บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของราจากป่าชายเลนต่อราสาเหตุโรคพืชบนอาหารแข็งด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique)

จากการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของราทะเล และราเอนโดไฟท์จากป่าชายเลนที่เป็นตัวแทนในการศึกษาจำนวน 6 สายพันธุ์ ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique) บนอาหาร PDA/DW และ PDA/SW เป็นเวลา 3 วัน แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 4-1 จากตารางพบว่าราทะเล และราเอนโดไฟท์ทุกสายพันธุ์ที่ศึกษาให้ผลการยับยั้งแบบ Antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดบนอาหาร PDA/DW และ PDA/SW และพบว่าราทะเลส่วนใหญ่ให้ผลการยับยั้งแบบ Antibiosis ได้ดีบนอาหารทดสอบทั้ง 2 ชนิด ยกเว้นราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ที่ให้ผลการยับยั้งดีบนอาหาร PDA/SW เท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบระยะ Antibiosis ของราจากป่าชายเลนทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช พบว่าราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ให้ผลการยับยั้งสูงสุด พบระดับ Antibiosis แรง (+++) ถึงระดับแรงมาก (++++) ต่อราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด (ภาพที่ 4-1) ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ให้ผล Antibiosis ดีเมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PDA/DW ยกเว้นการยับยั้ง *A. brassicicola* ของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่ให้ผลการยับยั้งดีบนอาหาร PDA/SW และยังพบว่าราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ให้ผล Antibiosis ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับราเอนโดไฟท์สายพันธุ์อื่น ๆ ที่ศึกษา พบระดับ Antibiosis อยู่ในระดับปานกลาง (++) ถึงระดับแรง (+++) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราป่าชายเลนที่เลี้ยงในสภาวะตั้งต้น

ทำการเลี้ยงราจากป่าชายเลน 2 ชุด ในสภาวะตั้งต้นสองสภาวะ คือ ตั้งทิ้งไว้ (Static) ชุดหนึ่ง และเขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อีกชุดหนึ่ง เมื่อครบกำหนดกรองแยกเซลล์รา นำส่วนของอาหารเหลวไปสกัดสาร และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้ง

ตารางที่ 4-1 ระดับ Antibiosis ของราจากป่าชายเลนเมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PDA/DW และ PDA/SW เป็นระยะเวลา 3 วัน

ราจากป่าชายเลน	ระดับการเกิด Antibiosis							
	A. brassicicola		*C. gloeosporioides*		*F. oxysporum*		*Pestalotiopsis* sp.	
	PDA/DW	PDA/SW	PDA/DW	PDA/SW	PDA/DW	PDA/SW	PDA/DW	PDA/SW
BUCS 004	++	+++	+	+	-	+	+	+
BUCS 032-2	++	++	++	+++	++	++	++	++
BUSK 055-1	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
BUEN 121	++	++	++	+	++	++	+	+
BUEN 830	++	+++	++	++	++	++	+	+
BUEN 834	+++	+++	++	+	+++	+++	++	+

หมายเหตุ - ไม่เกิด Antibiosis

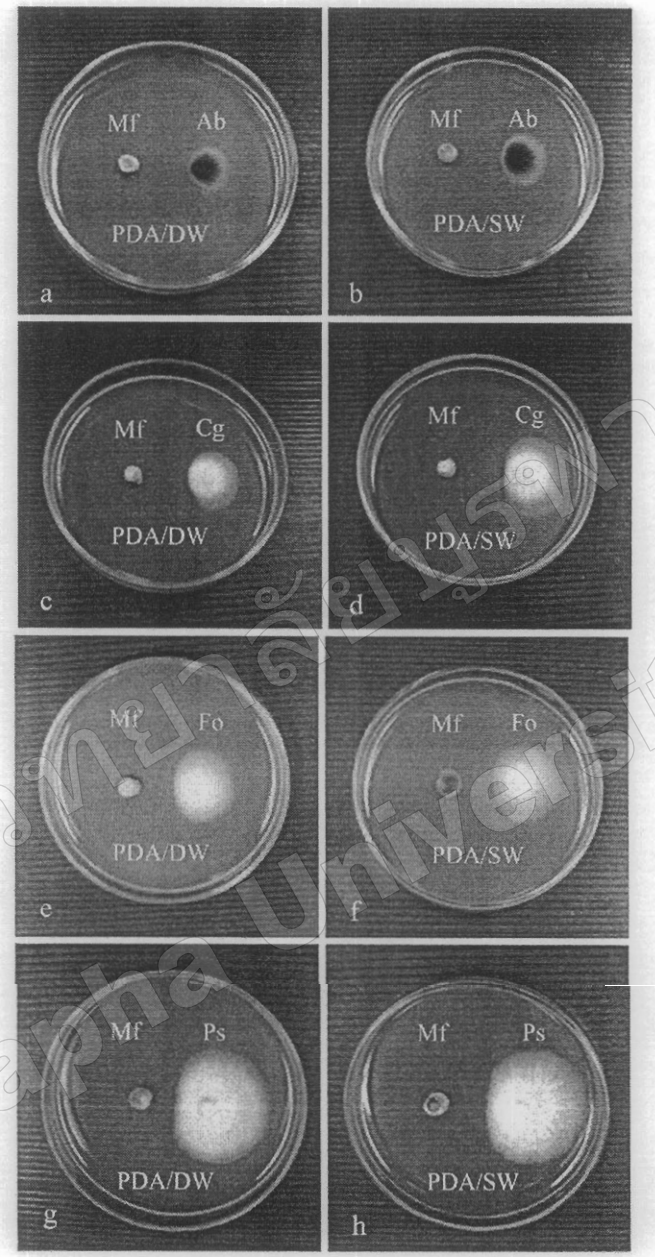
\+ ผลบวกอ่อน (ระยะ Antibiosis ≤ 0.50 เซนติเมตร)

++ ผลบวกปานกลาง (ระยะ Antibiosis >0.50-1.00 เซนติเมตร)

+++ ผลบวกแรง (ระยะ Antibiosis >1.00-2.00 เซนติเมตร)

++++ ผลบวกแรงมาก (ระยะ Antibiosis >2.00 เซนติเมตร)

Burapha University มหาวิทยาลัยบูรพา



ภาพที่ 4-1 การเกิด Antibiosis ของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 (Marine fungi; Mf), โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) ต่อราสาเหตุโรคพืช (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกัน เป็นเวลา 3 วัน ภาพด้านซ้ายใช้อาหารทดสอบ PDA/DW ภาพด้านขวาใช้อาหารทดสอบ PDA/SW; a, b: ระยะ Antibiosis ต่อ *A. brassicicola* (Ab), c, d: ระยะ Antibiosis ต่อ *C. gloeosporioides* (Cg), e, f: ระยะ Antibiosis ต่อ *F. oxysporum* (Fo), g, h: ระยะ Antibiosis ต่อ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

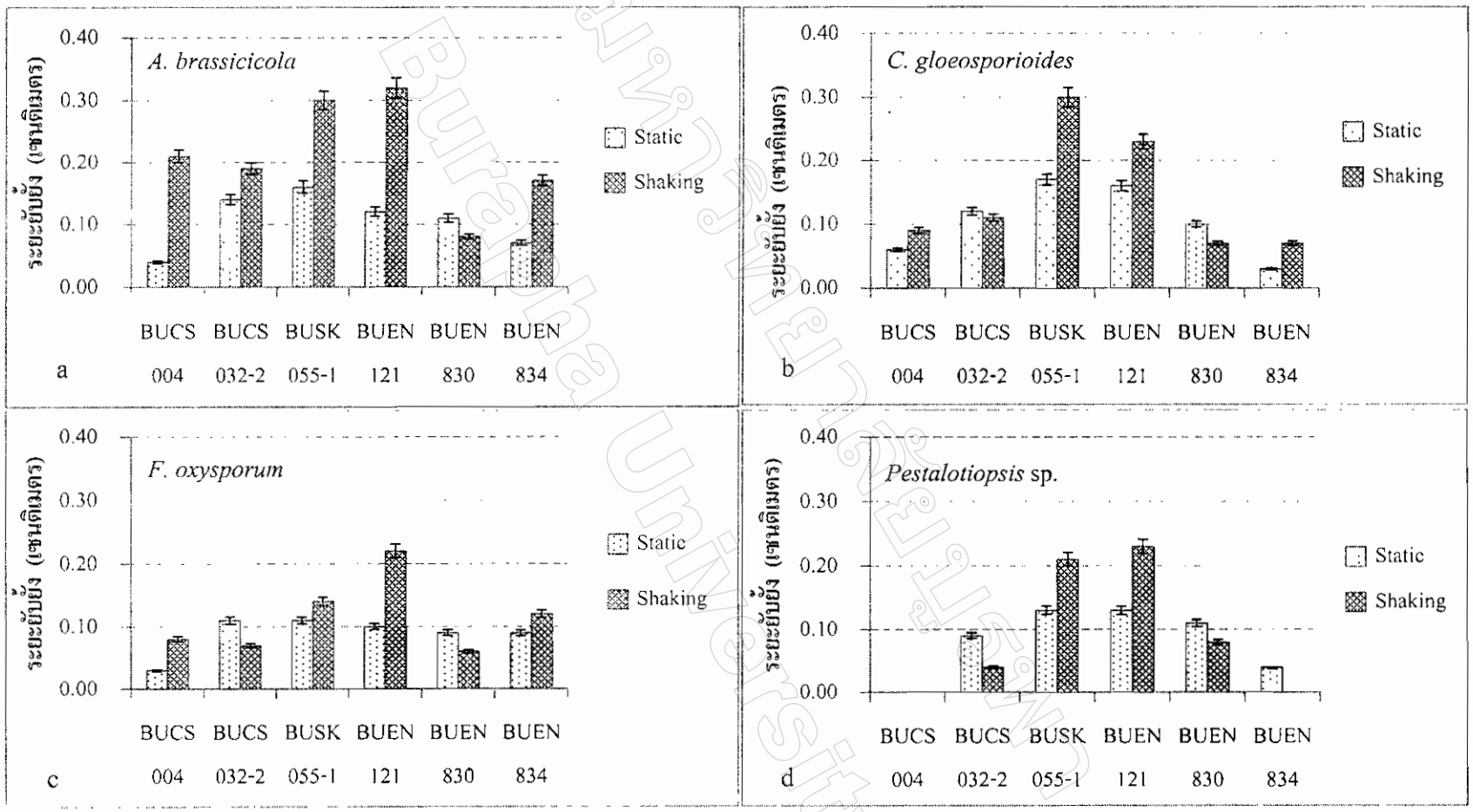
การเจริญของราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี Disc diffusion บนอาหาร PDA/DW พบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชแตกต่างกัน (ดังภาพที่ 4-2) หลังจากเลี้ยงราป่าชายเลนในสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) พบว่าสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 55-1 ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 และ ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับราจากป่าชายเลนสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp.

เมื่อเลี้ยงราจากป่าชายเลนโดยเขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 55-1 และราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ดี พบระยะยับยั้งมากกว่า 0.20 เซนติเมตร และสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 55-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ให้ผลของสารสกัดในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดี พบระยะยับยั้งมากกว่า 0.20 เซนติเมตร และพบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 มีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* สูงกว่าสารสกัดจากราจากป่าชายเลนสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ศึกษา ส่วนสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 และราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. สูงสุด พบระยะยับยั้งมากกว่า 0.20 เซนติเมตร และสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเลี้ยงในสภาวะตั้งต้นที่เขย่า 150 รอบ/นาที

โดยสรุปพบว่าสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ที่ได้จากการเลี้ยงราป่าชายเลนในสภาวะตั้งต้นทั้งสองสภาวะ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ได้ดี โดยส่วนใหญ่พบว่าการเลี้ยงในสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้น จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราจากระบบนิเวศป่าชายเลนในสภาวะตั้งต้น ช่วยยืนยันความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ ของราจากป่าชายเลนที่เป็นตัวแทนการศึกษา ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาด้วยเทคนิคการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน หรือการศึกษาผลของสารสกัด และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นดังกล่าวยังเป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อใช้เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลน

สภาวะการเลี้ยงราในอาหารเหลวที่ไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผู้วิจัยจึงทำการปรับสภาวะในการเลี้ยงราจากป่าชายเลนที่เป็นตัวแทนการศึกษาทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยใช้สภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นหลัก



ภาพที่ 4-2 ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราป่าชายเลนที่เลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้ (Static) และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที (Shaking); a: ระยะยับยั้ง *A. brassicicola*, b: ระยะยับยั้ง *C. gloeosporioides*, c: ระยะยับยั้ง *F. oxysporum*, d: ระยะยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ร่วมกับการปรับสภาวะทางกายภาพอื่น ๆ ทีละสภาวะ เพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป สภาวะทางกายภาพที่ศึกษา ได้แก่ ความเค็ม ชนิดของอาหารเหลว ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงราจากป่าชายเลนที่เหมาะสม ตามลำดับ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่ ใช้สภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิด หรือสายพันธุ์ของราจากป่าชายเลน ชนิดของราสาเหตุโรคพืช

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลที่พบบนเศษไม้ในป่าชายเลน สายพันธุ์ BUCS 004

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-2) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 15 ppt เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* สูงสุด แตกต่างจากระดับความเค็มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดจากอาหารเหลวทุก ๆ ความเค็มไม่มีผลต่อการยับยั้ง *C. gloeosporioides, F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. คัดเลือกความเค็มของอาหารเหลวที่ 15 ppt ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-2 ผลของความเค็มต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชโดยราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004

ความเค็ม (ppt)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	0.11±0.03 [1]	-	-	-
10	0.13±0.05 [1]	-	-	-
15	0.23±0.09 [2]	-	-	-
20	0.17±0.07 [1]	-	-	-
30	0.13±0.07 [1]	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[1-2] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาชนิดของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-3) พบว่าสารสกัดจากการเลี้ยงราทะเลในอาหารเหลว YMB ให้ผลดีในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ และสารสกัดจากอาหารเหลว YMB เท่านั้นที่สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเหลว PDB ให้ผลของสารสกัดในการยับยั้ง *A. brassicicola* ไม่แตกต่างจากอาหารเหลว YMB อาหารเหลว LNB ให้ผลของสารสกัดในการยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่แตกต่างจากอาหารเหลว YMB คัดเลือกอาหารเหลว YMB ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากสารสกัดให้ผลดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่

