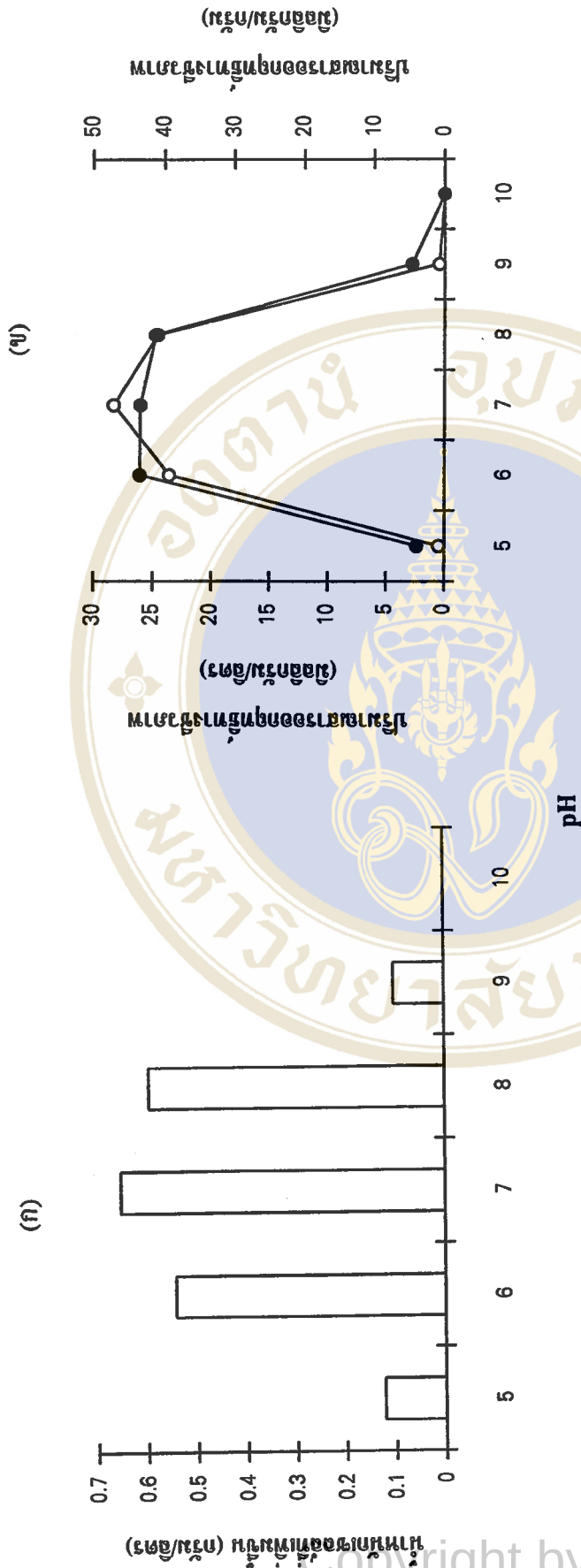


ภาพที่ 11



ภาพที่ 12 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ Calothrix sp. TISTR 8913 เมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA ซึ่งตัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนด์ในอัตรา 1.5 กรัมต่อลิตร เติบโตได้ดีในอัตรา 1.5 กรัมต่อลิตร ตั้งบนเครื่องฆ่าความเร็รรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 14 วัน

- (ก) การเจริญของสาหร่ายซึ่งตรวจวัดโดยซึ่งน้ำหนักแห้งของเซลล์
- (ข) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
- (ค) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหน่วยปริมาตร
- (ง) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สำหรับ



ภาพที่ 13 ผลของค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Calothrix* sp. TISTR 8913 เมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA ซึ่งตัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 1.5 กรัมต่อลิตร เติมน้ำได้โปรตีนไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร เติมน้ำโซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-เบสต่างๆ ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 14 วัน

(ก) การเจริญของสาหร่ายซึ่งตรวจวัดโดยตั้งน้ำหมักแห้งของเซลล์

(ข) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

(ค) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหน่วยปริมาตร

(ง) ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้น้ำหมักแห้งของเซลล์สาหร่าย

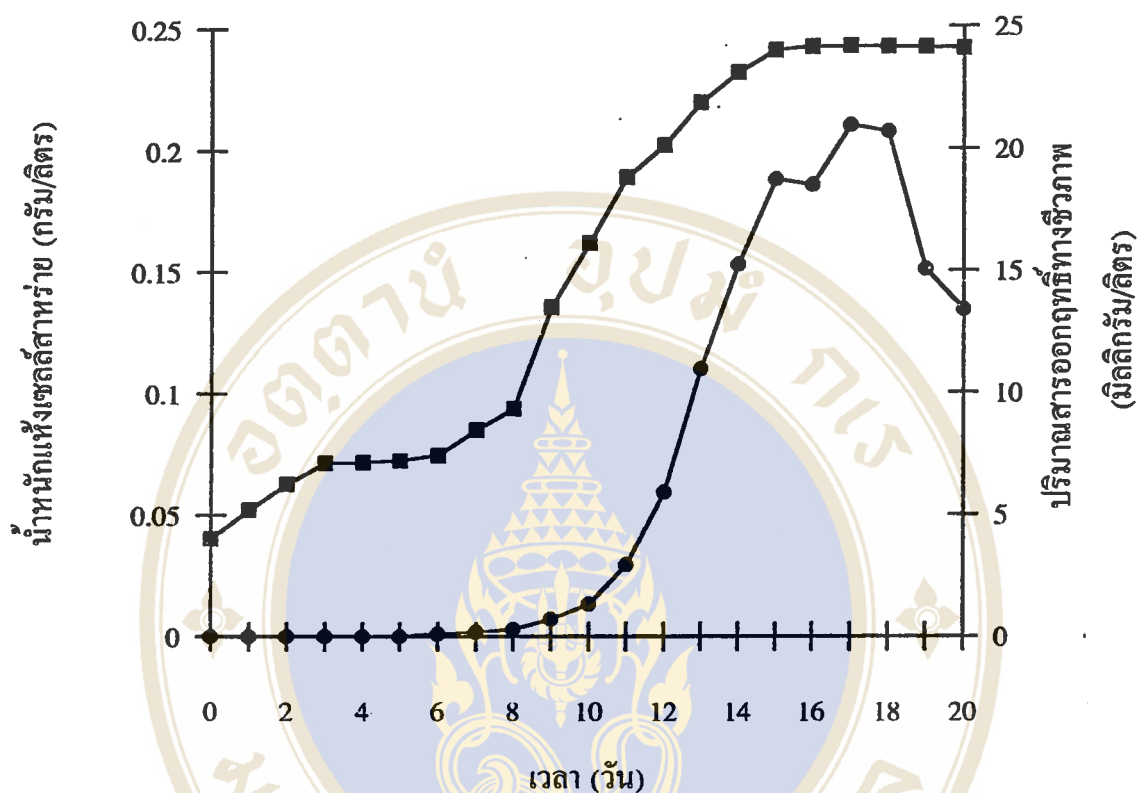
ตารางที่ 10 สูตรอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8913

สภาวะ ¹	NaNO ₃	K ₂ HPO ₄	NaCl	pH	การเจริญของสาหร่าย ²		การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ³	
	(กรัม/ลิตร)	(กรัม/ลิตร)	(กรัม/ลิตร)		(กรัม/ลิตร)	(กรัม/ลิตร)	(มิลลิกรัม/ลิตร)	(มิลลิกรัม/กรัม)
สูตรอาหารเดิม (BGA)	0.0	0.6	0.07	7.0	0.33		2.93	8.8
สูตรดัดแปลง (modified BGA)	1.5	1.5	0.03	7.0	0.65		28.32	43.41

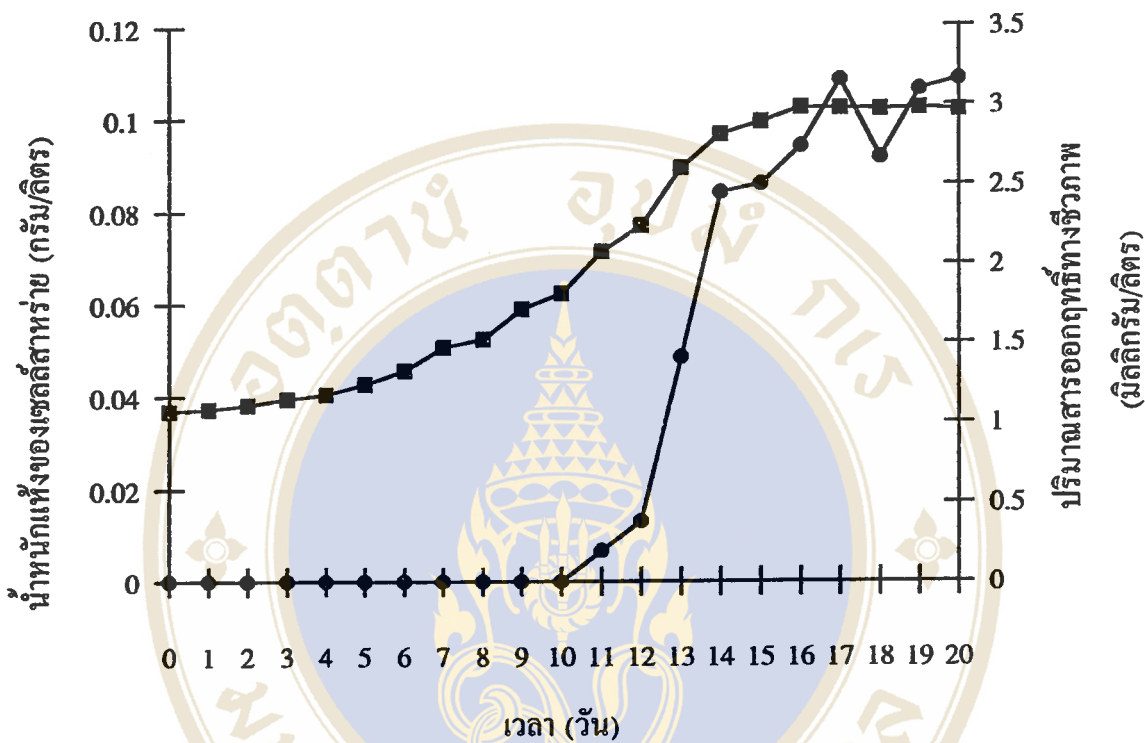
¹ : เลี้ยงสาหร่ายในขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 30 ° ซ ให้แสงที่อัตรา 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