ตารางที่ 4-3 ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อาหารเหลว	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0.5xPDB	-	-	-	-
PDB	0.20 ± 0.08^{2}	-	-	-
YMB	$0.21\pm0.06^{b.\,2}$	0.16 ± 0.08^{ab}	$0.11\pm0.07^{a.\,1}$	-
LNB	$0.11\pm0.06^{a.\,1}$	-	$0.13\pm0.08^{a.\,1}$	-
SDB	0.10 ± 0.07^{1}	-	-	-

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

$^{1-2}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-4) พบว่าสารสกัดจากราทะเลเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 และ 7 มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8 มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* ไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดข้างต้น และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 ให้ผลของสารสกัดยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่แตกต่างกับฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นเท่ากับ 6 และ 7 สารสกัดจากอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

อาหารเหลว YMB ที่มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6 และ 7 ส่งผลให้ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่ดี และอาหารเหลว YMB ความเค็ม 15 ppt ยังมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นใกล้เคียง 6 เพื่อความสะดวกจึงเลือกใช้ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 ในการศึกษาขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-4 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
5	-	-	$0.11\pm0.06^{1-2}$	-
6	$0.14\pm0.05^{a,1}$	$0.12\pm0.04^{a,1}$	$0.16\pm0.07^{a,2}$	-
7	$0.20\pm0.09^{a,1}$	$0.14\pm0.08^{a,1}$	$0.16\pm0.05^{a,2}$	-
8	0.14 ± 0.05^{1}	-	-	-
9	-	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

$^{1-2}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาความเร็วของการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที) เลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-5) พบว่าเมื่อเลี้ยงราทะเลโดยเขย่าที่ความเร็ว 100 และ 150 รอบ/นาที มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ และฤทธิ์ยับยั้งที่ได้โดยการเขย่าที่ความเร็ว 100 และ 150 รอบ/นาที ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คัดเลือกความเร็วในการเขย่าที่ 100 รอบ/นาที ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากประหยัดพลังงานมากกว่าการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที

ตารางที่ 4-5 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

การเขย่า (รอบ/นาที)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	-	-	-	-
50	$0.16\pm0.07^{a,1}$	-	-	$0.11\pm0.07^{a,1}$
100	$0.21\pm0.06^{b,1}$	$0.13\pm0.07^{a,1}$	$0.11\pm0.06^{a,1}$	$0.14\pm0.07^{a,1}$
150	$0.17\pm0.07^{a,1}$	$0.11\pm0.07^{a,1}$	$0.13\pm0.07^{a,1}$	$0.13\pm0.05^{a,1}$
200	-	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

$^{1-2}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าที่ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-6) พบว่าสารสกัดจากการบ่มราทะเลที่ 28 องศาเซลเซียส มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด นอกจากการบ่มที่อุณหภูมิดังกล่าว ยังพบว่าสารสกัดจากการบ่มที่ 22 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ให้ผลของสารสกัดในการยับยั้ง *A. brassicicola* ไม่แตกต่างจากการบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส และการบ่มราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ที่อุณหภูมิ 22 และ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลสารสกัดในการยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่แตกต่างจากการบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ส่วนสารสกัดจากการบ่มราทะเลที่ 28 องศาเซลเซียส เท่านั้นมีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. สูงสุด คัดเลือกการบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการทดลองถัดไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด และเป็นอุณหภูมิเดียวที่ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp.

ตารางที่ 4-6 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
22	0.18±0.04 $^{b, 2}$	0.13±0.05 $^{a, 12}$	-	-
25	0.11±0.03 $^{a, 1}$	0.10±0.05 $^{a, 1}$	0.12±0.04 $^{a, 1}$	-
28	0.21±0.03 $^{b, 2}$	0.16±0.05 $^{a, 2}$	0.13±0.05 $^{a, 1}$	0.13±0.05 ^{a}
30	0.12±0.04 $^{a, 1}$	0.11±0.03 $^{a, 12}$	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-2}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลา (2, 4, 7, 10 และ 14 วัน) ที่ใช้บ่มราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่า 100 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4-7) พบว่าการบ่มราทะเลเป็นเวลา 7 วัน ส่งผลให้ราทะเลผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง *A. brassicicola* และ *Pestalotiopsis* sp. ค่อนข้างหลากหลาย โดยพบว่าสารสกัดจากการบ่มราทะเลเป็นเวลา 2 วัน ถึง 10 วัน ให้ผลในการยับยั้ง *A. brassicicola* ไม่แตกต่างกัน การบ่มราทะเลเป็นเวลา 4 วัน ถึง 10 วัน สารสกัดให้ผลยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ไม่แตกต่างกัน การบ่มราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 เป็นเวลา 10 วัน พบว่า

สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างจากการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ส่วนสารสกัดที่ได้จากการบ่มราทะเลเป็นเวลา 4 วัน มีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่แตกต่างจากการบ่มเป็นเวลา 7 วัน แม้ว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด ของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ค่อนข้างหลากหลาย แต่การบ่มราทะเลเป็นเวลา 7 วัน เท่านั้นที่ให้ผลของสารสกัดดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดที่ทดสอบ คัดเลือกระยะเวลาในการบ่มราทะเลที่ 7 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-7 ผลของระยะเวลาเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ระยะเวลา (วัน)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
2	0.14±0.05 $^{b, 2}$	-	0.10±0.05 $^{ab, 1}$	0.12±0.04 $^{a, 1}$
4	0.16±0.07 $^{a, 2}$	0.13±0.05 ^{a,1}	0.13±0.07 $^{a, 12}$	0.18±0.08 $^{a, 2}$
7	0.18±0.05 $^{a, 2}$	0.20±0.07 $^{a, 2}$	0.17±0.07 $^{a, 2}$	0.14±0.05 $^{a, 12}$
10	0.12±0.06 $^{a, 2}$	0.17±0.05 $^{a, 12}$	-	0.13±0.05 $^{a, 12}$
14	-	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\- ไม่พบระยะยับยั้ง

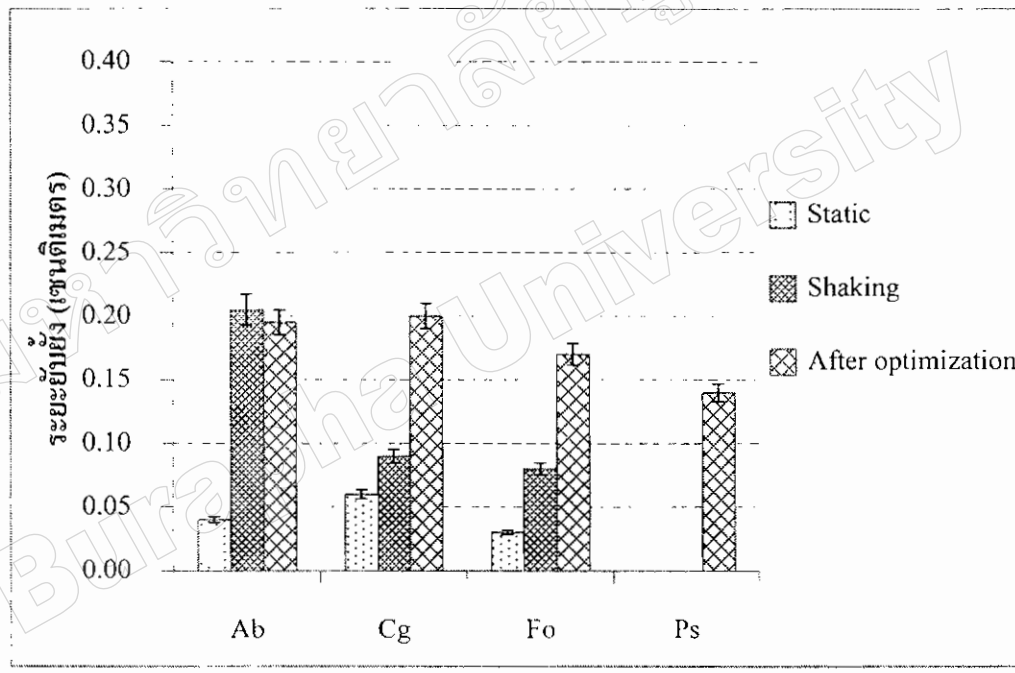
$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-2}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทั้ง 6 ปัจจัย พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-8) แต่สภาวะทางกายภาพที่ส่งผลให้ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ผลิตสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้น ได้แก่ ความเค็ม 15 ppt อาหารเหลว YMB ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ ระหว่างการเลี้ยงราทะเลในสภาวะตั้งต้นและภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสมของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 (ภาพที่ 4-3 และ

ตารางที่ 4-9) เมื่อเปรียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 กับฤทธิ์ยับยั้งที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum*, *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* เพิ่มขึ้นประมาณ 2-5 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในสภาวะตั้งต้นที่เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสมมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเกตุโรคพืชส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่า ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* ที่พบว่าไม่แตกต่างจากฤทธิ์ของสารสกัดในสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ที่เปลี่ยนจากเดิม คือ ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเมื่อศึกษาในสภาวะตั้งต้นทั้งสองสภาวะ เป็นมีฤทธิ์ยับยั้งภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม



ภาพที่ 4-3 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสม (After optimization) ต่อการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-8 สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004

สภาวะทางกายภาพ	สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช				สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.	
ความเค็ม (ppt)	15	-	-	-	15
ชนิดอาหารเหลว	PDB, YMB	YMB	YMB, LNB	-	YMB
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	6, 7, 8	6, 7	5, 6, 7	-	**6**,7
การเขย่า (รอบ/นาที)	50. 100. 150	100, 150	100, 150	50, 100, 150	**100**, 150
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	22, 28	22, 28, 30	25, 28	28	28
ระยะเวลา (วัน)	2. 4, 7, 10	7, 10	4, 7	4, 7, 10	7

หมายเหตุ PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth

ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

- สภาวะทางกายภาพที่ศึกษาไม่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

ศูนย์วิทยทรัพยากร
Burapha University

ตารางที่ 4-9 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004

สภาวะทางกายภาพ		สภาวะที่ศึกษา		ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า)			
		สภาวะตั้งต้น	สภาวะที่เหมาะสม	*A. brassicicola*	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
สภาวะที่ตั้งทิ้งไว้	ความเค็ม (ppt)	15	15	3.88	2.33	4.67	UC
	อาหารเหลว	PDB	YMB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	6				
	การเขย่า (รอบ/นาที)	0	100				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	28				
	ระยะเวลา (วัน)	4	7				
สภาวะที่เขย่าให้อากาศ	ความเค็ม (ppt)	15	15	-0.05	1.22	1.13	UC
	อาหารเหลว	PDB	YMB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	6				
	การเขย่า (รอบ/นาที)	150	100				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	28				
	ระยะเวลา (วัน)	4	7				

หมายเหตุ UC (Uncalculated): ไม่สามารถคำนวณค่าได้ เนื่องจากไม่พบระยะยับยั้งในสภาวะตั้งต้น, ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion, ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้น) -1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลบนเศษไม้ในป่าชายเลน สายพันธุ์ BUCS 032-2

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-10) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 20 ppt ให้ผลของสารสกัดในการยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ได้สูงสุด แตกต่างจากฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดของอาหารเหลวที่ระดับความเค็ม 10 และ 15 ppt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 20 ppt เท่านั้น ที่ให้ผลยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. คัดเลือกความเค็มที่ 20 ppt ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด

ตารางที่ 4-10 ผลของความเค็มต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2

ความเค็ม (ppt)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	-	-	-	-
10	0.13±0.07 [a, 1]	0.13±0.05 [a. 1]	-	-
15	0.18±0.06 [b. 1]	0.10±0.05 [a. 1]	-	-
20	0.40±0.09 [b, 2]	0.40±0.08 [b. 2]	0.13±0.05 [a]	0.13±0.05 [a]
30	-	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-b] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-2] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

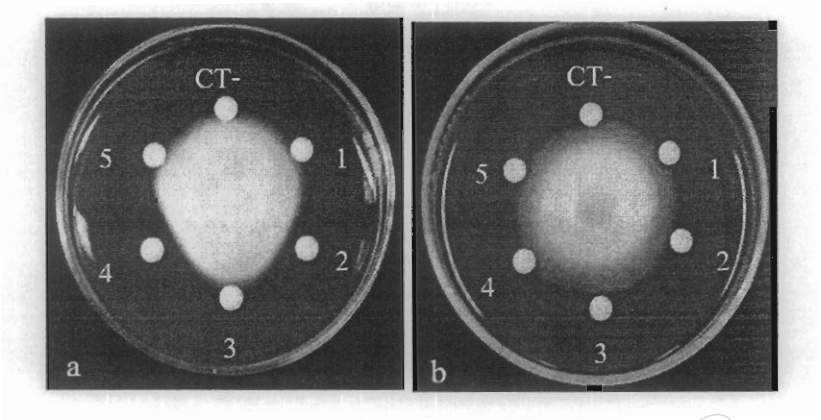
เมื่อศึกษาชนิดของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช พบว่าสารสกัดที่ได้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง ผู้วิจัยจึงทดสอบสารสกัดดังกล่าวอีกครั้ง พบว่าสารสกัดยังคงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช จึงแก้ปัญหาในส่วนที่น่าจะส่งผลต่อการศึกษา ได้แก่ การเตรียมกล้าเชื้อ และการเตรียมอาหารเหลว โดยเตรียมกล้าเชื้อ และอาหารเหลวชุดใหม่ พบว่าสารสกัดที่ได้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเช่นเดิม แม้ว่าการเลี้ยงราทะเลในอาหารเหลว PDB ความเค็ม 20 ppt เป็นสภาวะเดียวกับการศึกษาผลของความเค็มที่สารสกัดให้ผลการยับยั้งดีก็ตาม แต่เมื่อศึกษาชนิดของอาหารเหลวกลับให้ผลการยับยั้งแตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4-4) ทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถคัดเลือกชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไปได้ จากผลการศึกษาในครั้งนี้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสาเหตุที่แท้จริงที่ส่งผลต่อฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าว ซึ่งผู้วิจัยไม่ได้ทำการศึกษา อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรทำการศึกษาต่อ ได้แก่

1. ศึกษาว่าสารสกัดที่ได้สูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพในระหว่างการสกัดหรือไม่ สามารถพิสูจน์โดยการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 ในอาหารเหลว PDB ความเค็ม 20 ppt และทดสอบฤทธิ์ของ Crude culture filtrate กับราสาเหตุโรคพืช ก่อนการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย

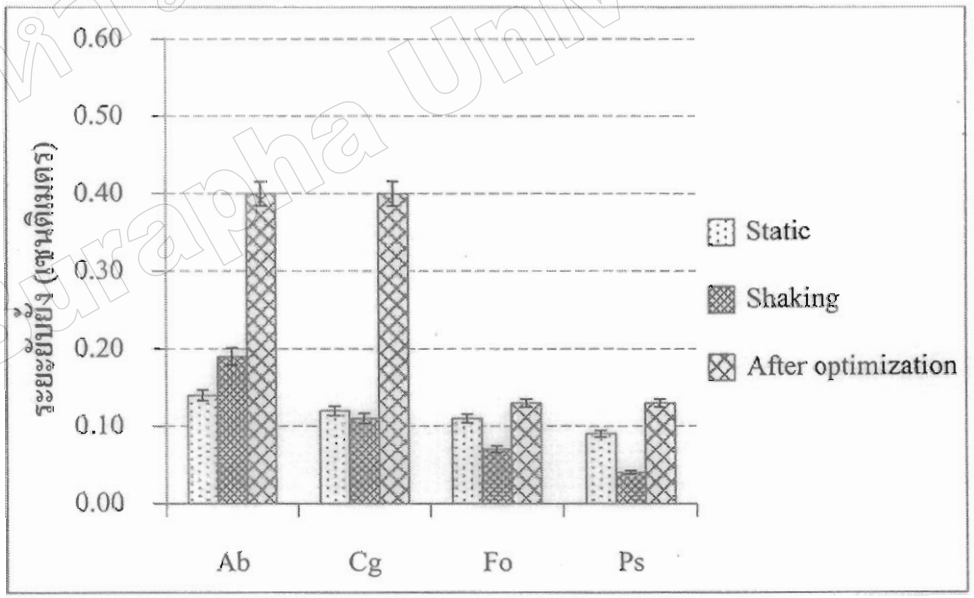
2. ศึกษาว่าราทะเลสูญเสียการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือไม่ โดยทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 ร่วมกับราสาเหตุโรคพืชบนอาหารแข็งอีกครั้ง หากไม่พบการยับยั้งแบบ Antibiosis แสดงให้เห็นว่าราทะเลสายพันธุ์นี้สูญเสียการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3. ยืนยันผลของการศึกษาความเค็มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยทำการศึกษาผลของความเค็ม และผลของชนิดอาหารเหลวที่เหมาะสมอีกครั้ง โดยทำการศึกษาพร้อมกัน เตรียมอาหารเหลวชุดเดียวกัน ใช้สภาวะทางกายภาพอื่น ๆ เหมือนกัน และทดสอบฤทธิ์ของสารยับยั้งที่ได้

เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 กับฤทธิ์ของสารสกัดจากการศึกษาสภาวะตั้งต้น (ภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-11) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับฤทธิ์ของสารสกัดจากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ พบว่าฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 0.5-2 เท่า ส่วนฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 1-3 เท่า



ภาพที่ 4-4 การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 จากการศึกษาผลของความเค็มในอาหารเหลว PDB และผลของชนิดอาหารเหลวที่ความเค็ม 20 ppt; a: ผลของความเค็มในอาหารเหลว (1: 0 ppt, 2: 10 ppt, 3: 15 ppt, 4: 20 ppt, 5: 30 ppt), b: ผลของชนิดอาหารเหลว (1: 0.5xPDB, 2: PDB, 3: YMB, 4: LNB, 5: SDB); CT-: 50% DMSO; สารสกัด 4 ในภาพ a และสารสกัด 2 ในภาพ b เป็นสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราทะเลในสภาวะเดียวกัน



ภาพที่ 4-5 ระยะยับยั้งของสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (After optimization) ต่อการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-11 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2

สภาวะทางกายภาพ		สภาวะที่ศึกษา		ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า)			
		สภาวะตั้งต้น	สภาวะที่เหมาะสม	*A. brassicicola*	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
สภาวะที่ตั้งทิ้งไว้	ความเค็ม (ppt)	15	20				
	อาหารเหลว	PDB	PDB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	5	1.86	2.33	0.18	0.44
	การเขย่า (รอบ/นาที)	0	150				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	28				
	ระยะเวลา (วัน)	7	7				
สภาวะที่เขย่าให้อากาศ	ความเค็ม (ppt)	15	20				
	อาหารเหลว	PDB	PDB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	5	1.11	2.64	0.86	2.25
	การเขย่า (รอบ/นาที)	150	150				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	28				
	ระยะเวลา (วัน)	7	7				

หมายเหตุ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้น) -1

Burapha University

3.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลบนเศษไม้ในป่าชายเลน สายพันธุ์ BUSK 055-1

ศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-12) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 15 ppt มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ นอกจากที่ระดับความเค็มข้างต้น พบว่าสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวความเค็ม 0 ppt มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างกับฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากระดับความเค็ม 15 ppt และสารสกัดจากอาหารเหลวที่ระดับความเค็ม 15 ppt เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* สารสกัดจากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในอาหารเหลวทุกระดับความเค็มให้ผลการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คัดเลือกความเค็ม 15 ppt ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่

ตารางที่ 4-12 ผลของความเค็มต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชโดยราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1

ความเค็ม (ppt)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	0.26±0.05 $^{b, 23}$	0.28±0.06 $^{b, 23}$	-	0.20±0.05 $^{a, 1}$
10	0.28±0.06 $^{b, 23}$	0.24±0.08 $^{b, 2}$	-	0.21±0.06 $^{b, 1}$
15	0.32±0.06 $^{c, 3}$	0.34±0.05 $^{c, 3}$	0.14±0.07 ^{a}	0.23±0.05 $^{b, 1}$
20	0.24±0.08 $^{b, 2}$	0.17±0.07 $^{a, 1}$	-	0.20±0.07 $^{ab, 1}$
30	0.14±0.05 $^{a, 1}$	0.16±0.07 $^{a, 1}$	-	0.20±0.05 $^{a, 1}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-c}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาชนิดของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-13) พบว่าอาหารเหลวที่มีสารอาหารสมบูรณ์ ได้แก่ PDB และ YMB มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ และสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลว PDB เท่านั้นที่พบฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. สูงสุด แตกต่างจากอาหารเหลว 0.5xPDB และYMB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากอาหารเหลว PDB และ YMB แล้ว ยังพบว่าสารสกัดจากอาหารเหลว SDB มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* ไม่แตกต่างกันกับสารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ YMB

จะเห็นว่าสารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ YMB ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดี สารสกัดจากอาหารเหลว PDB ให้ผลการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดีที่สุด ตามด้วยสารสกัดจากอาหารเหลว YMB คัดเลือกอาหารเหลว PDB ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-13 ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อาหารเหลว	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0.5xPDB	0.26±0.08 $^{b.\ 12}$	0.41±0.07 $^{c.\ 2}$	-	0.10±0.05 $^{a.\ 1}$
PDB	0.38±0.04 $^{c.\ 3}$	0.61±0.06 $^{d.\ 3}$	0.16±0.07 $^{a.\ 1}$	0.26±0.07 $^{b.\ 2}$
YMB	0.44±0.12 $^{b,\ 3}$	0.58±0.09 $^{c,\ 3}$	0.10±0.05 $^{a.\ 1}$	0.14±0.05 $^{a,\ 1}$
LNB	0.18±0.06 $^{a.\ 1}$	0.18±0.06 $^{a.\ 1}$	-	-
SDB	0.27±0.08 $^{a,\ 23}$	0.43±0.09 $^{b.\ 2}$	-	-

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-d}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว PDB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-14) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราทะเลในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 ให้ผลการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด และพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างกับสารสกัดจากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 คัดเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6 ใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากอาหารเหลวที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด

ตารางที่ 4-14 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ของอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
5	0.36±0.05 $^{a, 2}$	0.49±0.09 $^{b, 3}$	0.34±0.05 $^{a, 2}$	0.32±0.07 $^{a, 2}$
6	0.40±0.07 $^{a, 2}$	0.54±0.08 $^{b, 3}$	0.48±0.06 $^{b, 3}$	0.49±0.09 $^{b, 3}$
7	0.21±0.06 $^{a, 1}$	0.34±0.08 $^{b, 2}$	0.24±0.05 $^{a, 1}$	0.22±0.09 $^{a, 1}$
8	0.26±0.05 $^{a, 1}$	0.33±0.08 $^{b, 2}$	0.33±0.07 $^{b, 2}$	0.30±0.07 $^{ab, 2}$
9	0.22±0.09 $^{ab, 1}$	0.22±0.10 $^{ab, 1}$	0.31±0.05 $^{b, 2}$	0.20±0.08 $^{a, 1}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของความเร็วในการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที) เลี้ยงราทะเล BUSK 055-1 ในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-15) พบว่าเมื่อเขย่าเลี้ยงราทะเลด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ความเร็วในการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ไม่แตกต่างกับฤทธิ์ยับยั้งที่ได้จากการเขย่าที่ 150 รอบ/นาที เนื่องจากการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ให้ผลการทดสอบดีที่สุดต่อราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดที่ศึกษา จึงคัดเลือกการเขย่าเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่ 150 รอบ/นาที ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-15 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

การเขย่า (รอบ/นาที)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	-	-	-	-
50	-	-	0.11±0.07 $^{a, 1}$	0.11±0.06 $^{a, 1}$
100	0.26±0.07 $^{b, 1}$	0.31±0.07 $^{b, 1}$	0.29±0.09 $^{b, 2}$	0.18±0.06 $^{a, 2}$
150	0.40±0.05 $^{a, 2}$	0.56±0.08 $^{b, 2}$	0.59±0.06 $^{b, 3}$	0.40±0.05 $^{a, 3}$
200	0.31±0.07 $^{a, 1}$	0.44±0.08 $^{b, 1}$	0.47±0.09 $^{b, 3}$	0.40±0.07 $^{b, 3}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในอาหารเหลว PDB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-16) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่มด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด แตกต่างจากการบ่มราทะเลที่อุณหภูมิอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นการบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ที่พบระยะยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับระยะยับยั้งที่ได้จากการบ่มราทะเลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คัดเลือกการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-16 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
22	0.48±0.06 $^{c, 2}$	0.50±0.07 $^{c, 1}$	0.39±0.10 $^{b, 1}$	0.21±0.07 $^{a, 12}$
25	0.58±0.06 $^{b, 3}$	0.67±0.08 $^{c, 2}$	0.56±0.07 $^{b, 3}$	0.42±0.07 $^{a, 3}$
28	0.41±0.07 $^{b, 12}$	0.49±0.07 $^{b, 1}$	0.49±0.09 $^{b, 23}$	0.22±0.10 $^{a, 2}$
30	0.39±0.07 $^{b, 1}$	0.51±0.07 $^{c, 1}$	0.41±0.10 $^{b, 12}$	0.21±0.03 $^{a, 1}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-c}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลา (7, 10, 14, 21 และ 28 วัน) ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4-17) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่มราทะเลเป็นเวลา 7 และ 10 วัน มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด และระยะยับยั้งที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากนั้นฤทธิ์ยับยั้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อบ่มราทะเลเป็นระยะเวลามากกว่า 10 วัน คัดเลือกการบ่มที่ 7 วัน ไปใช้ในการทดลองถัดไป เนื่องจากประหยัดเวลาในการทดลองมากกว่าการบ่มที่ 10 วัน

จากการศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมทั้ง 6 สภาวะ (ตารางที่ 4-18) ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช พบว่าในสภาวะที่มีระดับความเค็ม 15 ppt อาหารเหลว PDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด (ภาพที่ 4-6)

ตารางที่ 4-17 ผลของระยะเวลาเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ระยะเวลา (วัน)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
7	0.54±0.08 $^{ab, 3}$	0.61±0.10 $^{b, 2}$	0.48±0.08 $^{a, 2}$	0.46±0.10 $^{a, 3}$
10	0.58±0.10 $^{ab, 3}$	0.62±0.09 $^{b, 2}$	0.52±0.08 $^{a, 2}$	0.49±0.07 $^{a, 3}$
14	0.34±0.08 $^{b, 2}$	0.23±0.07 $^{a, 1}$	0.37±0.07 $^{b, 1}$	0.37±0.08 $^{b, 2}$
21	0.23±0.05 $^{ab, 1}$	0.18±0.08 $^{a, 1}$	0.31±0.00 $^{b, 1}$	0.28±0.08 $^{b, 1}$
28	0.22±0.05 $^{a, 1}$	0.21±0.12 $^{a, 1}$	0.33±0.09 $^{b, 1}$	0.29±0.07 $^{ab, 12}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งต้น (Static หรือ Shaking) กับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสม (ตารางที่ 4-19 และภาพที่ 4-7) พบว่าเมื่อเปรียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสม กับฤทธิ์ยับยั้งของการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) พบว่าฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 1-3 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 3-4 เท่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-18 สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1