² : ตรวจสอบการเจริญของสาหร่ายในวันที่ 14 ของการเลี้ยงในรูปของน้ำหนักแห้งของเซลล์

³ : ตรวจสอบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในวันที่ 14 ของการเลี้ยง และแสดงในรูปของน้ำหนักมิลลิกรัมเทียบเท่ากับ cycloheximide



ภาพที่ 14 ช่วงเวลาของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ซึ่งเลี้ยงในถังคาร์บอนที่บรรจุอาหาร BGA ดัดแปลง ฟัน 5% คาร์บอน ไดออกไซด์ในอากาศอัตรา 1,000 มิลลิตรต่อนาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$



ภาพที่ 15 ช่วงเวลาของการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 เมื่อขยายการผลิตในถังคาร์บอนที่บรรจุอาหาร BGA พ่น 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

3.1.5. การศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ในจานเลี้ยงเชื้อ

โดยแบ่งความเข้มข้นของสารสกัดเป็นระดับต่างๆ ตั้งแต่ 10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร จนถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ทดสอบกับเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และแสดงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบเท่ากับ ความเข้มข้นของ cycloheximide จากตารางที่ 11 จะพบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 20 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรขึ้นไปจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัด 20 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรนี้จะให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบเท่ากับ cycloheximide ที่ความเข้มข้น 5.90 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร

4.2 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในถั่วเหลือง

4.2.1. การศึกษารูปแบบของสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองในจานเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12 และภาพที่ 16 จากการทดลองโดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด มาปรับให้อยู่ในรูปแบบต่างๆ คือ รูปแบบที่ผสมกับผงแป้ง รูปแบบที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิว และรูปแบบที่ละลายในเมทานอล เปรียบเทียบกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราแมนโคเซบในอัตราที่แนะนำ คือ 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด และปลูกเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่ความเข้มข้น 1,000 สปอร์ต่อเมล็ด พบว่า การใช้สารสกัดในรูปแบบที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิวจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองดีเท่ากับการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา แมนโคเซบ คือการทดลองที่ใช้สารสกัดในรูปแบบที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิวจะให้จำนวนต้นกล้าที่ปกติ 9.15 ต้น และการทดลองที่ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราแมนโคเซบ จะให้จำนวนต้นกล้าที่ปกติ 9.50 ต้น ซึ่งจากการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test พบว่า ทั้ง 2 การทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวช่วย ทำให้สารสกัดสามารถแผ่กระจายทั่วผิวเมล็ด

ส่วนสารสกัดในรูปแบบที่ละลายในเมทานอล จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา รองลงมา คือให้จำนวนต้นกล้าของถั่วเหลืองที่ปกติ 8.05 ต้น แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างค่า

ตารางที่ 11 การศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. truncatum* ในงานเลี้ยงเชื้อ

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ * (ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร)
10	-
20	5.90
30	7.61
40	9.80
50	12.63
60	16.27
70	20.97
80	27.02
90	34.82
100	44.86
200	57.81
300	74.49
400	95.98
500	123.68
600	159.37
700	205.35
800	264.61
900	340.96
1,000	439.34

* แสดงในปริมาณเทียบเท่ากับ cycloheximide

ตารางที่ 12 การศึกษารูปแบบสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองในจานเลี้ยงเชื้อ

การทดลอง	ต้นกล้าที่ปกติ ¹
เมล็ด + เชื้อรา ³	0 a ²
เมล็ด + ผงแป้ง ⁴ + เชื้อรา	0 a
เมล็ด + เมทานอล + เชื้อรา	0 a
เมล็ด + สารลดแรงตึงผิว ⁵ + เชื้อรา	0 a
เมล็ด + สารสกัด ⁶ (ผงแป้ง) + เชื้อรา	0.9750 b
เมล็ด + สารสกัด (เมทานอล) + เชื้อรา	8.0500 c
เมล็ด + สารสกัด (สารลดแรงตึงผิว) + เชื้อรา	9.1500 d
เมล็ด + แมนโคเซบ ⁷ + เชื้อรา	9.5000 d

¹ : ค่าเฉลี่ยจาก 40 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด

² : การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน จะมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

³ : เชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่ความเข้มข้น 1,000 สปอร์ต่อเมล็ด

⁴ : ผงแป้ง อัตรา 0.12 กรัมต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร

⁵ : สารลดแรงตึงผิว ใช้ในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อสารสกัด 1 ลิตร

⁶ : สารสกัดที่ความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด (สารสกัด 100 มิลลิกรัม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบเท่า cycloheximide 43.9 มิลลิกรัม)

⁷ : สารป้องกันกำจัดเชื้อราแมนโคเซบ ที่อัตรา 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด (อัตราแนะนำ)



ภาพที่ 16 การศึกษารูปแบบของสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลือง โดยสารสกัดในรูปแบบที่ผสมสารลดแรงตึงผิวจะให้ผลดีที่สุด

เฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test พบว่า มีความแตกต่างจากการใช้สารสกัดผสมกับ สารลดแรงตึงผิว สำหรับการใช้สารสกัดผสมกับผงแป้งนั้นพบว่าเมล็ดส่วนใหญ่มีการติดเชื้อสูง บางเมล็ดไม่งอก เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก การที่ปลวกเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สู่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนหน้านี้ เชื้อราจะเข้าไปอาศัยอยู่ในชั้น hourglass ของเปลือกหุ้มเมล็ด ซึ่งจะให้ ธาตุอาหารแก่จุลินทรีย์ (72) เมื่อมีการให้สารสกัดในรูปแบบที่ผสมผงแป้ง ผงแป้งอาจไปห่อหุ้มทำให้ สารสกัดแพร่ออกมาได้ช้าไม่ทันต่อการเจริญของเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้ จึงมีการติดเชื้อสูง ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดในรูปแบบที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิว เพื่อใช้ในการ ทดสอบขั้นต่อไป

4.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองในงานเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 13 และภาพที่ 17 จากการทดลองโดยแบ่งความ เข้มข้นของสารสกัดเป็นระดับต่างๆกัน ตั้งแต่ 550 600 650 700 750 800 และ 850 ไมโครกรัมต่อเมล็ด พบว่า การเพิ่มปริมาณสารสกัดต่อเมล็ดมากขึ้นจะทำให้จำนวนต้นกล้าของถั่ว เหลืองที่ปกติเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จนถึงที่ความเข้มข้นของสารสกัด 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ขึ้นไปจำนวนต้นกล้าที่ปกติจะเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และความเข้มข้นของสารสกัด ที่ 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ดขึ้นไปนั้นให้จำนวนต้นกล้าของถั่วเหลืองที่ปกติ ไม่แตกต่างอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ ดังนั้น จึงเลือกใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ในการทดสอบกับต้นถั่วเหลืองอุ้งเพาะกล้าต่อไป

4.2.3 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนต้นถั่วเหลืองในอุ้งเพาะกล้า

การทดสอบสารสกัดในการยับยั้งเชื้อราบนถั่วเหลืองในอุ้งเพาะกล้า จะใช้ดิน ปลุกที่หนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นและแบ่งวิธีการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* เป็น 2 แบบ คือ หยอดเชื้อลงบนเมล็ดและคลุกเชื้อรากับดินปลูก ผลการทดลองแสดง ดังตารางที่ 14 และภาพที่ 18 พบว่า ในการทดลองแบบหยอดเชื้อราลงบนเมล็ดถั่วเหลืองนั้น ในชุด ควบคุมจะมีต้นกล้าที่ปกติเฉลี่ย 0.20 ต้น สำหรับในกลุ่มที่มีการหยอดสารสกัดนั้น พบว่า จะมี ต้นกล้าที่ปกติเฉลี่ยเพิ่มเป็น 3.15 ต้น ส่วนในกลุ่มที่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราเพื่อเปรียบเทียบ นั้นพบว่า จำนวนต้นกล้าที่ปกติเฉลี่ยเพิ่มเป็น 3.50 ต้น ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 18 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา
Colletotrichum truncatum บนเมล็ดถั่วเหลืองในงานเลี้ยงเชื้อ

การทดลอง	จำนวนต้นกล้าที่ปกติ ¹
เมล็ด + รา ²	0.30 a ³
เมล็ด + สารสกัด ⁴ 550 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + รา	4.50 b
เมล็ด + สารสกัด 600 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + รา	7.00 c
เมล็ด + สารสกัด 650 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + รา	7.50 cd
เมล็ด + สารสกัด 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + รา	8.80 e
เมล็ด + สารสกัด 750 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + รา	8.90 e
เมล็ด + สารสกัด 800 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + รา	8.95 e
เมล็ด + สารสกัด 850 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + รา	9.05 e
เมล็ด + แมนโคเซบ 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด + รา	9.20 e

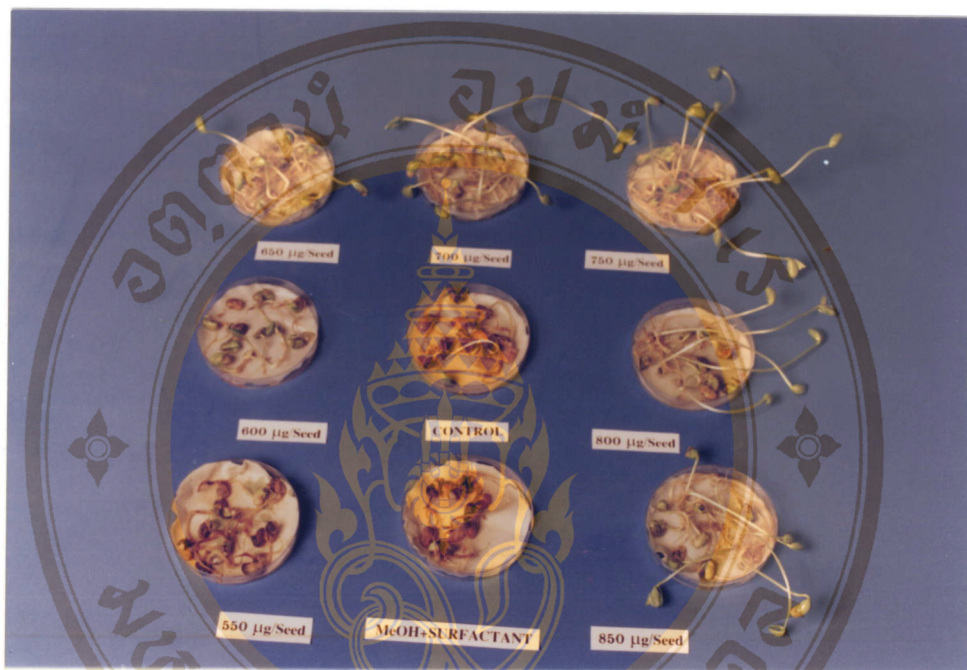
¹ : ค่าเฉลี่ยจาก 40 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด

² : เชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่อัตรา 1,000 สปอร์ต่อเมล็ด

³ : การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน จะมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

⁴ : สารสกัดในรูปแบบที่ผสมสารลดแรงตึงผิว ในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อลิตร

⁵ : สารป้องกันกำจัดเชื้อราในอัตราที่แนะนำ



ภาพที่ 17 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองในงานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้เลือกสารสกัดที่ความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 14 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองในถุงเพาะกล้า

การทดลอง	ค่าเฉลี่ยต้นกล้าที่สมบูรณ์ ¹	
	คลุกเชื้อรากับดิน ²	หยดราบนเมล็ด ³
เมล็ด + รา	0.15 a ⁴	0.20 a
เมล็ด + สารสกัด ⁵ + รา	3.00 b	3.15 b
เมล็ด + แมนโคเซบ ⁶ + รา	3.80 c	3.50 b

¹ : ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ ซ้ำละ 5 เมล็ด

² : คลุกเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ความเข้มข้น 10⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร กับดินที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อดิน 1 กรัม (1,000 สปอร์ต่อกรัม)

³ : เชื้อรา *Colletotrichum truncatum* อัตรา 1,000 สปอร์ต่อเมล็ด

⁴ : การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan's multiple range test ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน จะมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

⁵ : สารสกัดความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ดในรูปแบบที่ผสมสารลดแรงตึงผิวในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อลิตร

⁶ : สารป้องกันกำจัดเชื้อราในอัตราที่แนะนำ



ภาพที่ 18 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนต้นถั่วเหลือง ในถุงเพาะกล้า

ด้วย Duncan's multiple range test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ใช้สารสกัด จึงอาจถือได้ว่าลักษณะการปลูกเชื้อราแบบหยดบนเมล็ดซึ่งถือให้เป็นลักษณะของเชื้อที่ติดมากับเมล็ดเช่นนี้ สารสกัดจะให้ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองได้ใกล้เคียงกับสารเคมี

สำหรับการทดลองในรูปแบบที่ปลูกเชื้อราโดยวิธีคลอสปอร์ของเชื้อรากับกับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พบว่า ในชุดควบคุมนั้นมีต้นกล้าที่ปกติเฉลี่ย 0.15 ต้น ส่วนในกลุ่มที่มีการหยดสารสกัดพบว่า จะมีต้นกล้าที่ปกติเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 3.00 ต้น และในกลุ่มที่ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราคลอกลูเมตพบว่าจำนวนต้นกล้าปกติเพิ่มขึ้นเป็น 3.80 ต้น ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มของต้นถั่วที่ใช้สารสกัดและกลุ่มของต้นถั่วที่ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา จึงอาจถือได้ว่าลักษณะการปลูกเชื้อราแบบคลอกลูเมต ซึ่งถือให้เป็นลักษณะของเชื้อราที่ติดมากับดินเช่นนี้ สารสกัดจะให้ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ระดับหนึ่ง แต่ยังด้อยกว่าการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา

4.3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913

4.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8913

คุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารที่ศึกษา ได้แก่ คุณสมบัติด้านความคงตัวของสารในสภาพความเป็นกรด-เบสต่างๆ กัน และความคงตัวของสารที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ โดยใช้สารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8913 ในตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีดังนี้

4.3.1.1 ความคงตัวของสารในสภาพความเป็นกรด-เบสต่างๆ

เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-เบส ของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8913 ให้มีค่าความเป็นกรด-เบส ตั้งแต่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 นำ

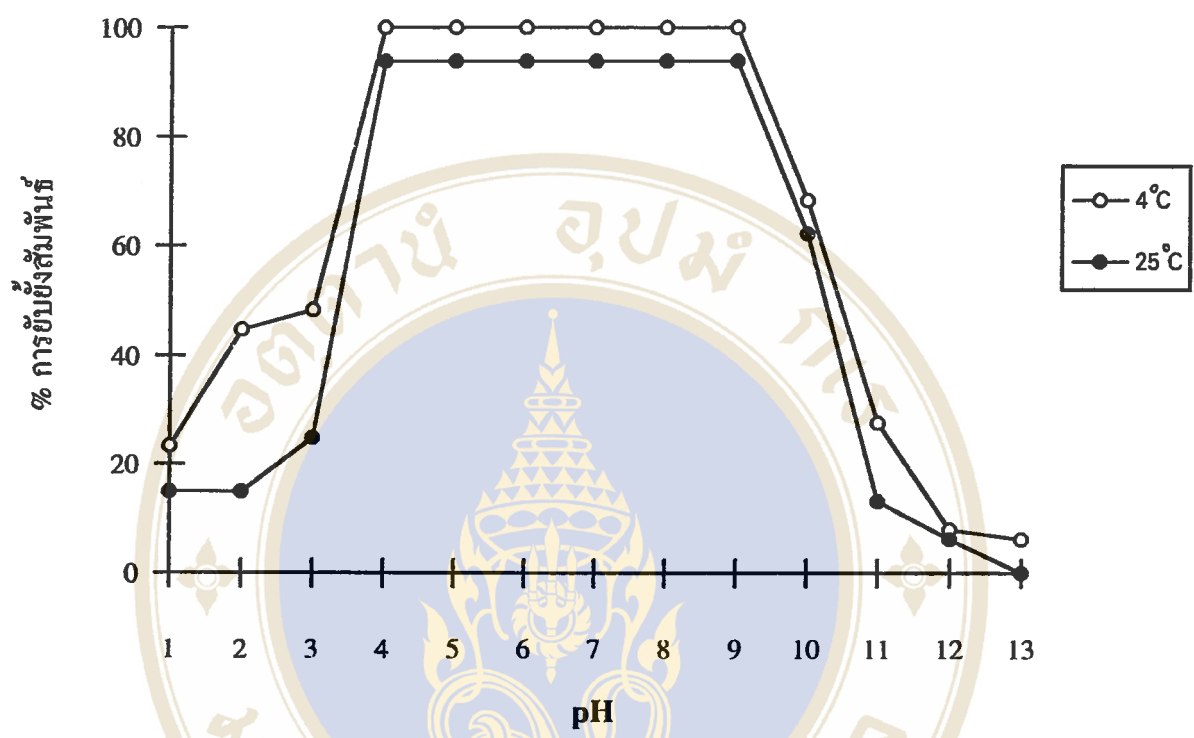
ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 19 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงความเป็นกรด-เบส ตั้งแต่ 4 ถึง 9 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีความคงตัวสูง โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์เท่ากับ 100 ส่วนที่ค่าความเป็นกรด-เบส ต่ำกว่า 4 พบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์ลดลง เหลือน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นกรด-เบส สูงกว่า 9 พบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์ลดลงเหลือน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า ในช่วงความเป็นกรด-เบส 4 ถึง 9 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์สม่ำเสมอที่ 94 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ค่าความเป็นกรด-เบส ต่ำกว่า 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์ลดลง เหลือน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ค่าความเป็นกรด-เบส สูงกว่า 9 พบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงเหลือน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นเบส 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะลดลงเป็น 0 จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากสาหร่ายนี้ จะไม่คงตัวอย่างมากในสภาพที่สารละลายมีความเป็นกรดหรือเป็นเบสมากๆ และจะมีความคงตัวอย่างมากที่ค่าความเป็นกรด-เบส 4 ถึง 9 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากสาร scytonemin X (35) ซึ่งสาร scytonemin X จะมีความคงตัวในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส 7 ถึง 9 ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส

4.3.1.2 ความคงตัวของสารที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

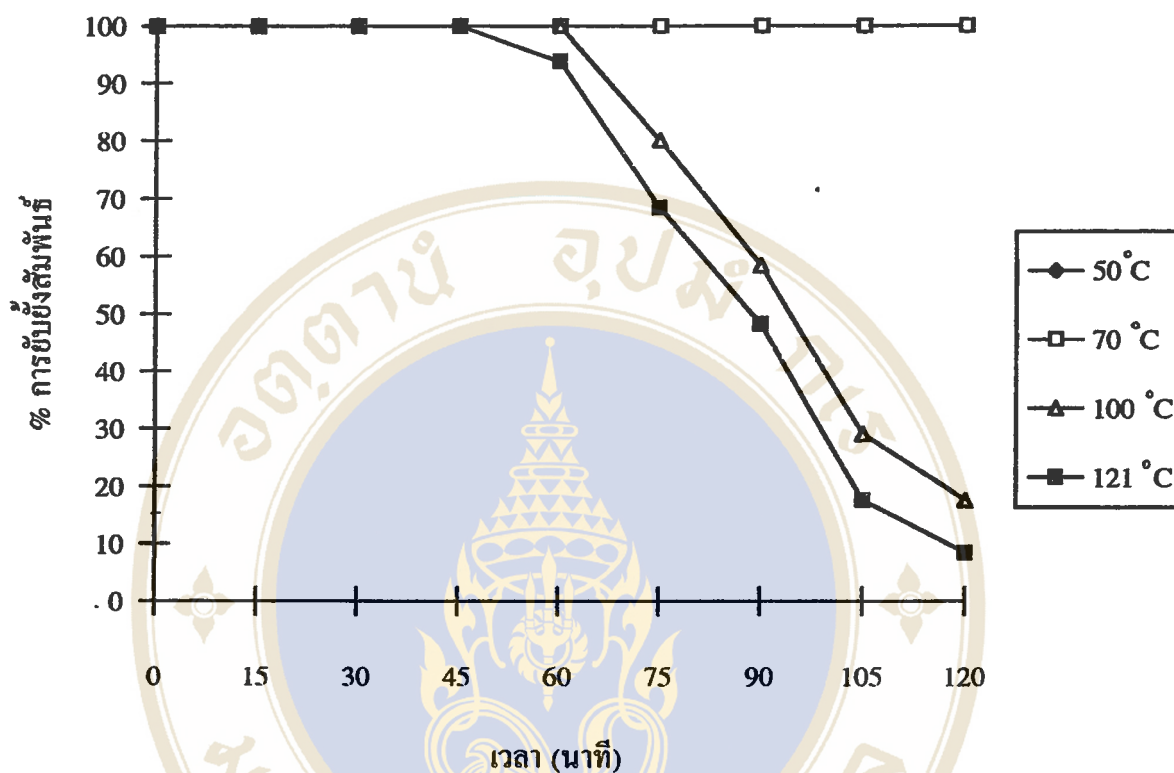
จากการศึกษาความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่อุณหภูมิ 50 70 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 20 ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีความคงตัวมากกว่า 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีความคงตัวเป็นเวลา 60 นาที และพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์จะลดลงเหลือ 17 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนั้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีความคงตัวเป็นเวลา 45 นาที และเมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที จะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์คงเหลือ 7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์ลดลง

4.3.2 การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่ผลิตโดยสาหร่าย

Calothrix sp. TISTR 8913 ออกจากสิ่งเจือปน (impurity) โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโทกราฟี



ภาพที่ 19 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ในสภาพความเป็นกรด-เบสต่างๆ ในรูปเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์กับตัวควบคุมที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่า 439.34 ไมโครกรัม/20 ไมโครลิตร



ภาพที่ 20 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ ในสภาพที่เป็นกลาง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แสดงในรูปเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพันธ์กับตัวควบคุมที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากการใช้วิธีชิลิกาเจลทินแลเซอร์ โครมาโทกราฟี พบว่าสารละลายผสมของ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 7 : 3 : 1 เป็นระบบที่เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และจากการตรวจหาตำแหน่งของสารด้วยวิธีอโตไบโอกราฟี พบว่า ค่า R_f ของ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้เมื่อใช้สารผสมดังกล่าว เท่ากับ 0.61 และ 0.65

4.3.2 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1) การทดสอบด้วยน้ำยาเคมีต่างๆ

จากการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผ่านกรรมวิธีชิลิกาเจลทินแลเซอร์ โครมาโทกราฟีเพื่อแยกจากสิ่งเจือปนแล้ว มาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ ninhydrin reaction, biuret test, Fehling test, Molisch's test, anthrone test พบว่าทุกการทดสอบให้ผลลบ (negative) ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่มีความซับซ้อนในด้านโครงสร้าง จึงไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมีเหล่านี้ได้

2) การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธีย่อยด้วยเอนไซม์

จากการย่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ คือ โปรติเอส อะไมเลส ไลเปส พบว่าขนาดของบริเวณยับยั้งในชุดควบคุมและชุดที่มีการย่อยสารด้วยเอนไซม์มีขนาดเท่ากัน แสดงว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ได้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆที่ทำการทดสอบเลย จึงไม่สามารถชี้ชัดได้ว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารประเภทใด

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทาง
ชีวภาพจาก *Calothrix* sp. TISTR 8913

วิธีการทดสอบ	ผลการทดลอง
ninhydrin reaction	negative
biuret reaction	negative
Molisch's test	negative
anthrone test	negative
unsaturation test	negative
การย่อยสารด้วยเอนไซม์ protease	negative
การย่อยสารด้วยเอนไซม์ lipase	negative
การย่อยสารด้วยเอนไซม์ amylase	negative

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 จากการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากจำนวนสาหร่ายทั้งหมด 11 สกุล 161 สายพันธุ์ พบว่ามีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งหมด 13 สายพันธุ์ หรือร้อยละ 8.07 แสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา และสามารถคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Calothrix* sp. TISTR 8913 ซึ่งสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อราได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Colletotrichum truncatum* *Fusarium oxysporum* และ *Macrophomina phaseolina* และเมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายดังกล่าวมาหาความกว้างขวางในการยับยั้งเชื้อรา พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราได้อีก 6 สายพันธุ์

5.1.2 เมื่อนำสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ในสภาพการตรึงไนโตรเจน โดยใช้อาหารเลี้ยง BGA เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สาหร่ายดังกล่าวจะมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดในวันที่ 14 ของการเลี้ยง

5.1.3 จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสม พบว่า สาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 จะสามารถเพิ่มน้ำหนักของเซลล์และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร BGA ดัดแปลง โดยมีการเติมโซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร เติมโคโคปัสเตียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 1.5 กรัมต่อลิตร ลดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ลงเหลือ 0.03 กรัมต่อลิตร และ pH เริ่มต้น 7.0 โดยจะสามารถเพิ่มน้ำหนักเซลล์ได้ 2 เท่า และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น 9 เท่า

5.1.4 จากการขยายการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 ในอาหาร BGA ดัดแปลง ปริมาตร 10 ลิตร ที่บรรจุอยู่ในถังคาร์บอนปริมาตร 12 ลิตร ฟัน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ อัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่า สาหร่ายจะเริ่มมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในช่วงแรกของระยะ exponential phase คือวันที่ 7 ของการเลี้ยง ส่วนการเลี้ยงด้วยอาหาร BGA ในสภาพเดียวกัน พบว่าสาหร่ายดังกล่าวจะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพช้ากว่าการเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BGA ดัดแปลง คือ เริ่มผลิตเมื่อวันที่ 11 ของการเลี้ยง

สำหรับในด้านน้ำหนักเซลล์ และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า การเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BGA คัดแปลง จะให้น้ำหนักเซลล์สาหร่ายมากกว่าการเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BGA 2.4 เท่า และให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าสูตรอาหาร BGA 6.6 เท่า

5.1.4 ความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Calothrix* sp. TISTR 8913 ที่ 20 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณ cycloheximide ที่ 5.90 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc plate โดยปลูกเชื้อราที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

5.1.5 เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองพบว่า สารสกัดในรูปแบบที่ผสมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ด จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เมื่อปลูกเชื้อราที่ความเข้มข้น 1,000 สปอร์ต่อเมล็ด โดยให้ผลการยับยั้งไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมีแมนโคเซบ ที่อัตรา 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด (อัตราแนะนำ) และเมื่อนำสารสกัดในรูปแบบและความเข้มข้นดังกล่าวมาศึกษาเกี่ยวกับถั่วเหลืองในถุงเพาะกล้า พบว่าเมื่อใช้วิธีการปลูกเชื้อราแบบหยดราลงบนเมล็ด ซึ่งถือเป็นลักษณะเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดนั้น จะให้จำนวนต้นกล้าเฉลี่ยที่ปกติของถั่วเหลือง ไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมีแมนโคเซบ และเมื่อใช้วิธีการปลูกเชื้อราแบบคลุกดิน ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะของเชื้อราที่อยู่ในดินนั้น พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีระดับหนึ่งแต่ยังด้อยกว่าสารเคมีแมนโคเซบ

5.1.6 จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารจะมีความคงตัวต่อสภาพความเป็นกรด-เบส ตั้งแต่ 4 ถึง 9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส นานกว่า 2 ชั่วโมง และมีความคงตัวที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และคงตัวที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

5.1.7 เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโทกราฟี พบว่า ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสาร คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ในอัตรา 7 : 3 : 1 และตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ที่ R_f 0.61 และ 0.65

5.1.8 เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าทุกการทดสอบให้ผลลบ เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนไม่สามารถทดสอบคุณสมบัติได้โดยวิธีการต่างๆเหล่านี้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp.TISTR 8913 ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสควรใช้ในรูปแบบการเคลือบเมล็ด เนื่องจากสามารถควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดได้ แต่ควรมีการทำความสะอาดแปลงปลูกให้ปราศจากเชื้อราสาเหตุโรค เนื่องจากสารสกัดนั้นควบคุมเชื้อราที่อยู่ในดินได้ไม่ดีเท่าสารเคมี

5.2.2 ควรมีการศึกษาการผลิตสาหร่ายให้ได้ปริมาณมากในบ่อเลี้ยงขนาดใหญ่ (out door agitation pond) เพื่อให้ได้สาหร่ายปริมาณมาก และวิธีการ รวมทั้งเครื่องมือสำหรับสกัดสารโดยใช้ระยะเวลารวดเร็ว

5.2.3 ควรมีการตรวจสอบคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพว่ามีสารประเภทใดเป็นองค์ประกอบ และศึกษาสูตรโครงสร้างของสารอย่างละเอียดเพื่อการพัฒนาในขั้นต่อไป

5.2.4 เพื่อความถูกต้อง และยืนยันผลการทดลองให้แน่นอน ควรมีการศึกษาและใช้งานจริงในแปลงทดลอง และเปรียบเทียบกับแปลงที่ทำการเกษตรในหลายๆ พื้นที่ โดยให้มีตัวแปรของ ดิน ลม อากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ และอุณหภูมิเข้ามาเกี่ยวข้อง

5.2.5 เพื่อความเป็นไปได้ต่อการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกร ควรมีการศึกษาถึงต้นทุนค่าใช้จ่ายในการผลิตสารและการนำไปใช้

5.2.6 ควรรนำสารสกัดไปทดสอบการยับยั้งเชื้อราอื่น กับพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ

บรรณานุกรม

1. กาญจนภาชน์ ลีวโนมนต์. 2527. สำหรับ. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 343 หน้า
2. กลุ่มเกษตรสัญจร. 2531. ถั่วเหลือง. พิมพ์ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์มิตรสยาม. 64 น.
3. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2538. สถิติการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช. กรมวิชาการ เกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. น. 18
4. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2535. เอกสารวิชาการคู่มือการป้องกันและกำจัดโรคพืชด้วยสารเคมี ปี 2535 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
5. ข้อมูลการผลิตและการตลาดถั่วเหลือง. 2537. เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 447, ศูนย์สถิติ การเกษตร สำนักงานสถิติการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
6. จันทรเพ็ญพร อนุศาสนี. 2538. การใช้สารสกัดจากใบพลูพื้นเมืองควบคุมโรคแอนแทรกส ในสในถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีที่ เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. 79 น.
7. ชูติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา. 2526. โรคแอนแทรกสนของถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 72 น.
8. ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอ. เอส. พรินติ้งเฮ้า. 191 หน้า.
9. ธรรมศักดิ์ สมมาตรย์. 2528. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช พิมพ์ครั้งที่ 2 กลุ่มหนังสือ เกษตร น. 49-67

10. ประเทือง สง่าวงศ์. 2515. เอกสารวิชาการเรื่องโรคของถั่วเหลือง. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
11. ภัทรา อาชวะสมิต และคณะ. 2531. เอกสารผลการวิจัยเรื่องการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองและโรคอื่นๆ บางชนิด กลุ่มงานวิจัยโรคพืชน้ำมัน กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
12. ยุวดี พืชรพิศาล. 2538. สหรัย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
13. สมภาค สิทธิพงศ์, เอียน ศิลาชัย, ทวี เก่าศิริ และอนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2527. สารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพบางชนิด วารสารโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 10 เล่มที่ 1 : 20-22
14. สมศิริ แสงโชติ. 2529. โรคพืชเบื้องต้น บทปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
15. อภารัตน์ มหาจันทร์. 2539. สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 (มกราคม-เมษายน) น. 39-53
16. Agrios, G. N. 1969. Plant Pathology. Academic Press, N.Y. 629 p.
17. Arun K. Mira. 1986. Antibiotics as crop protectants. *Am. Chem. Soc.* 108 : 49-60.
18. Barchi, J. J. Jr, R. E. Moore and G. M. L. Patterson. 1984. Acutiphycin and 20,21-didephydroacutiphycin, new antineoplastic agents from the cyanophytes *Oscillatoria acutissima* . *J. Am. Chem. Soc.* 106 : 8193-7.

19. Barchi, J.J.Jr., T. R. Norton, E. Furusawa, G.M.L. Patterson , R. E. Moore. 1983.
Identification of cytotoxin from *Tolypothrix byssoides* as tubercidin.
Phytochemistry 22 : 2851-2.
20. Bloor, S. and R R. England. 1989. Antibiotic Production by the cyanobacterium
Nostoc muscorum . *J. Appl. Phyco.* 1 : 367-372.
21. Bold, H. C. and M.J. Wynne. 1978. Introduction to the algae. Prentice-Hall, Inc.,
Englewood Cliffs, New Jersey. 706 p.
22. Borris, V. G A. A. Vepritskiy, N. N. Titova, Kira A. Mamkayeva and Olga V. 1991.
Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892
(cyanobacterium). *J. Appl. Phycol* 3 : 55-59.
23. Cannel, R.J.P., S. J. Kellam, A.M. Owsianka and J. M. Walker. 1987. Microalgae and
cyanobacteria as a source of glycosidase inhibitors. *J. of Gen. Micro.* 133(7) : 1701-5
24. Cardellina, I I J H, D. Dalietos , F.J. Marner , J.S. Mynderse and R E. Moore.
1978. (-)- Trans-7(s)-methoxytetradec-4-enoic acid and related amides from the
marine cyanophyte *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry.* 17 : 2091-5.
25. Cardellina, I I J H , F. J. Marner and R. E. Moore. 1979b. Malyngamide A. a
novel chlorinated metabolite of the marine cyanophyte *Lyngbya majuscula*.
J. Am. Chem. Soc. 101 : 240-2.
26. Cardellina, I I J H , R. E. Moore, E. V. Arnold and J. Clardy. 1979c. Structure and
absolute configuration of malyngolide, an antibiotic from the marine
blue-green alga *Lyngbya majuscula*. *Gomont. J. Org. Chem.* 44 : 4039-42.
27. Carmichael, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J.*

Appyl. Bact. 72 : 445-459.

28. Carmichael, W. W. 1982. Chemical and toxicological studies of the toxic freshwater cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*. *S. Afr. J. Sci.* 78 : 376-72.
29. Carmichael, W. W., Biggs D F and Peterson M A. 1979. Phamacology of anatoxin a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44.1. *Toxicon.* 17 : 229-36.
30. Carr, N. G. and B. A. Whitton. 1973. *The Biology of the Blue-green Algae.* Univ. Calif. Press, Berkeley. 676 p.
31. Carter, D. C., R. E. Moore, J. S. Mynderse, W. P. Niemczura and J. S. Todd. 1984. Structure of majusculamide C, a cyclic depsipeptide from *Lyngbya majuscula*. *J. Org. Chem.* 49 : 236-41.
32. Chang, I. Kommedahl. 1968. Biological control of seedling blight of corn by coating blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *J. of Phytopath.* 58 : 8
33. Chapman, V. J. and D. J. Chapman. 1975. *The algae.* The Macmillan Press, Ltd., London.
34. Chmel, H., and D. B. Loria 1980. Antifungal antibiotics : mechanism of action, resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids, In Lorian V (ed), *Antibiotic in laboratory medicine*, Academic Press, New York.
35. Chetsumon A., Fujieda K., Hirata K., Yagi K. and Miura Y. 1993. Optimization of antibiotic production by the cyanobacterium *Scytonema* sp. TISTR 8208 immobilized on polyurethane foam. *J. Appl. Phycol.* 5 : 615-622.

36. Cresswell, R.C., T.V.A. Rees and N. Shah. 1989. *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Bath Press, Great Britain.
37. Crowe, A. and A. Crowe. 1969. *Mathematic for Biologist*. New York : Academic Press.
38. Dakhama, A., J de la Noue and M.C. Lavoie. 1993. Isolation and Identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Appl. Phyco*. 5 : 297-306.
39. Elisabeth M. Gross, C. Peter Wolk and Friedrich Juttner. 1991. Fischerellin, A new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. *J. Phycol.* 27 : 686-692.
40. Ellis, M.A., M.B. Ilyas and J.B. Sinclair. 1975. Effect of three fungicides on internally seed-borne fungi and germination of soybeans seed. *Phytopathology*. 65 : 553-556.
41. Ellis, M.A., and J.B. Sinclair. 1975. Movement of methyl 2-benzimidazolecarbamate into soybean seeds from foliar application of benomyl. *Phytopathology*. 65 : 1387-1389.
42. Flint, L.H. and C.F. Moreland. 1946. Antibiosis in the blue-green algae. *Am. J. Bot.* 33 : 218 quoted to Chetsumon, A. 1993. Production of a novel antibiotic “scytonemin X”, by immobilized cyanobacterial cells in a seaweed- type photobioreactor. Ph.D. thesis, Osaka Univ., Osaka.
43. Florence K. Gleason and Deborah E. Case. 1986. Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on Angiosperms. *Plant. Physio*. 80 : 834-837.

44. Gerwick W H, Reyes S and Alvarado B. 1987. Two malyngamides from the caribbean cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*. 26 : 1701-4.
45. Hepperly, P.R., J.S. Mignucci and J.B. Sinclair. 1981. The microorganisms of stored soybean seeds. International Agriculture Publications INTSOY series number 22 soybean seed quality and stand establishment. p.67-76.
46. Howell, C.R. 1991. Biological control of pythium damping-off of cotton with seed-coating preparations of *Gliocladium virens*. *Phytopathology*. 81 : 738-741.
47. Huber C S. 1972. The crystal structure and absolute configuration of 2,9- diacetyl-9-azabicyclo(4,2,1)non-2,3-ene. *Acta Crystallogr*. B28 : 2577.
48. Jacob, H. 1957. Etudes sur certaines substances metaboliques liberees dans milieu de culture par le *Nostoc muscorum* Ag. *Comptes Rend. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris* 244 : 1968-1969. quoted to Chetsumon, A. 1993. Production of a novel antibiotic "scytonemin X", by immobilized cyanobacterial cells in a seaweed-type photobioreactor. Ph.D. thesis, Osaka Univ., Osaka.
49. Kashiwagi M, J. S. Mynderse, R. E. Moore and T.R. Norton. 1980. Antineoplastic evaluation of Pacific basin marine algae. *J. Pharm. Sci*. 69 : 735-8.
50. Kirkpatrick, B.L. and J.B. Sinclair. 1973. Uptake of two systemic fungicides and their breakdown products by soybean seeds. *Phytopathology*. 63 : 1532-1535.
51. Lefevre, M. and M. Nisbet, 1948. Sur la secretion, par certaines especes d' algues. *C.r. Acad. Sci. Paris* 226 : 107-109. quoted to Chetsumon, A. 1993. Production of a novel antibiotic "scytonemin X", by immobilized cyanobacterial cells in a seaweed-type photobioreactor. Ph.D. thesis, Osaka Univ., Osaka.