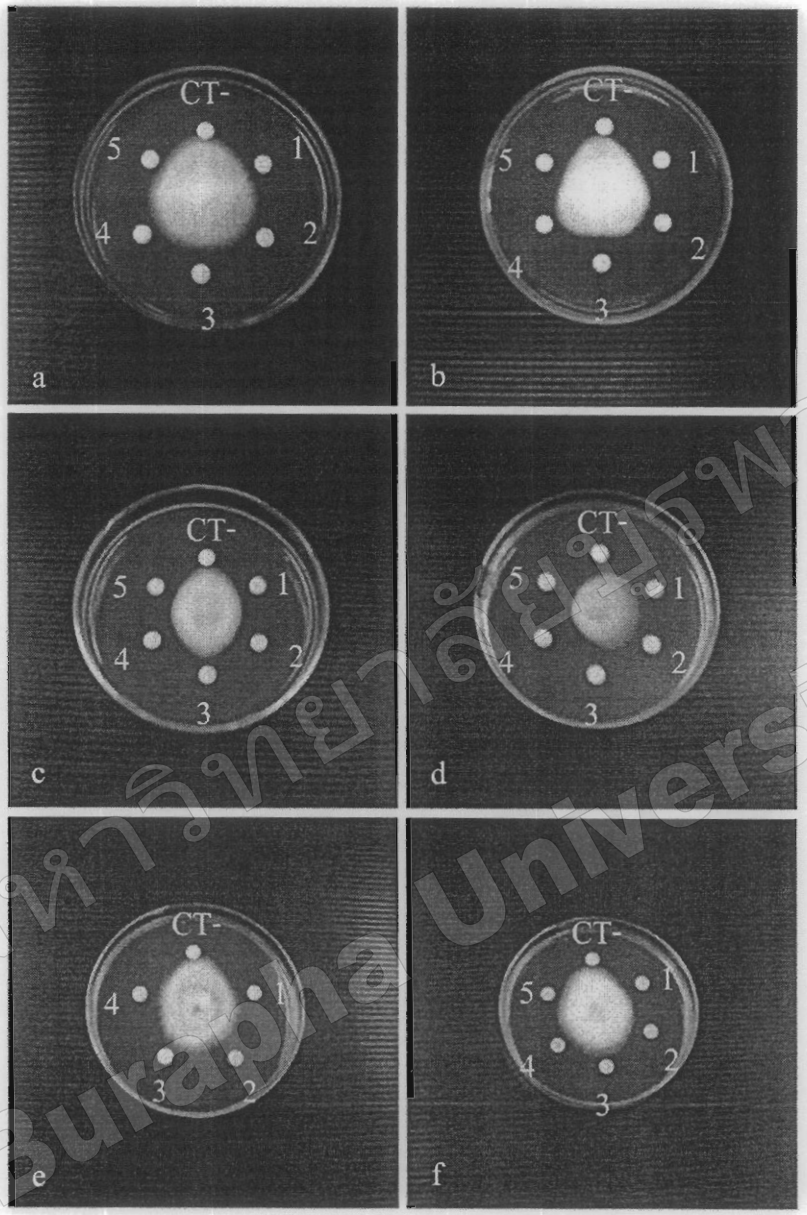
สภาวะทางกายภาพ	สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช				สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.	
ความเค็ม (ppt)	0, 10, 15	0, 15	15	0, 10, 15, 20, 30	0, **15**
ชนิดอาหารเหลว	PDB, YMB, SDB	PDB, YMB	PDB, YMB	PDB	PDB
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5, 6	5, 6	6	6	6
การเขย่า (รอบ/นาที)	150	150	150, 200	150, 200	150
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	25	25, 28	25	25
ระยะเวลา (วัน)	7, 10	7, 10	7, 10	7, 10	**7**, 10

หมายเหตุ PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, SDB: Sabouraud dextrose broth

ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-6 ฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ของสารสกัดที่ได้จากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่สภาวะต่าง ๆ; a: ผลของความเค็มในอาหารเหลว (1: 0 ppt, 2: 10 ppt, 3: 15 ppt, 4: 20 ppt, 5: 30 ppt), b: ผลของชนิดอาหารเหลว (1: PDB, 2: 0.5xPDB, 3: YMB, 4: LNB, 5: SDB), c: ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (1: pH เท่ากับ 5, 2: pH เท่ากับ 6, 3: pH เท่ากับ 7, 4: pH เท่ากับ 8, 5: pH เท่ากับ 9), d: ผลของความเร็วรอบในการเขย่า (1: 0 rpm, 2: 50 rpm, 3: 100 rpm, 4: 150 rpm, 5: 200 rpm), e: ผลของอุณหภูมิในการบ่มราทะเล (1: 22 °C, 2: 25 °C, 3: 28 °C, 4: 30 °C), f: ผลของระยะเวลา (1: 7 วัน, 2: 10 วัน, 3: 14 วัน, 4: 21 วัน, 5: 28 วัน); CT-: 50% DMSO

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

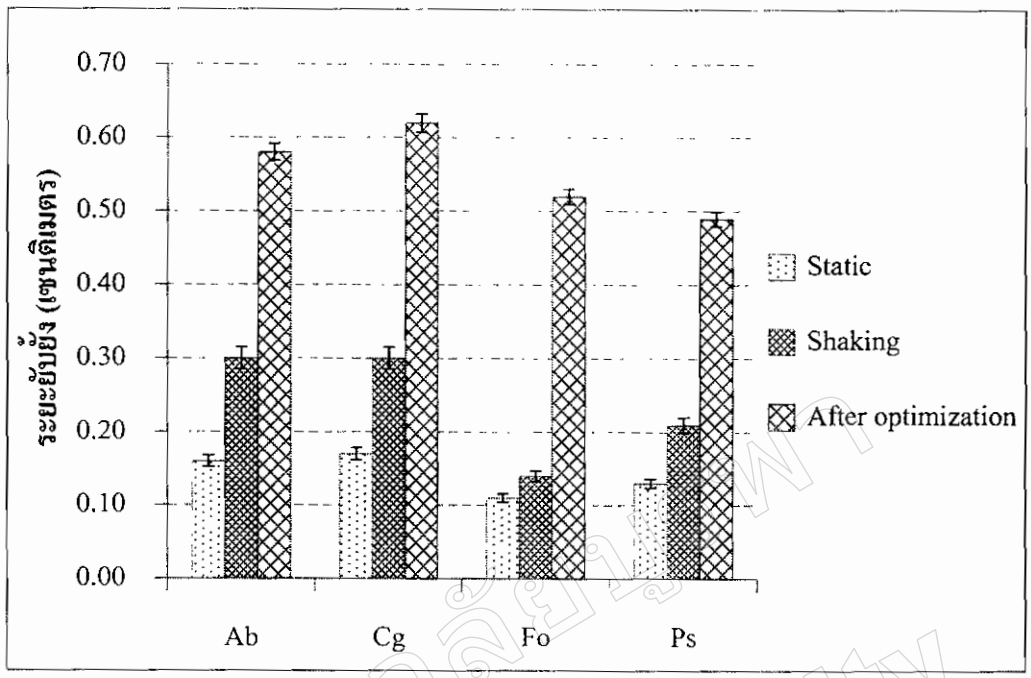
ตารางที่ 4-19 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1

สภาวะทางกายภาพ		สภาวะที่ศึกษา		ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า)			
		สภาวะตั้งต้น	สภาวะที่เหมาะสม	*A. brassicicola*	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
สภาวะที่ตั้งทิ้งไว้	ความเค็ม (ppt)	15	15				
	อาหารเหลว	PDB	PDB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	6	2.63	2.65	3.73	2.77
	การเขย่า (รอบ/นาที)	0	150				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	25				
	ระยะเวลา (วัน)	7	7				
สภาวะที่เขย่าให้อากาศ	ความเค็ม (ppt)	15	15				
	อาหารเหลว	PDB	PDB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	6	0.93	1.07	2.71	1.33
	การเขย่า (รอบ/นาที)	150	150				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	25				
	ระยะเวลา (วัน)	7	7				

หมายเหตุ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้น) -1

Burapha University จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-7 ระยะยับยั้งของสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (After optimization) ต่อการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

3.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน สายพันธุ์ BUEN 121

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 (ตารางที่ 4-20) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 0 ppt ให้ผลยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด และสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวความเค็ม 10 ppt ไม่แสดงความแตกต่างชัดเจนในการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. คัดเลือกความเค็มที่ 0 ppt ใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดที่ศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-20 ผลของความเค็มต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช ของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121

ความเค็ม (ppt)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	0.37±0.07 $^{b, 3}$	0.26±0.05 $^{a, 2}$	0.20±0.05 $^{a, 2}$	0.26±0.07 $^{a, 2}$
10	0.23±0.07 $^{b, 2}$	0.14±0.05 $^{a, 1}$	0.13±0.07 $^{a, 1}$	0.20±0.07 $^{ab, 12}$
15	0.21±0.06 $^{b, 12}$	0.14±0.07 $^{a, 1}$	0.13±0.05 $^{a, 1}$	0.19±0.06 $^{ab, 1}$
20	0.17±0.07 $^{a, 12}$	-	-	0.14±0.05 $^{a, 1}$
30	0.14±0.07 ^{1}	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาชนิดของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 (ตารางที่ 4-21) พบว่าชนิดของอาหารเหลวมีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 เมื่อทดสอบสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว PDB พบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่สูงสุด และระยะยับยั้งที่ได้แตกต่างจากจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลวชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากอาหารเหลว 0.5xPDB มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* สูงสุด รองลงมาเป็นฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB ทำการคัดเลือกอาหารเหลว PDB ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากให้ผลการยับยั้งดีต่อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-21 ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อาหารเหลว	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0.5xPDB	0.47±0.08 [b, 4]	0.17±0.07 [a, 1]	-	0.18±0.04 [a, 12]
PDB	0.38±0.06 [c, 3]	0.30±0.07 [b, 2]	0.19±0.06 [a, 2]	0.23±0.05 [a, 2]
YMB	0.26±0.07 [b, 2]	0.14±0.07 [a, 1]	0.12±0.04 [a, 1]	0.11±0.03 [a, 1]
LNB	0.17±0.07 [1]	-	-	-
SDB	-	-	-	-

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-c] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-3] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว PDB เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-22) พบว่าสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 5, 6 และ 7 ให้ผลการยับยั้ง *A. brassicicola, C. gloeosporioides* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้สูงสุด ยกเว้นการยับยั้ง *F. oxysporum* ที่พบว่าสารสกัดให้ผลการยับยั้งสูงสุดจากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 หรือ 6 เท่านั้น ซึ่งฤทธิ์ยับยั้งที่ได้แตกต่างกับฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ระดับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด คัดเลือกอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปเนื่องจากให้ผลการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ดีที่สุด และเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-22 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
5	0.31±0.06 $^{b, 3}$	0.22±0.04 $^{a, 2}$	0.18±0.06 $^{a, 34}$	0.21±0.03 $^{a, 23}$
6	0.33±0.08 $^{b, 3}$	0.26±0.05 $^{a, 2}$	0.22±0.06 $^{a, 4}$	0.23±0.07 $^{a, 3}$
7	0.36±0.07 $^{c, 3}$	0.23±0.08 $^{b, 2}$	0.14±0.07 $^{a, 23}$	0.22±0.04 $^{b, 23}$
8	0.22±0.04 $^{c, 2}$	0.16±0.05 $^{b, 1}$	0.09±0.03 $^{a, 12}$	0.17±0.05 $^{b, 1}$
9	0.11±0.06 $^{a, 1}$	0.11±0.03 $^{a, 1}$	0.07±0.05 $^{a, 1}$	0.18±0.04 $^{b, 1}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-c}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-4}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที) เลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 (ตารางที่ 4-23) พบว่าการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างจากการเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที คัดเลือกการเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากให้ผลการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดดีที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-23 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

การเขย่า (รอบ/นาที)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	-	-	0.12±0.04 [1]	-
50	0.14±0.05 [a, 1]	0.10±0.05 [a, 1]	0.22±0.04 [b, 2]	0.10±0.05 [a, 1]
100	0.34±0.07 [b, 2]	0.27±0.07 [a, 2]	0.31±0.06 [ab. 3]	0.26±0.05 [a, 3]
150	0.29±0.07 [b, 2]	0.22±0.04 [a, 2]	0.19±0.06 [a, 2]	0.19±0.03 [a, 2]
200	0.12±0.04 [1]	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-b] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-3] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-24) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ด้วยอุณหภูมิ 22, 25 และ 28 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้สูงสุด และสารสกัดจากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่อุณหภูมิ 22 และ 28 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* สูงสุด ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เท่านั้นส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* สูงสุด แตกต่างจากการบ่มที่อุณหภูมิอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบฤทธิ์ของสารสกัดต่ำสุดจากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการคัดเลือกอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากผลของสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ได้สูงสุด

ตารางที่ 4-24 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
22	0.32±0.06 $^{c, 2}$	0.26±0.05 $^{ab, 2}$	0.29±0.07 $^{bc, 2}$	0.22±0.04 $^{a, 2}$
25	0.26±0.07 $^{b, 2}$	0.16±0.05 $^{a, 1}$	0.21±0.03 $^{ab, 1}$	0.19±0.06 $^{a, 12}$
28	0.30±0.05 $^{b, 2}$	0.24±0.05 $^{a. 2}$	0.22±0.04 $^{a, 1}$	0.20±0.05 $^{a, 12}$
30	0.16±0.07 $^{a, 1}$	0.13±0.07 $^{a, 1}$	0.20±0.05 $^{a, 1}$	0.14±0.07 $^{a, 1}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-c}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-2}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลา (2, 4, 7, 10 และ 14 วัน) ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในอาหาร PDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที บ่มที่ 22 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-25) พบว่าสารสกัดจากการบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 4 วัน ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด และระยะยับยั้งที่ได้แตกต่างจากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่ระยะเวลาอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากระยะเวลาข้างต้นแล้วยังพบว่าการบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 7 และ 10 วัน ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างจากการบ่มเป็นเวลา 4 วัน

การบ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 เป็นเวลา 4 วัน ให้ผลของสารสกัดดีที่สุดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด ขณะที่ระยะเวลาในการบ่มเท่ากับ 7 วัน ให้ผลของสารสกัดดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพียง 3 ชนิด จึงคัดเลือกระยะเวลาในการบ่มที่ 4 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-25 ผลของระยะเวลาเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ระยะเวลา (วัน)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
2	-	-	0.10±0.05 [I]	-
4	0.31±0.07 [b, 2]	0.23±0.07 [a, 2]	0.28±0.06 [ab, 2]	0.22±0.04 [a, 2]
7	0.27±0.07 [b, 2]	0.21±0.06 [b, 2]	0.24±0.05 [b, 2]	0.12±0.04 [a, 1]
10	0.10±0.08 [ab, 1]	0.17±0.07 [b, 2]	0.10±0.05 [ab, 1]	-
14	-	0.10±0.07 [1]	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-b] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-3] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4-26 สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด ส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกัน สภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดีสุด ได้แก่ ความเค็ม 0 ppt อาหารเหลว PDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที บ่มที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้จากสภาวะตั้งต้น (Static หรือ Shaking) และภายหลังจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในสภาวะเหมาะสม (ตารางที่ 4-27 และภาพที่ 4-8) พบว่าฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสมส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกับฤทธิ์ของสารสกัดจากการศึกษาสภาวะตั้งต้น ที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที (Shaking) ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* ที่เพิ่มขึ้นประมาณ 0.3 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 0.5-2 เท่า

ตารางที่ 4-26 สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121

สภาวะทางกายภาพ	สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช				สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.	
ความเค็ม (ppt)	0	0	0	0, 10	0
ชนิดอาหารเหลว	0.5xPDB	PDB	PDB	PDB	PDB
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5, 6, 7	5, 6, 7	5, 6	5, 6, 7	**5**, 6
การเขย่า (รอบ/นาที)	100, 150	100, 150	100	100	100
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	22, 25, 28	22, 28	22	22, 25, 28	22
ระยะเวลา (วัน)	4 , 7	4, 7, 10	4, 7	4	4

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth

ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

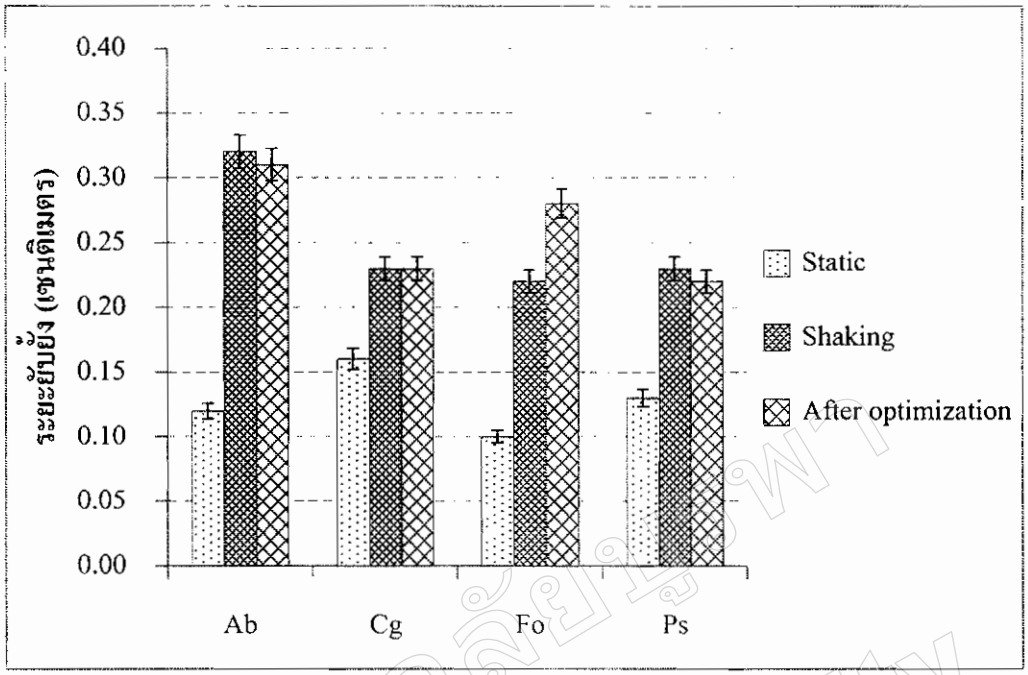
ตารางที่ 4-27 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121

สภาวะทางกายภาพ		สภาวะที่ศึกษา		ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า)			
		สภาวะตั้งต้น	สภาวะที่เหมาะสม	*A. brassicicola*	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
สภาวะที่ตั้งทิ้งไว้	ความเค็ม (ppt)	0	0	1.58	0.44	1.80	0.70
	อาหารเหลว	PDB	PDB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	5				
	การเขย่า (รอบ/นาที)	0	100				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	22				
	ระยะเวลา (วัน)	4	4				
สภาวะที่เขย่าให้อากาศ	ความเค็ม (ppt)	0	0	0.03	0	0.27	0.04
	อาหารเหลว	PDB	PDB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	5				
	การเขย่า (รอบ/นาที)	150	100				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	22				
	ระยะเวลา (วัน)	4	4				

หมายเหตุ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้น) -1

ศูนย์วิทยทรัพยากร Burapha University



ภาพที่ 4-8 ระยะยับยั้งของสารสกัดของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสม (After optimization) ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

3.5 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน สายพันธุ์ BUEN 830

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหาร PDB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-28) พบว่าสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวความเค็ม 10 ppt และ 15 ppt มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* สูงสุด และสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 จากอาหารเหลวทุกระดับความเค็มไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. คัดเลือกความเค็ม 10 ppt ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไปเนื่องจากสารสกัดให้ผลการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่สูงสุด และที่ระดับความเค็มดังกล่าว พบค่าเฉลี่ยของระยะยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* สูงสุด และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากชุดข้อมูลที่ได้ ต่ำกว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากสารสกัดที่ระดับความเค็ม 15 ppt

ตารางที่ 4-28 ผลของความเค็มต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช โดยราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830

ความเค็ม (ppt)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	0.10±0.07 [1]	-	-	-
10	0.23±0.05 [a, 2]	0.21±0.03 [a, 1]	-	-
15	0.18±0.06 [a, 2]	0.17±0.08 [a, 1]	-	-
20	0.11±0.06 [1]	-	-	-
30	0.10±0.07 [1]	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-b] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-2] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาชนิดของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-29) พบว่าอาหารเหลว SDB ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด และฤทธิ์ยับยั้งที่พบแตกต่างจากฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดจากอาหารเหลว SDB เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. สารสกัดจากอาหารเหลว YMB มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ได้เป็นอันดับที่สอง คัดเลือกอาหารเหลว SDB ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-29 ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อาหารเหลว	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0.5xPDB	-	-	-	-
PDB	0.10±0.05 [a, 1]	0.12±0.06 [a, 1]	-	-
YMB	0.16±0.05 [a, 2]	0.19±0.07 [a, 2]	0.17±0.08 [a, 1]	-
LNB	-	-	-	-
SDB	0.27±0.05 [b, 3]	0.28±0.04 [b, 3]	0.30±0.09 [b, 2]	0.11±0.06 [a]

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-b] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-3] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ในอาหารเหลว SDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-30) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 และ 7 มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่สูงสุด แต่สารสกัดจากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เท่านั้นที่พบฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. และพบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *F. oxysporum* ไม่แตกต่างกับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6 และ 7 คัดเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 ใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดี และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นดังกล่าวใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว SDB ความเค็ม 10 ppt ซึ่งจะช่วยให้การเตรียม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อาหารเหลวสะดวกยิ่งขึ้น

ตารางที่ 4-30 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
5	0.32±0.08 $^{b, 3}$	0.17±0.07 $^{a, 2}$	0.29±0.10 $^{b, 2}$	-
6	0.37±0.07 $^{c, 3}$	0.26±0.05 $^{b, 3}$	0.37±0.05 $^{c, 2}$	0.11±0.07 ^{a}
7	0.34±0.07 $^{a, 3}$	0.31±0.09 $^{a, 3}$	0.36±0.10 $^{a, 2}$	-
8	0.21±0.06 $^{b, 2}$	0.10±0.07 $^{a, 12}$	0.12±0.08 $^{a, 1}$	-
9	0.10±0.07 $^{a, 1}$	0.09±0.06 $^{a, 1}$	0.13±0.08 $^{a, 1}$	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-c}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาความเร็วรอบในการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที) เลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในอาหารเหลว SDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-31) พบว่าเมื่อเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด และพบว่าสารสกัดที่ได้จากการเขย่าด้วยความเร็ว 100 และ 200 รอบ/นาที มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติกับฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้จากการเขย่าที่ 150 รอบ/นาที คัดเลือกความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-31 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

การเขย่า (รอบ/นาที)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	-	-	-	-
50	-	0.10 ± 0.05^{1}	-	-
100	$0.29\pm0.06^{a,2}$	$0.29\pm0.09^{a,2}$	$0.28\pm0.08^{a,1}$	-
150	$0.36\pm0.05^{b,3}$	$0.32\pm0.06^{b,2}$	$0.38\pm0.08^{b,2}$	0.10 ± 0.09^{a}
200	$0.20\pm0.07^{a,1}$	$0.26\pm0.05^{ab,2}$	$0.31\pm0.07^{b,1}$	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

$^{1-2}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้ในการบ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในอาหารเหลว SDB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน ในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-32) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดค่อนข้างหลากหลาย สารสกัดจากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่ 25 และ 28 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* สูงสุด สารสกัดจากการบ่มราเอนโดไฟท์ทุก ๆ อุณหภูมิไม่ผลในการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp.

จะเห็นได้ว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่มที่ 25 และ 28 องศาเซลเซียส มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ได้สูงสุด และฤทธิ์ยับยั้งที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ได้คัดเลือกการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปเนื่องจากช่วยประหยัดพลังงานจากการปรับอุณหภูมิของเครื่อง Incubator shaker

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-32 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
22	0.22±0.08 $^{b, 1}$	0.29±0.10 $^{b, 12}$	0.11±0.06 $^{a, 1}$	-
25	0.36±0.08 $^{b, 2}$	0.32±0.08 $^{b, 2}$	0.33±0.05 $^{b, 2}$	-
28	0.33±0.05 $^{a, 2}$	0.29±0.07 $^{a, 12}$	0.31±0.07 $^{a, 2}$	-
30	0.18±0.04 $^{b, 1}$	0.20±0.08 $^{b, 1}$	0.10±0.05 $^{a, 1}$	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-2}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลา (2, 4, 7, 10 และ 14 วัน) ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในอาหารเหลว SDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-33) พบว่าสารสกัดจากการบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 4 วัน และ 7 วัน มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด ยกเว้นการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ที่พบฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดจากการทดสอบสารสกัดของราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วันเท่านั้น คัดเลือกระยะเวลาในการบ่มที่ 7 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดี

ตารางที่ 4-33 ผลของระยะเวลาเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ระยะเวลา (วัน)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
2	0.16±0.08 [a, 1]	0.10±0.07 [a, 1]	-	-
4	0.33±0.07 [b, 2]	0.30±0.07 [b, 2]	0.29±0.06 [b, 1]	0.12±0.04 [a, 1]
7	0.37±0.09 [b, 2]	0.36±0.05 [b, 2]	0.34±0.07 [b, 1]	0.19±0.03 [a, 2]
10	0.17±0.07 [a, 1]	0.13±0.05 [a, 1]	-	-
14	-	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

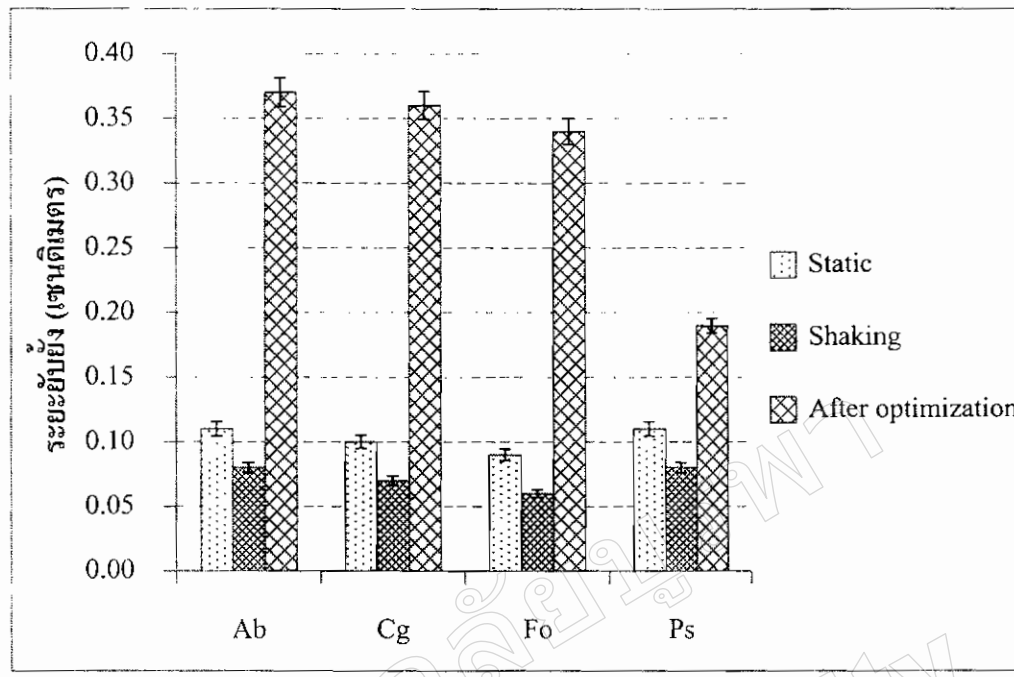
- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-b] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-2] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-34 แสดงสภาวะทางกายภาพเหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่ส่งผลให้สารยับยั้งที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันค่อนข้างน้อย และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งที่ให้ผลของสารสกัดดีต่อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ คือ ความเค็ม 10 ppt อาหารเหลว SDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม กับการเลี้ยงในสภาวะตั้งต้น (ตารางที่ 4-35 และภาพที่ 4-9) พบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้น ประมาณ 1-3 เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งที่จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม กับการศึกษาในสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นประมาณ 4-5 เท่า ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ที่พบฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่า



ภาพที่ 4-9 ระยะยับยั้งของสารสกัดของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (After optimization) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-34 สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830

สภาวะทางกายภาพ	สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช				สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.	
ความเค็ม (ppt)	10, 15	10, 15	-	-	**10**, 15
ชนิดอาหารเหลว	SDB	SDB	SDB	SDB	SDB
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5, 6, 7	6, 7	5, 6, 7	6	**6**, 7
การเขย่า (รอบ/นาที)	150	100, 150, 200	150	150	150
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25, 28	22, 25, 28	25, 28	-	25, **28**
ระยะเวลา (วัน)	4, 7	4, 7	4, 7	7	7

หมายเหตุ SDB: Sabouraud dextrose broth

ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

- สภาวะทางกายภาพที่ศึกษาไม่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

Burapha University มหาวิทยาลัยบูรพา

ตารางที่ 4-35 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830

สภาวะทางกายภาพ		สภาวะที่ศึกษา		ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า)			
		สภาวะตั้งต้น	สภาวะที่เหมาะสม	*A. brassicicola*	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
สภาวะที่ตั้งทิ้งไว้	ความเค็ม (ppt)	0	10	2.36	2.60	2.78	0.73
	อาหารเหลว	PDB	SDB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	6				
	การเขย่า (รอบ/นาที)	0	150				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	28				
	ระยะเวลา (วัน)	4	7				
สภาวะที่เขย่าให้อากาศ	ความเค็ม (ppt)	0	10	3.63	4.14	4.67	1.38
	อาหารเหลว	PDB	SDB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	6				
	การเขย่า (รอบ/นาที)	150	150				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	28				
	ระยะเวลา (วัน)	4	7				