52. Lefevre, M., H. Jacob and M. Nisbet. 1950. Sur la secretion, par certaines cyanophytes, de substances algostatiques dans les collections d' eau naturelles *C.r. Acad. Sci. Paris.* 230 : 2226-2227. quoted to Chetsumon, A. 1993. Production of a novel antibiotic "scytonemin X", by immobilized cyanobacterial cells in a seaweed-type photobioreactor. Ph.D. thesis, Osaka Univ., Osaka.
53. Mason, C P, K. R. Edwards , R. E. Carlson , J. Pignatello, F.K. Gleason and J.M.Wood 1982. Isolation of chlorine-containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni* . *Science.* 215 : 400-402.
54. Moore, R. E. and J. S. Mynderse. 1982. Majusculamide C. U.S. US 4.342.751 Appl. 241.812 1981. Ref. C. A. 1982, 97 : 214751
55. Moore R E , G. M. L. Patterson, J. S. Mynderse, J. J. Jr.Barshi , T. R. Norton , E. Furusawa and Furusawa S. 1986b. Toxins from cyanophytes belonging to the Scytonemataceae. *Pure Appl. Chem.* 58 : 263-71.
56. Mynderse, J. S. and R. E. Moore. 1978a. Malyngamides D and E , two tran-7-methoxy-9-methylhehadec-4-enamides from a deep water variety of the marine cyanophyte *Lyngbya majuscula* . *J. Org. Chem.* 43 : 4359-63.
57. Rodhe, W. 1948. Environmental requirements of freshwater plankton algae. *Symbol. Bot. Ups.* 10:1.
58. Richmond, A. 1986. CRC Handbook of Microalgae Mass Culture. Florida: CRC Press.
59. Samejima, H. and Myers, J. 1958. On the heterophic growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Gen. Microbiol.* 18 : 107

60. Sasner, J.J.Jr, M. Ikawa, T.L. Foxall and W. H. Watson 1981. Studies on aphantoxin from *Aphanizomenon flos-aquae* in New Hampshire. In Carmichael W W (ed) The Water Environment - Algal Toxins and Health. Plenum Press. New York. pp.389-404.
61. Schneider, R.W., O.D.Dhingra, J.F. Nicholson and J.B. Sinclair. 1974. *Colletotrichum truncatum* borne within the seed coat of soybean. *Phytopathology*. 64 : 154-155.
62. Serdula, M., GBartolini , R. E.Moore, J. Gooch and N. Wiebenga. 1982. Seaweed itch on winward Oahu. Hawaii. *Med. J.* 41 : 200-201.
63. Sinclair, J. B. and M.C. Shurtleff. 1975. Compendium of Soybean Diseases. Minnesota: American Phytopathological Society, Inc.
64. Stahl, E. 1969. Thin-Layer Chromatography : A laboratory handbook. Berlin : Springer-Verlag Inc.
65. Starr, T.J., E.F. Dieg, K.K. Church and M.B. Allen. 1962. Texas report on biology and medicine. 20 : 271. quoted to Chetsumon, A. 1993. Production of a novel antibiotic "scytonemin X", by immobilized cyanobacterial cells in a seaweed- type photobioreactor. Ph.D. thesis, Osaka Univ., Osaka.
66. Stengel, E. et. al. 1978. Method and arrangement for optimally supplying autotrophic organisms with CO₂ nutrient, Assigned to gesellschaft fur strahlen und umweltforschung mbH, Munich. U.S. patent 4.084.346. April 18 1978.
67. Surk-Sik Moon, J. L. Chen, R E. Moore and G.M.L. Patterson. 1992. Calophycin, a fungicidal cyclic decapeptide from the terrestrial blue-green alga *Calothrix fusca* *J. Org. Chem* 57 : 1097-1103.

68. Sutton, B.C. 1962 *Colletotrichum truncatum* (Pers. ex Fr.) Grove and *C. trichellum* (Fr. ex. Fr.) Duke. *Tran. Brit Mycol. Soc.* 45 : 222-232.
69. Wagman, G.H. and M.J. Weinstein. 1973. Chromatography of antibiotics.
J. Chromatography Library. 1:1-238.
70. Walter, P. and Frankmole. 1992. Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga, *Anabaena laxa*. *J. of Antibiotics.* 1458-1466.
71. Welch, A.M. 1962. Preliminary survey of fungistatic properties of marine algae.
J. Bact. 83 : 97. quoted to Chetsumon, A. 1993. Production of a novel antibiotic “scytonemin X”, by immobilized cyanobacterial cells in a seaweed-type photobioreactor. Ph.D. thesis, Osaka Univ., Osaka.
72. Wolf, W.J. and F.L. Baker. 1972. Scanning electron microscopy of soybean. *Cereal Sci. Today* 17 : 125-130.

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย

1. สูตรอาหาร BGA (N-free medium)

NaCl	7.0	มก.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	380.0	มก.
CaCl ₂	80.0	มก.
K ₂ HPO ₄	600.0	มก.
Fe(SO ₄) ₃ ·6H ₂ O	10.0	มก.
Titriplex III	27.0	มก.
H ₃ BO ₃	3.0	มก.
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.0	มก.
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	8.0	มก.
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.3	มก.
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08	มก.
CoCl ₂	0.02	มก.
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH 7.5 ภายหลังน้ำเข้าเชื้อแล้ว		

หมายเหตุ

- สำหรับอาหาร BGA+N นั้นมีการดัดแปลงโดยการเติม NaNO₃ ในปริมาณ 1.5 กรัม/ลิตร
- อาหารวุ้นเตรียมโดยการเติมวุ้น 1.5%

2. สูตรอาหาร BG-11

NaNO_3	1.5	กรัม
K_2HPO_4	40	มก.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75	มก.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36	มก.
Citric acid	6	มก.
Ferric ammonium citrate	6	มก.
EDTA, disodium magnesium salt	1	มก.
NaCO_3	20	มก.
* Trace metal mixed	1	มล.
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH เป็น 7.4 หลังจากหนึ่งชั่วโมงแล้ว		
* Trace metal mixed	ประกอบด้วย	
H_3BO_3	2.860	มก./มล.
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.810	มก./มล.
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.222	มก./มล.
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079	มก./มล.
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0494	มก./มล.

3. สูตรอาหาร Allen's

NaNO_3	1.5	กรัม
K_2HPO_4	39	มก.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75	มก.
Na_2CO_3	20	มก.
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20	มก.
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	58	มก.
EDTA	0.1	มก.

Citric acid	0.6	มก.
FeCl ₃	0.2	มก.
Microelements	1	มล.
น้ำกลั่น	999	มล.

Microelements เตรียมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มีองค์ประกอบดังนี้

H ₃ BO ₃	2.86	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222	กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.391	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	กรัม
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0494	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.8 แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข.

น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี

1. การทดสอบปฏิกิริยานินไฮดริน

สารที่ใช้ในการทดลอง

1.1 สารละลายไกลซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์

1.2 สารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.0

เตรียมโดยผสมกรดอะซิติกเข้มข้น 5.6 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทีละหยด คนอยู่เรื่อยๆ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

1.3 นียานินไฮดริน

เตรียมโดยละลายนินไฮดริน 0.2 กรัมในเอทิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร

2. การทดสอบปฏิกิริยาไบยูเรต

สารที่ใช้ทดสอบ

2.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์

2.2 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

3. การทดสอบเฟห์ลิง (Fehling's test)

สารที่ใช้ในการทดลอง

3.1 สารละลายเฟห์ลิง เอ

เตรียมโดยการละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 34.64 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร

3.2 สารละลายเฟห์ลิง บี

เตรียมโดยการละลายโซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรต 173 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 65 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร

4. การทดสอบแอนโทรน

สารที่ใช้ในการทดลอง

Copyright by Mahidol University

น้ำยาแอนโทรน คือ สารละลายแอนโทรน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในกรดกำมะถันเข้มข้น

5. การทดสอบโมลิสซ์

สารที่ใช้ในการทดลอง

5.1 น้ำยาโมลิสซ์ คือสารละลายแอลฟาแนพทอล 5 เปอร์เซ็นต์ ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ต้องเตรียมในวันทดลอง)

5.2 กรดกำมะถันเข้มข้น

6. การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไลปิด (unsaturation test)

สารที่ใช้ทดลอง

6.1 กลอโรฟอร์ม

6.2 สารละลายโบรมีน 10 เปอร์เซ็นต์ในกลอโรฟอร์ม

ภาคผนวก ค.

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

1. กราฟมาตรฐานของ cycloheximide (standard curve of cycloheximide)

1.1 เตรียม cycloheximide มาตรฐาน (standard cycloheximide) ที่มีความเข้มข้น 5 15 30 60 80 100 200 400 600 800 1,000 1,200 1,400 1,600 1,800 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ($\mu\text{g}/\text{disc}$)

1.2 เปเปอร์ดิส (BBL paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

1.3 สปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

1.4 ทดสอบประสิทธิภาพของ cycloheximide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ตามวิธี paper disc plate method ของ Chmel, H (34) โดยใช้อาหาร PDA

1.4.1 วิธีหากราฟมาตรฐานของ cycloheximide

เทอาหาร PDA ปริมาณ 15-20 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ปล่อยให้วันแห้งตัว นำสำลีพันปลายไม้ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ฤ (swab) ไปมาบนผิวหน้าของอาหาร PDA ให้ทั่วทั้ง 3 ระบาย

ใช้ไมโครปิเปตขนาดบรรจุ 20 ไมโครลิตร ปิเปต cycloheximide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ (ข้อ 1.1) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงบนเปเปอร์ดิส ทำ 2 ซ้ำ สำหรับสารที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรให้ปิเปตลงบนเปเปอร์ดิส 32 แผ่น ใช้ปากกิบที่ฆ่าเชื้อแล้วกิบเปเปอร์ดิสแต่ละความเข้มข้นของสาร ความเข้มข้นละ 2 แผ่น วางลงบนผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ ที่เตรียมไว้จานเดียวกันแต่อยู่ตรงกันข้ามในแนวทแยงมุม และวาง

เปเปอร์ดิสที่บรรจุสารความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร 2 แผ่น บนผิวอาหารในงานนั้นแบบตรงกันข้ามตามแนวเส้นทแยงมุมอีกแนวหนึ่ง แต่ละงานเลี้ยงเชื้อก็จะวางเปเปอร์ดิสงานละ 4 แผ่น ในแนวที่สมดุลกัน และทุกๆงานเลี้ยงเชื้อจะมีเปเปอร์ดิสที่บรรจุสารความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวัดผ่านเส้นผ่านศูนย์กลางของเปเปอร์ดิสด้วย

1.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อนำไปเขียนกราฟมาตรฐานของ cycloheximide

จากการทดลองในข้อ 1.4.1 ให้หาค่าเฉลี่ยของความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดจากการใช้ cycloheximide มาตรฐานความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร จากการทดลองทั้งหมด ดูความแตกต่างค่าเฉลี่ยทั้งหมดกับค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละงานเลี้ยงเชื้อ ถ้าค่าเฉลี่ยทั้งหมดมีค่าน้อยกว่าให้นำค่าที่ต่างกันไปหักออกจากค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากสารที่มีความเข้มข้นอีกระดับหนึ่งซึ่งทดสอบในงานเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ทำนองเดียวกัน ถ้าค่าเฉลี่ยทั้งหมดมีค่ามากกว่าก็นำค่าที่แตกต่างกันนั้นไปเพิ่ม นำค่าความกว้างของบริเวณยับยั้งซึ่งเกิดจาก cycloheximide มาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ที่ปรับค่าแล้วไปเขียนกราฟโดยใช้กระดาษกราฟแบบ semi-logarithmic graph paper และใช้วิธีเขียนกราฟตาม method of least square (37) ตามสูตรและจากตารางผนวก