หมายเหตุ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้น) -1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.6 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน สายพันธุ์ BUEN 834

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-36) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลว PDB ความเค็ม 10 ppt ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* สูงสุด แตกต่างจากฤทธิ์ยับยั้งที่ระดับความเค็มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นการยับยั้ง *F. oxysporum* ที่ผลการยับยั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับการยับยั้งของสารสกัดที่ความเค็ม 0-30 ppt สารสกัดจากอาหารเหลวทุกระดับความเค็มไม่มีผลในการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. คัดเลือกความเค็ม 10 ppt ใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ได้ดี

ตารางที่ 4-36 ผลของความเค็มต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชโดยราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834

ความเค็ม (ppt)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	0.21±0.06 $^{b, 2}$	-	0.14±0.06 $^{a, 1}$	-
10	0.31±0.07 $^{c, 3}$	0.24±0.05 $^{b, 2}$	0.16±0.05 $^{a, 1}$	-
15	0.10±0.06 $^{b, 2}$	0.10±0.07 $^{a, 1}$	0.13±0.07 $^{a, 1}$	-
20	0.14±0.05 $^{a, 1}$	0.11±0.06 $^{a, 1}$	0.10±0.05 $^{a, 1}$	-
30	0.12±0.06 $^{a, 1}$	0.10±0.05 $^{a, 1}$	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-c}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาชนิดของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วันเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-37) พบว่าสารสกัดจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว YMB ให้ผลดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ และสารสกัดจากอาหารเหลว YMB เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *Pestalotiopsis* sp. สูงสุด แตกต่างจากสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สารสกัดจากอาหารเหลว YMB ให้ผลการยับยั้งดีต่อราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเป็นอันดับแรก รองลงมาเป็นสารสกัดจากอาหารเหลว 0.5xPDB และ PDB ที่ให้ผลดีต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ ส่วนสารสกัดจากอาหารเหลวอื่น ๆ ได้แก่ LNB และ SDB มีผลต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 ชนิดค่อนข้างน้อย คัดเลือกอาหารเหลว YMB ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-37 ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อาหารเหลว	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0.5xPDB	0.38±0.04 $^{c, 2}$	0.28±0.06 $^{b, 2}$	0.22±0.04 $^{a, 2}$	-
PDB	0.33±0.08 $^{b, 2}$	0.28±0.10 $^{b, 2}$	0.13±0.05 $^{a, 1}$	-
YMB	0.44±0.10 $^{c, 3}$	0.32±0.09 $^{b, 2}$	0.20±0.09 $^{a, 1}$	0.11±0.07 ^{a}
LNB	0.20±0.07 $^{a, 1}$	0.16±0.12 $^{a, 1}$	-	-
SDB	0.20±0.05 ^{1}	-	-	-

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-c}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว YMB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-38) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 และ 7 มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด ยกเว้น *A. brassicicola* ที่พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลว YMB มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 มีฤทธิ์ยับยั้งไม่แตกต่างกับค่าความเป็นกรด-ด่างข้างต้น และสารสกัดจากอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นเท่ากับ 6 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp.

อาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6 เท่านั้น ที่ให้ผลของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดที่ดี จึงคัดเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6 ใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-38 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
5	0.31±0.06 $^{c, 3}$	0.24±0.05 $^{b, 2}$	0.18±0.06 $^{a, 1}$	-
6	0.33±0.07 $^{c, 3}$	0.26±0.05 $^{b, 23}$	0.22±0.04 $^{b, 12}$	0.10±0.07 ^{a}
7	0.36±0.07 $^{b, 3}$	0.30±0.07 $^{ab, 3}$	0.24±0.05 $^{a, 2}$	-
8	0.22±0.04 $^{b, 2}$	0.16±0.05 $^{a, 1}$	-	-
9	0.16±0.05 $^{b, 1}$	0.11±0.03 $^{a, 1}$	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

$^{a-c}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-3}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาความเร็วในการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที) เลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-39) พบว่าการเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 และ 150 รอบ/นาที มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด และสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์โดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เท่านั้นมีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* สูงสุด คัดเลือกการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 4-39 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

การเขย่า (รอบ/นาที)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
0	-	-	0.12±0.06 [1]	-
50	0.16±0.05 [a, 12]	-	0.14±0.05 [a, 12]	-
100	0.19±0.06 [a, 2]	0.37±0.08 [b, 2]	0.24±0.07 [a, 3]	0.20±0.07 [a, 1]
150	0.39±0.06 [c, 3]	0.32±0.08 [c, 12]	0.19±0.06 [b, 23]	0.11±0.07 [a, 1]
200	0.13±0.05 [b, 1]	0.29±0.06 [a, 1]	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-c] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-3] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน ในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 4-40) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของสารสกัดในการทดสอบราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่ 30 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์

ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *Pestalotiopsis* sp. ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการบ่มด้วยอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส คัดเลือกการบ่มราเอนโดไฟท์ที่ 28 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4-40 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
22	0.19±0.06 [1]	-	-	-
25	0.32±0.06 [b, 2]	0.21±0.06 [a, 1]	-	-
28	0.30±0.07 [c, 2]	0.29±0.06 [bc, 2]	0.23±0.05 [b]	0.16±0.07 [a, 1]
30	0.14±0.05 [a, 1]	-	-	0.21±0.06 [b, 1]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

[a-c] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-3] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลา (2, 4, 7, 10 และ 14 วัน) ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4-41) พบว่าสารสกัดจากการบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 7 วัน ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด แตกต่างจากการบ่มที่ระยะเวลาอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นการยับยั้ง *A. brassicicola* ที่พบฤทธิ์ยับยั้งไม่แตกต่างกับการบ่มเป็นเวลา 4 วัน คัดเลือกการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป เนื่องจากสารสกัดให้ผลการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดดีที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-41 ผลของระยะเวลาเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ระยะเวลา (วัน)	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
2	0.12±0.06 [1]	-	-	-
4	0.28±0.06 [b, 2]	0.27±0.07 [b, 2]	0.19±0.06 [a, 2]	0.17±0.05 [a, 1]
7	0.33±0.07 [b, 2]	0.33±0.07 [b, 3]	0.27±0.05 [a, 3]	0.22±0.04 [a, 2]
10	0.14±0.07 [a, 1]	0.12±0.04 [a, 1]	0.13±0.05 [a, 1]	0.18±0.06 [a, 1]
14	-	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

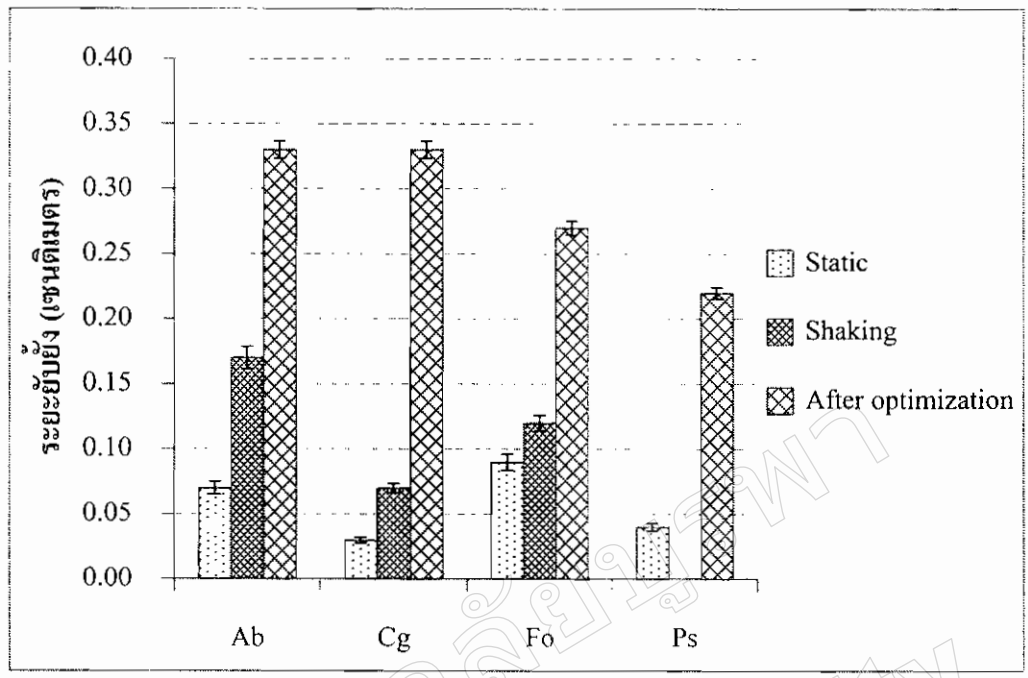
[a-c] ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1-5] ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-42 แสดงสภาวะทางกายภาพเหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด คือ ความเค็ม 10 ppt อาหารเหลว YMB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เปรียบเทียบฤทธิ์ที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งต้น (Static หรือ Shaking) กับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสม (ตารางที่ 4-43 และภาพที่ 4-10) จากการเปรียบเทียบระยะยับยั้งที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสม กับสารสกัดจากสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ พบว่าฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 10 เท่า ส่วนฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นเพิ่มขึ้นประมาณ 2-5 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 1-4 เท่า ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ที่เพิ่มขึ้นจากไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง เป็นมีฤทธิ์ยับยั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-10 ระยะยับยั้งของสารสกัดของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสม (After optimization) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-42 สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834

สภาวะทางกายภาพ	สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช				สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.	
ความเค็ม (ppt)	10	10	0, 10, 15, 20	-	10
ชนิดอาหารเหลว	YMB	0.5xPDB, PDB, YMB	0.5xPDB, YMB	YMB	YMB
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5, 6, 7	6, 7	6, 7	6	6
การเขย่า (รอบ/นาที)	150	100, 150	100, 150	100	100, **150**
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25, 28	28	28	28, 30	28
ระยะเวลา (วัน)	4, 7	7	7	7	7

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth,

ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

- สภาวะทางกายภาพที่ศึกษาไม่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-43 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834

สภาวะทางกายภาพ		สภาวะที่ศึกษา		ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า)			
		สภาวะตั้งต้น	สภาวะที่เหมาะสม	*A. brassicicola*	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
สภาวะที่ตั้งทิ้งไว้	ความเค็ม (ppt)	0	10	3.71	10.00	2.00	4.50
	อาหารเหลว	PDB	YMB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	6				
	การเขย่า (รอบ/นาที)	0	100				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	28				
	ระยะเวลา (วัน)	4	7				
สภาวะที่เขย่าให้อากาศ	ความเค็ม (ppt)	0	10	0.94	3.71	1.25	UC
	อาหารเหลว	PDB	YMB				
	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	5	6				
	การเขย่า (รอบ/นาที)	150	100				
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	28				
	ระยะเวลา (วัน)	4	7				

หมายเหตุ UC (Uncalculated): ไม่สามารถคำนวณค่าได้, ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion,
ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้น) -1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.7 การศึกษาเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลนสายพันธุ์ต่าง ๆ

ตารางที่ 4-44 แสดงสภาวะเหมาะสมที่คัดเลือกจากผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 ชนิดที่ดี พบว่าความเค็มที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลส่วนใหญ่ เท่ากับ 15 ppt ยกเว้นราทะเลสายพันธุ์ BUCS 032-2 ใช้ความเค็มที่เหมาะสมเท่ากับ 20 ppt ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ใช้ความเค็มอยู่ในช่วงต่ำ ๆ ไม่เกิน 10 ppt และพบว่าราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ผลิตสารยับยั้งประสิทธิภาพสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่มีความเค็ม (0 ppt) และอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลและราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่เป็นอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (Rich nutrient media) ได้แก่ PDB, YMB และ SDB ส่วนอาหารเหลวที่มีสารอาหารต่ำ (Low nutrient media) ไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชอยู่ระหว่าง 5-6 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 100-150 รอบ/นาที โดยราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ใช้การเขย่าที่เหมาะสมด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่คือ 28 องศาเซลเซียส ยกเว้นราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 22 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมเท่ากับ 7 วัน มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่ ยกเว้นราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 มีระยะเวลาที่เหมาะสมเท่ากับ 4 วัน

3.8 การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากราป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่ได้ภายหลังการเลี้ยงราป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์ในสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษา (ตารางที่ 4-45) พบว่าราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดีเป็นอันดับแรก เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากราป่าชายเลนสายพันธุ์อื่น ๆ สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* สูงสุด และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดีเป็นอันดับที่สอง เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากราป่าชายเลนสายพันธุ์อื่น ๆ คัดเลือกราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่ให้ผลการยับยั้ง ราสาเหตุโรคพืชสูงสุดไปศึกษารูปแบบการเจริญ ขยายขนาดการหมัก และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 4-44 สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์

สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสม	ราจากป่าชายเลน					
	ราทะเล			ราเอนโดไฟท์		
	BUCS 004	BUCS 032-2	BUSK 055-1	BUEN 121	BUEN 830	BUEN 834
ความเค็ม (ppt)	15	20	15	0	10	10
อาหารเหลว	YMB	-	PDB	PDB	SDB	YMB
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	6	-	6	5	6	6
การเขย่า (รอบ/นาที)	100	-	150	100	150	150
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28	-	25	22	28	28
ระยะเวลา (วัน)	7	-	7	4	7	7

หมายเหตุ - ไม่ได้ทำการศึกษา

ตารางที่ 4-45 ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงราจากป่าชายเลนภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสม

สารสกัดจากราป่าชายเลน	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
BUCS 004	0.17±0.05 $^{a.\ 1}$	0.20±0.07 $^{a.\ 1}$	0.17±0.07 $^{a.\ 1}$	0.14±0.05 $^{a.\ 1}$
BUSK 055-1	0.58±0.10 $^{ab.\ 4}$	0.62±0.09 $^{b.\ 3}$	0.52±0.08 $^{a.\ 4}$	0.49±0.07 $^{a.\ 2}$
BUEN 121	0.31±0.07 $^{b,\ 23}$	0.23±0.07 $^{a.\ 1}$	0.28±0.06 $^{ab,\ 23}$	0.22±0.04 $^{a.\ 1}$
BUEN 830	0.37±0.09 $^{b.\ 3}$	0.36±0.05 $^{b.\ 2}$	0.34±0.07 $^{b.\ 3}$	0.19±0.03 $^{a.\ 1}$
BUEN 834	0.33±0.07 $^{b,\ 23}$	0.33±0.07 $^{b.\ 2}$	0.27±0.05 $^{a,\ 2}$	0.22±0.04 $^{a.\ 1}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-b}$ ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$^{1-4}$ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

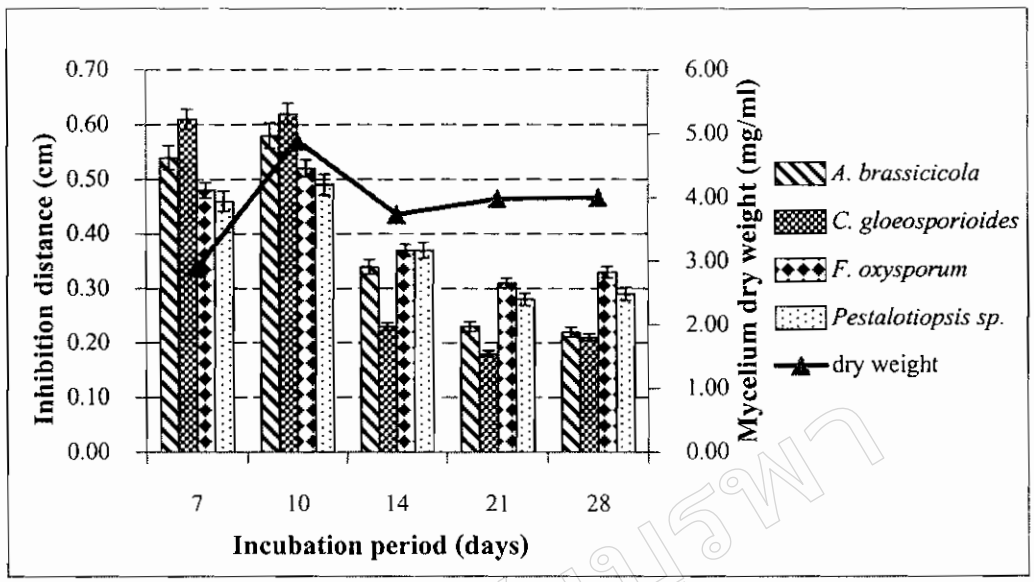
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ กับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลน

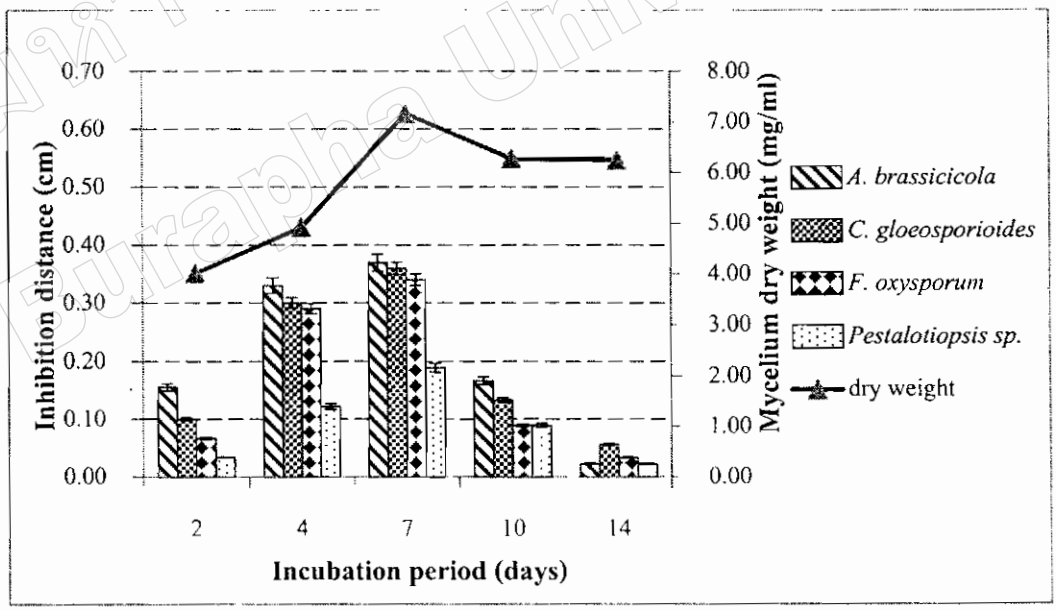
จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง กับฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังการหาสภาวะเหมาะสม ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 (ภาพที่ 4-11) พบว่าราทะเลมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน และเมื่อบ่มราทะเลมากกว่า 10 วัน พบน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเล็กน้อยก่อนจะคงที่เมื่อบ่มเป็นเวลา 14-28 วัน ส่วนฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดพบว่าเมื่อบ่มราทะเลเป็นเวลา 7-10 วัน พบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชสูงสุด ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวเป็นระยะเวลาเดียวกับที่ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูง ส่วนสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มากกว่า 10 วัน พบว่าฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่ได้อ่อนลง

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง กับฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังการหาสภาวะเหมาะสม ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 (ภาพที่ 4-12) พบว่าราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูง เมื่อบ่มเป็นเวลามากกว่า 4 วัน และพบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ระยะเวลา 7 วัน หลังจากบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลามากกว่า 7 วัน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง และพบน้ำหนักเซลล์แห้งคงที่เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 10-14 วัน ส่วนฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้นหลังจากบ่มราเอนโดไฟท์มากกว่า 2 วัน และพบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดสูงสุด เมื่อบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกันกับที่พบว่าราเอนโดไฟท์มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด และหลังจากบ่มราเอนโดไฟท์มากกว่า 7 วัน ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งลดลง และพบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดต่ำสุดเมื่อบ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เป็นเวลา 14 วัน

จะเห็นได้ว่าการเจริญของราจากป่าชายเลน มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และพบว่าเมื่อราจากป่าชายเลนมีการเจริญสูง เป็นช่วงเวลาเดียวกับที่ราจากป่าชายเลนผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชสูง



ภาพที่ 4-11 ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร) และน้ำหนักแห้งเซลล์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในสภาวะที่เหมาะสม (15 ppt, PDB, Initial pH 6, 150 rpm, 25 °C) เป็นเวลา 7, 10, 14, 21 และ 28 วัน



ภาพที่ 4-12 ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร) และน้ำหนักแห้งเซลล์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในสภาวะที่เหมาะสม (10 ppt, SDB, Initial pH 6, 150 rpm, 28 °C) เป็นเวลา 2, 4, 7, 10 และ 14 วัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. การศึกษาผลของการใช้สภาวะเหมาะสมกับการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในการขยายขนาดการหมัก (Scale up)

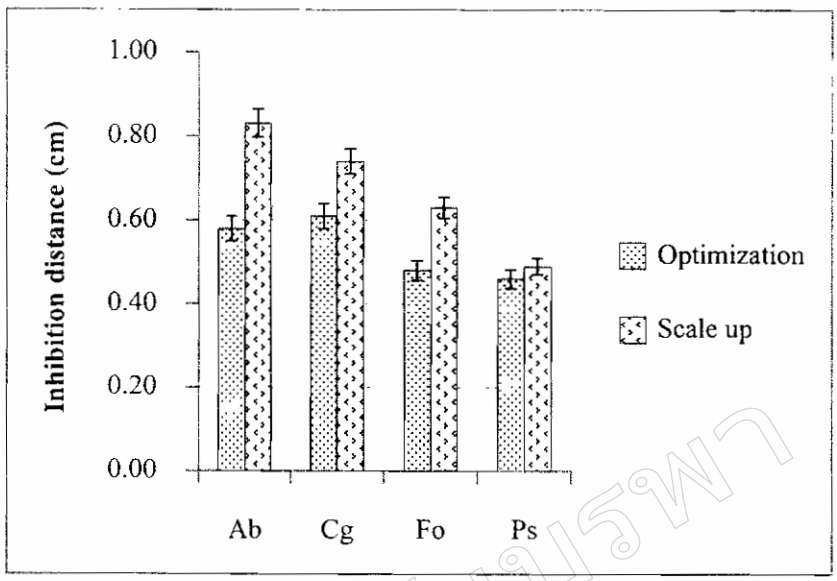
การศึกษาผลผลิตในรูปของสารสกัด จากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ด้วยสภาวะเหมาะสมในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ก่อนการขยายขนาดการหมัก) และในอาหารเหลวปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ภายหลังขยายขนาดการหมัก) คำนวณผลผลิตที่ได้ต่อปริมาตรของอาหารเหลวที่ใช้ (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ตารางที่ 4-46) พบว่าสารสกัดที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมักแตกต่างจากภายหลังการขยายขนาดการหมักโดยพบว่าราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ให้ผลผลิตก่อนและหลังขยายขนาดการหมักเท่ากับ 240 มิลลิกรัม/ลิตร และ 274 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ให้ผลผลิตก่อนและหลังขยายขนาดการหมักเท่ากับ 211 มิลลิกรัม/ลิตร และ 236 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4-46 ผลผลิต (Yield) ของราป่าชายเลนจากการศึกษาก่อนและหลังขยายขนาดการหมัก

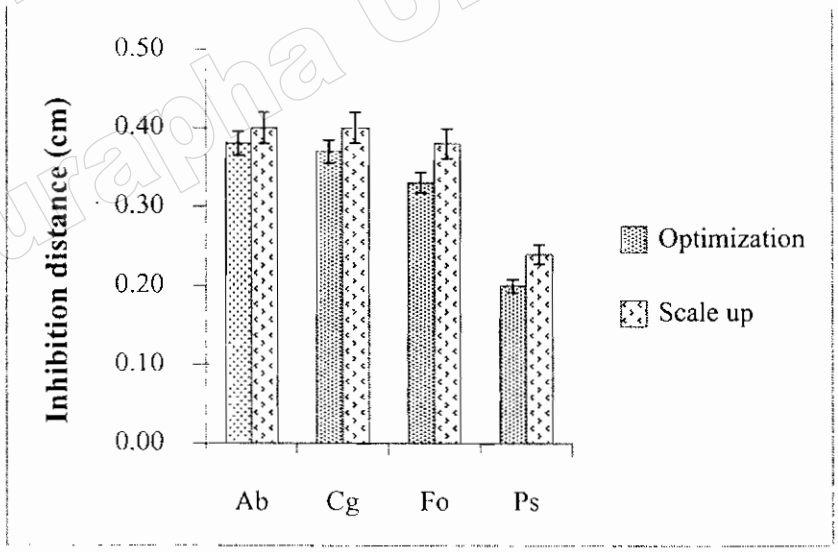
สภาวะเหมาะสมที่ศึกษา	ราจากป่าชายเลน	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม/ลิตร)
ก่อนขยายขนาดการหมัก	BUSK 055-1	240±11
	BUEN 830	211±9
หลังขยายขนาดการหมัก	BUSK 055-1	274±0
	BUEN 830	236±0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมักและภายหลังการขยายขนาดการหมัก พบว่าภายหลังการขยายขนาดการหมัก สารสกัดที่ได้ มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าสารสกัดที่ได้ภายหลังการขยายขนาดการหมักราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 พบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 0.2-0.4 เท่า ยกเว้นการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ของสารสกัดที่ได้ภายหลังขยายขนาดการหมักที่พบฤทธิ์ยับยั้งใกล้เคียงกับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมัก (ภาพที่ 4-13 และภาพที่ 4-15) แต่สารสกัดที่ได้ภายหลังการขยายขนาดการหมักราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ใกล้เคียงกับสารสกัดที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมัก ส่วนฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp.ของสารสกัดที่ได้ภายหลังการขยายขนาดการหมักสูงกว่าฤทธิ์ยับยั้งที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมักไม่มากนัก (ภาพที่ 4-14)

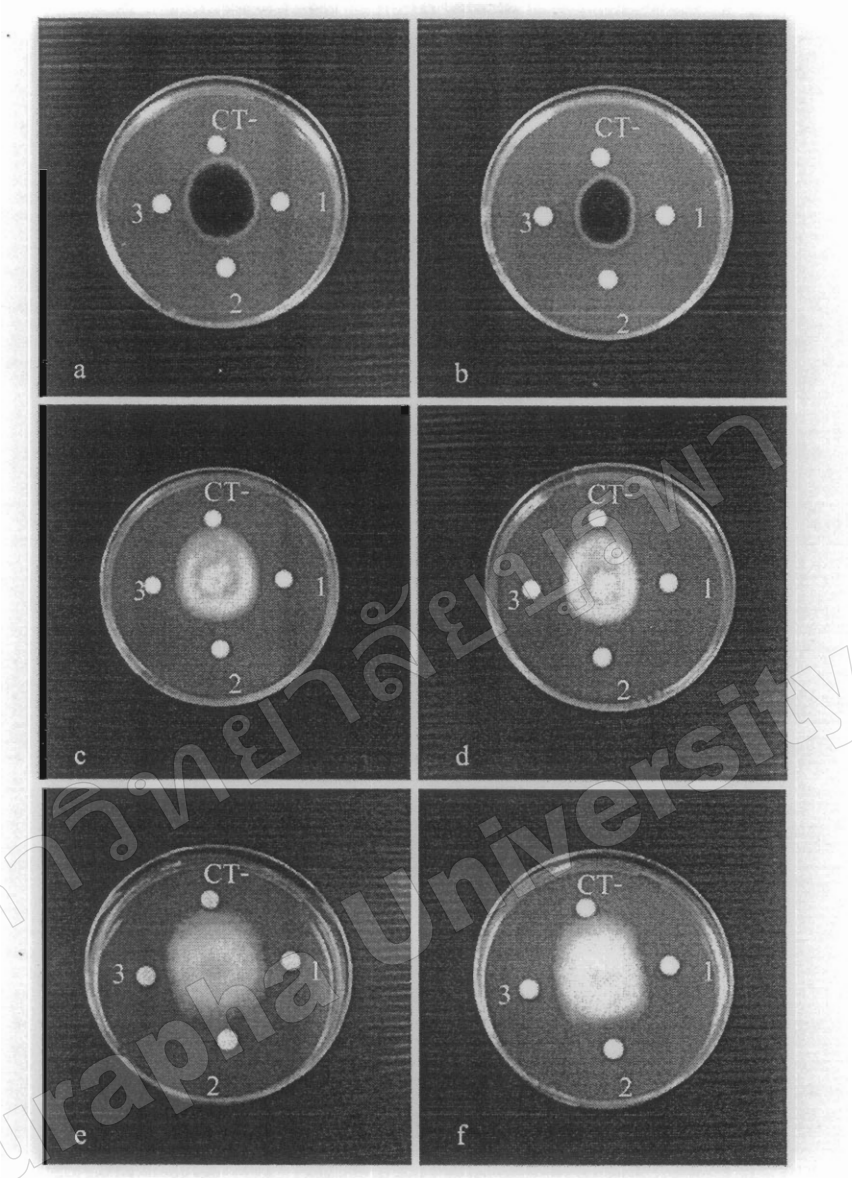


ภาพที่ 4-13 ระยะยับยั้ง *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps) ของสารสกัดจากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนการขยายขนาดการหมัก (Optimization) และภายหลังการขยายขนาดการหมัก (Scale up)