จาก $Y = ab^x$

หรือ $\log Y = \log a + x \log b$

$$\sum_{i=1}^n \log Y_i = n (\log a) + (\log b) \sum_{i=1}^n x_i \tag{1}$$

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

แทนค่าในสมการ (1) $38.6028 = 16 (\log a) + 350.56 (\log b)$ (1)

$$\text{แทนค่าในสมการ (2)} \quad 957.3767 = 350.56 (\log a) + 8,960.3272 (\log b) \quad (2)$$

$$\text{จากสมการ (1) และ (2) จะได้ } \log a = 0.0004$$

$$\log b = 0.1101$$

$$\text{จากความสัมพันธ์ } \log Y = \log a + X \log b$$

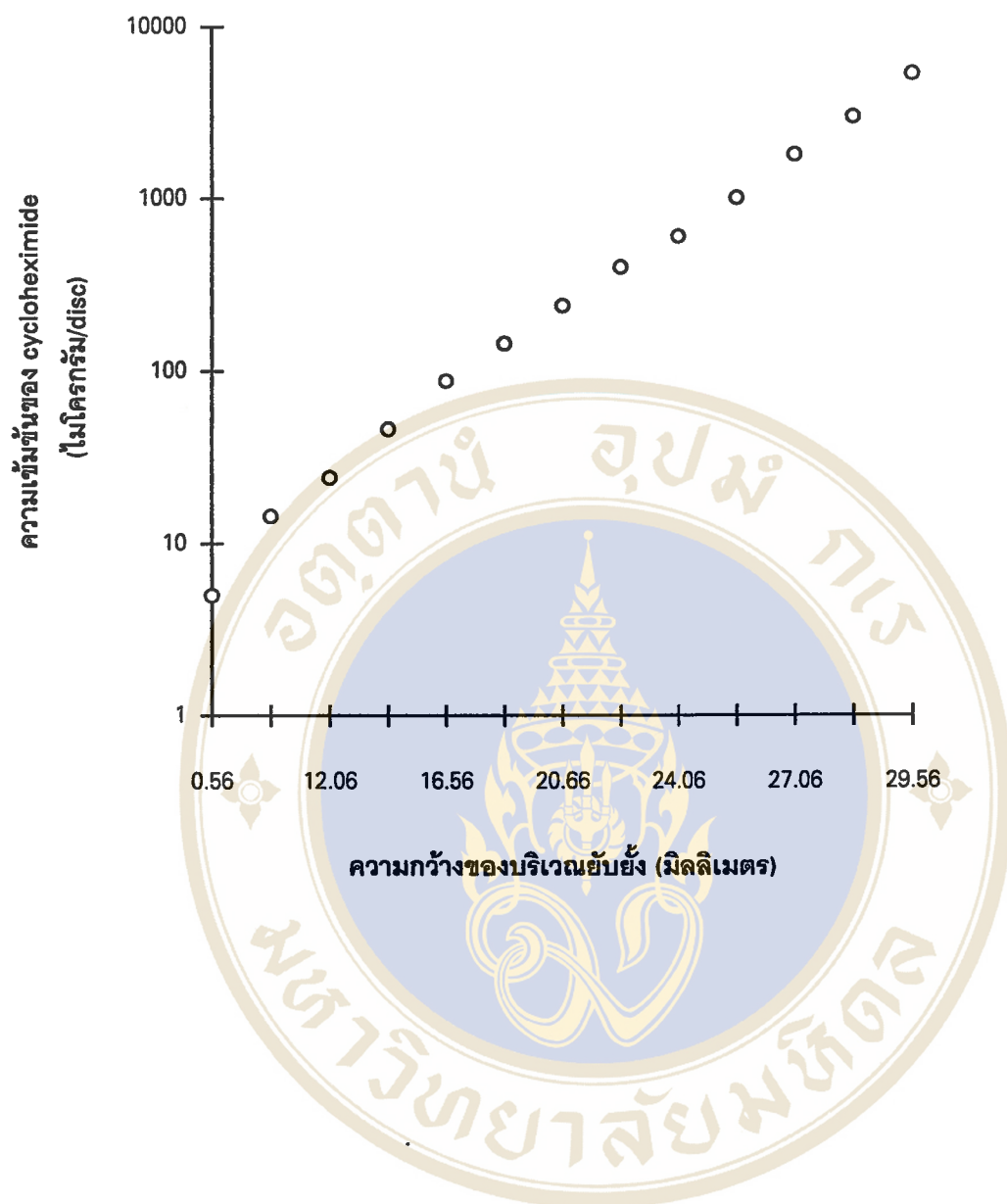
$$\log Y = 0.0004 + X (0.1101)$$

ตารางผนวก การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำหรับการเขียนกราฟมาตรฐานของ cycloheximide
ตาม method of least squares

ลำดับข้อมูล	Yi	log Yi	Xi	X ² i	Xi log Yi
1	5	0.6989	0.56	0.3136	0.3913
2	15	1.1761	11.06	122.3236	13.0077
3	30	1.4771	12.06	145.44	17.8138
4	60	1.7781	14.56	211.99	25.8891
5	80	1.9030	16.56	274.23	31.5137
6	100	2	19.06	363.28	38.12
7	200	2.3010	20.66	426.84	47.5387
8	400	2.6020	22.06	486.64	57.4001
9	600	2.7781	24.06	578.88	66.8411
10	800	2.9030	26.56	705.43	77.1037
11	1,000	3	27.06	732.24	81.18
12	1,200	3.0791	28.56	815.67	87.9391
13	1,400	3.1461	29.56	873.79	92.9987
14	1,600	3.2041	30.56	933.91	97.9173
15	1,800	3.2552	32.56	1,060.15	105.9893
16	2,000	3.3010	35.06	1,229.20	115.7331
		38.6028	350.56	8,960.3272	957.3767

Y = ความเข้มข้นของ cycloheximide มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร)

X = ความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญของ *Colletotrichum truncatum* (มิลลิเมตร)



ภาคผนวก ง.

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับถั่วเหลือง (2)

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมของประเทศไทย ชนิดหนึ่ง เนื่องจากความต้องการบริโภคถั่วเหลืองในรูปของผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีปริมาณสูง และยิ่งจะทวีความต้องการเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ

ถั่วเหลืองสามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เมล็ดถั่วเหลืองมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ โปรตีนประมาณร้อยละ 40 น้ำมันประมาณร้อยละ 20 และคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 25 ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม เช่น เต้าหู้ ซีอิ๊ว อาหารเด็กอ่อน น้ำมันพืช อาหารสัตว์ และอื่นๆ

1) พันธุ์ถั่วเหลืองที่มีการแนะนำให้เกษตรกรไทยปลูก

ลักษณะพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรฐานของกรมวิชาการเกษตร โดยสถาบันวิจัยพืชไร่ ได้ปลูกและทดลองได้แก่ พันธุ์ สจ.1 พันธุ์ สจ.2 พันธุ์ สจ.4 พันธุ์ สจ.5 พันธุ์ สุโขทัย 1 พันธุ์ เชียงใหม่ 60 และพันธุ์ นครสวรรค์ 1 ซึ่งแต่ละพันธุ์จะมีคุณสมบัติและลักษณะประจำพันธุ์แตกต่างกันบ้างเล็กน้อยในด้านผลผลิต การต้านทานโรคและแมลง การตอบสนองต่อสภาพการปลูก และอายุการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะขอลำถึงพันธุ์ สจ.5 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบกับสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 หรือสายพันธุ์ 7024-2 คัดได้จากลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ 64-104 จากใต้หวันกับพันธุ์ สจ.2 แบบสอบประวัติตั้งแต่ชั่วที่ 2 ถึงชั่วที่ 8 ที่สถานีทดลองพืชไร่แม่โจ้และศรีสำโรง ทั้งในฤดูแล้งและฤดูฝน โดยเน้นให้มีความต้านทานโรคราสนิม โรคใบจุดซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย และโรคใบด่าง ปรากฏว่าถั่วเหลืองสายพันธุ์นี้มีความต้านทานต่อโรคต่าง ๆ ดังกล่าวได้ดีพอสมควร แต่ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคแอนแทรคโนส ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 เป็นถั่วเหลืองพันธุ์ไม่ทอดยอด ลำต้นมีสีม่วง ใบจริงมีรูปร่างกลมรี ค่อนข้างหนา สีเขียวเข้ม ขนที่ใบและลำต้นเป็นสีน้ำตาลอ่อน สูงประมาณ 57 เซนติเมตร

เริ่มออกดอกเมื่อมีอายุ 35 วัน ดอกสีม่วง มีอายุถึงวันเก็บเกี่ยว 92 วัน ขนที่ฝักเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่อฝักแก่และแห้งมีความเหนียวพอสมควร ไม่แตกง่ายสามารถทิ้งไว้ในแปลงได้นาน 2 สัปดาห์

เมล็ดมีสีฟางข้าว ตามีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะเมล็ดค่อนข้างกลม 100 เมล็ดหนัก 14.1 กรัมเมล็ดมีน้ำมันประมาณร้อยละ 18.5 และโปรตีนประมาณร้อยละ 41.5

2) สภาพดินฟ้าอากาศ

ถั่วเหลืองสามารถขึ้นได้ดีในเขตที่มีอากาศร้อน กึ่งร้อน และเขตที่มีอากาศอบอุ่น อุณหภูมิที่เหมาะสม 75-77 องศาฟาเรนไฮต์

3) ฤดูปลูก

สำหรับการปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทย แบ่งตามฤดูการปลูกได้ 3 ฤดู คือ ต้นฤดูฝน ปลายฤดูฝน และฤดูแล้ง ซึ่งเกษตรกรในท้องถิ่นต่าง ๆ นิยมปลูกตามสภาพของฤดูกาลแตกต่างกัน

ต้นฤดูฝน อาจเริ่มปลูกตั้งแต่กลางเดือนเมษายน ถึงต้นเดือนพฤษภาคม ระยะเวลาดังกล่าวนิยมปลูกกันมากในแถบจังหวัดสุโขทัย ถั่วเหลืองจะแก่และเก็บได้ในเดือนกรกฎาคม ซึ่งเป็นระยะที่ฝนทิ้งช่วง

ปลายฤดูฝน เริ่มปลูกประมาณปลายเดือนกรกฎาคม ถึงต้นเดือนสิงหาคม ปลูกมากในแถบภาคกลาง เช่น สระบุรี ลพบุรี สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ประมาณเดือน ตุลาคม เมล็ดจะมีคุณภาพดีขายได้ราคาดี เนื่องจากเก็บเกี่ยวเมื่อฝนหมดแล้ว

ฤดูแล้ง เป็นการปลูกถั่วเหลืองในเขตชลประทานและปลูกมากในนาหลังจากเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปลูกคือประมาณกลางเดือนธันวาคม ถึงกลางเดือนมกราคม จะให้ผลผลิตต่อไร่สูงที่สุด ส่วนใหญ่ปลูกในแถบภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงใหม่

4) ดินที่เหมาะสมสำหรับปลูกถั่วเหลืองและการเตรียมดิน

เนื้อดินควรเป็นดินร่วนเหนียวหรือดินร่วน มีการระบายน้ำดี ซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของไรโซเบียมด้วย ถ้าทำการเกษตรกรรมดี ความชื้นพอเหมาะมีการบำรุงดินที่ถูกต้อง จะทำให้ได้ผลผลิตสูง การเตรียมดินควรมีการไถพรวน 1-2 ครั้ง แล้วแต่สภาพของดินแต่ละท้องที่ อย่างไรก็ตามการปลูกถั่วเหลืองที่เป็นที่ลุ่ม มีน้ำขัง ควรมีร่องสำหรับระบายน้ำออกจากแปลงได้สะดวก เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นพืชที่ไม่ชอบน้ำขัง และดินที่มีลักษณะเป็นดินร่วนปนเหนียวไม่ควรเตรียมดินให้มีความละเอียดมากนัก เพราะเมื่อปลูกถั่วเหลืองแล้วฝนตก จะทำให้หน้าดินแข็งจับตัวแน่น ต้นอ่อนไม่สามารถดันดินขึ้นมาได้

5) ระยะปลูก

ระยะปลูกแบ่งออกเป็นระยะระหว่างแถว ระยะระหว่างหลุม และจำนวนต้นต่อหลุม ระยะมาตรฐานที่กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำเกษตรกรปลูกคือระยะระหว่างแถว 50 เซนติเมตร ระยะระหว่างหลุม 20 เซนติเมตร และปลูกหลุมละ 2-3 ต้น ซึ่งเป็นระยะที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูงที่สุด

6) วิธีการปลูกถั่วเหลือง

วิธีการปลูกถั่วเหลืองมี 2 วิธี คือ ปลูกแบบไม่ยกร่อง และปลูกแบบยกร่อง

- ปลูกแบบไม่ยกร่อง หลังจากเตรียมดินเรียบร้อยแล้ว ก็หยอดเมล็ดลงในหลุม ให้ลึกประมาณ 2-3 เซนติเมตร กลบหลุมให้มีระยะระหว่างแถว 50 เซนติเมตร ระยะระหว่างหลุม 20 เซนติเมตร หลุมละ 3-4 เมล็ด หลังจากงอกแล้ว 7-10 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือหลุมละ 2 ต้น จะได้จำนวนต้นทั้งหมดประมาณ 32,000 ต้นต่อไร่

- ปลูกแบบยกร่อง สำหรับฤดูแล้งที่ใช้น้ำชลประทานเพื่อสะดวกแก่การให้น้ำ และระบายน้ำ การปลูกถั่วเหลืองวิธีนี้อาจจะต้องเปลี่ยนแปลงระยะปลูกบ้าง โดยปลูกถั่วเหลืองให้ชิดกันมากกว่าวิธีแรก แต่ควรจะคำนวณให้ได้ประมาณ 32,000 ต้นต่อไร่

7) การป้องกันและกำจัดวัชพืช

ก. วิธีกล

- การเผาไฟ โดยใช้ไฟเผาวัชพืชก่อนทำการปลูกถั่ว หรือเผาตอซังในนาหลังเก็บเกี่ยวข้าว

- การกำจัดวัชพืชโดยใช้เครื่องมือต่าง ๆ ระหว่างแถวและระหว่างต้นถั่ว เช่น ใช้จอบดายวัชพืชในระหว่างแถวและต้น

ข. การใช้ระบบปลูกพืช โดยการปลูกพืชแซมหรือปลูกพืชหมุนเวียนสลับกันกับถั่วเหลือง หรืออาจใช้วัสดุคลุมดิน ใช้ฟางข้าวหรือตอซังพืชคลุมผิวดินบนแปลงให้หนาประมาณ 1-2 นิ้ว

ค. การใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช ได้แก่ อะลาคลอร์ (alachlor), ลินูรอน (linuron), นาโปรปามิด (napropamide), ออกซาไดอะซอน (oxadiazon), เมโทลาคลอร์ (metolachlor), ดาลาพอน (dalapon), พาราควอท (paraquat)

8) การใส่ปุ๋ย

อัตราปุ๋ยที่เหมาะสมสำหรับถั่วเหลือง เพื่อให้ธาตุอาหารสมดุลควรใส่ปุ๋ย
ในอัตรา 3-6-0, 3-6-6, 3-9-6, 3-9-0, 3-12-0 หรือ 3-12-6 ($N-P_2O_5-K_2O$ กิโลกรัมต่อไร่)

วิธีการใส่ปุ๋ยที่ดีคือ ใส่แบบก้นหลุมปลูก โดยจะใส่กันร่องตามแถวปลูกทั้งหมด
ก่อนปลูก โดยการเปิดร่องลึก 6-8 นิ้ว แล้วโรยปุ๋ยกลบตามด้วยดินแล้วหยอดเมล็ดบนปุ๋ยลึกได้ผิว
ดิน 1-2 นิ้ว หรืออาจใส่เป็นหลุมก็ได้ หลีกเลี่ยงวิธีใส่แบบหว่าน ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีระบบรากแก้ว
จึงควรใส่ปุ๋ยอยู่ตำแหน่งใกล้รากที่สุด

9) การเก็บเกี่ยวถั่วเหลือง

9.1) ทำการเก็บเกี่ยวตามอายุ ทั้งนี้เพราะถั่วเหลืองพันธุ์ส่งเสริม ส.จ.5 มีอายุการ
เก็บเกี่ยวโดยเฉลี่ยประมาณ 90 วัน แต่หากอุณหภูมิต่ำและดินมีความชื้นสูงอาจแก่ช้าออกไปอีกได้

9.2) สังเกตจากสีของฝัก ถั่วเหลืองจะแก่จากโคนต้นขึ้นไป จะสังเกตจากฝักที่
เปลี่ยนจากสีเขียวมาเป็นสีฟางข้าว หรือสีน้ำตาล ซึ่งแสดงว่าฝักแก่เหมาะที่จะทำการเก็บเกี่ยวแล้ว
เมื่อเห็นฝักแก่ประมาณ 1 ใน 3 ของต้นก็เริ่มทำการเก็บเกี่ยวได้

วิธีการเก็บเกี่ยว

การเก็บเกี่ยวควรจะต้องตัดที่โคนต้น นามามัดเป็นพ่อนตั้งเป็นกองทิ้งไว้ โดยเอาต้น
ด้านโคนต้นลงดินจนกระทั่งใบถั่วเหลืองร่วง หากยังไม่พร้อมที่จะนวดก็ควรนำไปเก็บไว้ในโรง
เรือน โดยตั้งกองให้โปร่ง อากาศถ่ายเทได้สะดวก เพื่อป้องกันฝักเน่าเสียหาย

10) โรคและแมลงศัตรูของถั่วเหลือง

ก. โรคที่ติดมากับเมล็ด

พบว่า มีเชื้อรา 66 สายพันธุ์ แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ และไวรัส 8 สายพันธุ์
เป็นจุลินทรีย์ที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลือง กลุ่มที่เป็นเชื้อราซึ่งมีผลทำให้อัตราการงอกลดลง หรือทำ
ให้เกิดอาการไหม้ กล้าล้ม ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii*,
Diaporthe phaseolousum var. *sojae* (Phomopsis), *Aspergillus melleus*, *A. flavus*,
Macrophomina phaseolina, *Peronospora manshurica* และ *Alternaria* spp. กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย
ได้แก่ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง และ *Bacillus*
subtilis ซึ่งสามารถเข้าทำลายเมล็ดที่อยู่ในโรงเก็บได้ (45)



ข. โรคของลำต้นและราก

- โรคไหม้ของลำต้น (stem blight) เกิดจากเชื้อรา *C. truncatum*, *Fusarium* sp., *M. phaseolina*, *Phomopsis* sp.
- โรครากและโคนเน่า (root and basal stem rot) เกิดจาก เชื้อรา *F. solani*, *M. phaseolina*, *R. solani*, *S. rolfsii*

ค. โรคที่พบทั่วไปบนต้นถั่วเหลืองและใบ

- โรคราสนิม (rust) เกิดจากเชื้อรา *Phakopsora pachyrhizi*
- โรคแบคทีเรียลพัสดุล (bacterial pustule) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*
- โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) หรือใบโกร๋น เกิดจากเชื้อรา *C. truncatum*
- โรคใบจุด (leaf spot) เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* sp., *Corynespora cassiicola*
- โรคราน้ำค้าง (downy mildew) เกิดจากเชื้อรา *Peronospora manshurica*
- โรคใบด่าง (soybean mosaic) เกิดจากเชื้อไวรัส Soybean Mosaic Virus
- โรคใบขยอ (soybean crinkle leaf) เกิดจากเชื้อไวรัสโดยมีแมลงห้ำ

ขาวอย่างน้อย 40 ตัว เป็นตัวนำและถ่ายทอดเชื้อ

ง. แมลงศัตรูถั่วเหลืองที่สำคัญได้แก่

- หนอนม้วนใบ
- เพลี้ยอ่อนถั่ว
- หนอนแมลงวันเจาะลำต้น
- มอดเจาะเมล็ด
- หนอนกระทู้ผัก