ภาพที่ 4-14 ระยะยับยั้ง *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps) ของสารสกัดจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนการขยายขนาดการหมัก (Optimization) และภายหลังการขยายขนาดการหมัก (Scale up)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-15 ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนการขยายขนาดการหมัก (ภาพด้านซ้าย) และภายหลังการขยายขนาดการหมัก (ภาพด้านขวา) จำนวน 3 ซ้ำ (1, 2 และ 3); a, b: ฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola*, c, d: ฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides*, e, f: ฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum*; CT-: 50% DMSO

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. การหาค่า Minimum inhibition concentration (MIC) ของสารสกัดภายหลังการขยายขนาดการหมัก ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เปรียบเทียบกับยา Fluconazole ด้วยวิธี Agar dilution (ตารางที่ 4-47) ในการยับยั้งการเจริญปลายเส้นใยของราสาเหตุโรคพืช 4 สายพันธุ์ พบค่า MIC ของยา Fluconazole ต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* เท่ากับ 256 และ 1024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ การยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. มีค่า MIC เท่ากับ 2048 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ค่า MIC ของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในการยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* เท่ากับ 1024 และ 2048 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า MIC ของการยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. เท่ากับ 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่า MIC ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. brassicicola, C. gloeosporioides* และ *Pestalotiopsis* sp. เท่ากับ 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MIC ของการยับยั้ง *F. oxysporum* มากกว่า 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากราป่าชายเลน กับฤทธิ์ยับยั้งของยา Flucoanazole ต่อราสาเหตุโรคพืช พบว่าสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยา Flucoanazole เมื่อทดสอบกับ *C. gloeosporioides* และสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีประสิทธิภาพเป็นครึ่งหนึ่งของยา Flucoanazole เมื่อทดสอบกับ *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ส่วนสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีประสิทธิภาพเป็นครึ่งหนึ่งและน้อยกว่ายา Flucoanazole 3 เท่า เมื่อทดสอบกับ *Pestalotiopsis* sp. และ *C. gloeosporioides* ตามลำดับ

ตารางที่ 4-47 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดจากราป่าชายเลน และยา Fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ราสาเหตุโรคพืช	ค่า MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และประสิทธิภาพของสารสกัดเทียบกับยา Fluconazole				
	Fluconazole	BUSK 055-1		BUEN 830	
	MIC	MIC	ประสิทธิภาพ	MIC	ประสิทธิภาพ
A. brassicicola	256	2048	1/8	4096	1/16
C. gloeosporioides	1024	1024	1	4096	1/4
F. oxysporum	2048	4096	1/2	>4096	>1/2
Pestalotiopsis sp.	2048	4096	1/2	4096	1/2

หมายเหตุ ทดสอบด้วยวิธี Agar dilution บนอาหาร PDA/DW เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่าประสิทธิภาพคำนวณได้จากค่า MIC ของยา Fluconazole/ ค่า MIC ของสารสกัดที่ได้จากราในระบบนิเวศป่าชายเลน

7. การแยกสารองค์ประกอบของสารสกัดด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)

เมื่อแยกสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) สารสกัดที่ได้จากสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที (Shaking) สารสกัดที่ได้ภายหลังการหาสภาวะเหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมัก และสารสกัดจากการขยายขนาดการหมัก รวมทั้งสิ้น 4 สภาวะ ด้วยวิธี TLC ร่วมกับตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ พบว่าสารละลายคลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต: เมทานอล ในอัตราส่วน 8: 1.5: 0.5 แยกสารองค์ประกอบจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ได้ชัดเจนที่สุด พบสารองค์ประกอบของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ จำนวน 1 ชนิด สารองค์ประกอบจากสารสกัดในสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที จำนวน 5 ชนิด สารองค์ประกอบที่แยกจากสารสกัดในการศึกษาสภาวะเหมาะสมก่อนการขยายขนาดการหมัก จำนวน 8 ชนิด และสารองค์ประกอบที่แยกจากสารสกัดภายหลังจากการขยายขนาดการหมักจำนวน 9 ชนิด จำนวนชนิดของสารองค์ประกอบ และค่า Rf สารองค์ประกอบที่ได้แสดงดังตารางที่ 4-48 และภาพที่ 4-16 เมื่อเปรียบเทียบค่า Rf ของสารองค์ประกอบที่ได้ พบว่าสารองค์ประกอบที่มีค่า Rf 0.57 - 0.58 พบในสารสกัดที่ได้จากการศึกษาทั้ง 4 สภาวะ สารองค์ประกอบที่มีค่า Rf 0.64, Rf 0.68, Rf 0.71 และ Rf 0.91 พบในสารสกัดที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที สภาวะก่อนขยายขนาดการหมัก และภายหลัง

การขยายขนาดการหมัก สารองค์ประกอบที่มีค่า RF 0.78 พบเพิ่มขึ้นในสารสกัดที่ได้ภายหลังการขยายขนาดการหมักเท่านั้น ส่วนสารองค์ประกอบที่มีค่า Rf 0.08, Rf 0.43 และ Rf 0.48 - 0.49 ไม่พบในสารสกัดจากการเลี้ยงราทะเลในสภาวะตั้งต้น

สารละลายละลาย คลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 8.5: 1.5 แยกสารองค์ประกอบจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ได้ชัดเจน พบสารองค์ประกอบจำนวน 2 ชนิด จากสารสกัดที่ได้ในการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ พบสารองค์ประกอบจำนวน 1 ชนิด จากสารสกัดที่ได้ในสภาวะตั้งต้นที่เขย่า 150 รอบ/นาที พบสารองค์ประกอบจำนวน 5 ชนิด จากสารสกัดจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมัก และพบสารองค์ประกอบจำนวน 7 ชนิด จากสารสกัดที่ได้ภายหลังจากการขยายขนาดหมัก จำนวนชนิดของสารองค์ประกอบ และค่า Rf ของสารองค์ประกอบที่ได้ แสดงดังตารางที่ 4-49 และภาพที่ 4-17 เมื่อเปรียบเทียบค่า Rf ของสารองค์ประกอบที่ได้พบว่าสารองค์ประกอบที่มีค่า Rf 0.29 - 0.33 พบในสารสกัดที่ได้จากการศึกษาทั้ง 4 สภาวะ สารองค์ประกอบที่มีค่า Rf 0.58 พบในสารสกัดที่ได้ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนการขยายขนาดการหมัก และภายหลังขยายขนาดการหมัก สารองค์ประกอบ Rf 0.70 และ Rf 0.79 พบในสารสกัดที่ได้ภายหลังขยายขนาดการหมักเท่านั้น

เมื่อเลี้ยงราจากป่าชายเลนในสภาวะที่เหมาะสม ส่งผลให้ราจากป่าชายเลนผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสารองค์ประกอบแตกต่างจากสารองค์ประกอบที่ได้ในสภาวะตั้งต้น และเมื่อขยายการหมักพบจำนวนสารองค์ประกอบเพิ่มขึ้น ซึ่งชนิดของสารองค์ประกอบที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากสารประกอบที่ได้ แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของการใช้สภาวะที่เหมาะสมของการขยายขนาดการหมัก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-48 ค่า Rf ของสารองค์ประกอบ จากสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่เลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ

สภาวะที่ศึกษา	จำนวนสารองค์ประกอบ	แถบสารที่	ค่า Rf
สภาวะตั้งต้น (Static)	1	1	0.58
สภาวะตั้งต้น (Shaking)	5	1	0.57
		2	0.64
		3	0.68
		4	0.71
		5	0.91
ก่อนขยายขนาดการหมัก	8	1	0.08
		2	0.43
		3	0.49
		4	0.57
		5	0.64
		6	0.68
		7	0.71
		8	0.91
หลังขยายขนาดการหมัก	9	1	0.08
		2	0.43
		3	0.48
		4	0.58
		5	0.64
		6	0.68
		7	0.71
		8	0.78
		9	0.91

หมายเหตุ แยกสารองค์ประกอบด้วยวิธี TLC ใช้ตัวทำละลาย Chloroform: Ethyl acetate: Methanol ในอัตราส่วน 8: 1.5: 0.5 บนแผ่น TLC สำเร็จรูป

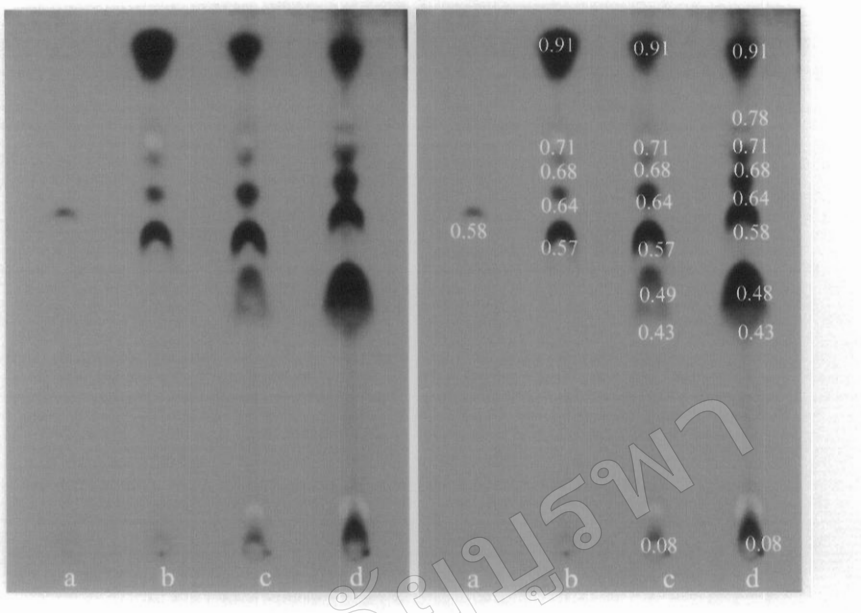
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-49 ค่า Rf ของสารองค์ประกอบ จากสารสกัดของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่เลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ

สารสกัดจากราป่าชายเลน	จำนวนสารองค์ประกอบ	แถบสารที่	ค่า Rf
สภาวะตั้งต้น (Static)	2	1	0.29
		2	0.48
สภาวะตั้งต้น (Shaking)	1	1	0.29
ก่อนขยายขนาดการหมัก	5	1	0.06
		2	0.29
		3	0.50
		4	0.58
		5	0.65
หลังขยายขนาดการหมัก	7	1	0.06
		2	0.33
		3	0.52
		4	0.58
		5	0.67
		6	0.70
		7	0.79

หมายเหตุ แยกสารองค์ประกอบด้วยวิธี TLC ใช้ตัวทำละลาย Chloroform: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 8.5: 1.5 บนแผ่น TLC สำเร็จรูป

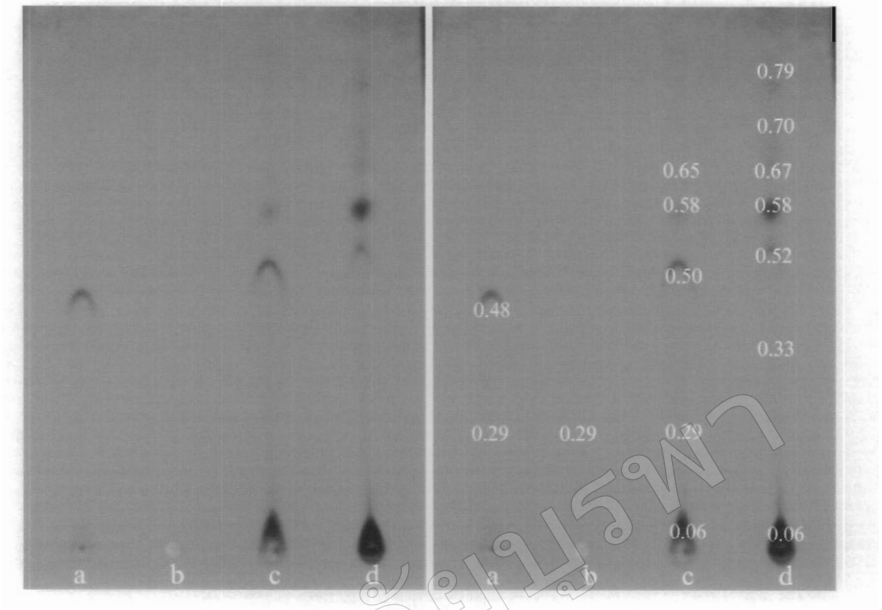
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



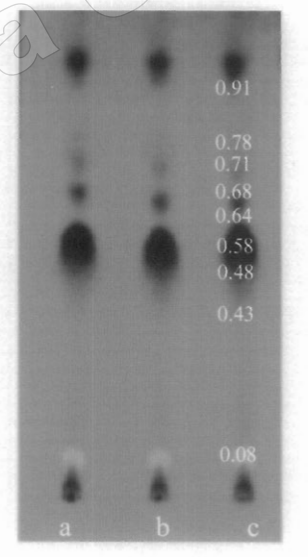
ภาพที่ 4-16 สารองค์ประกอบที่ได้จากการแยกสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 บนแผ่น TLC; a: สารสกัดจากสภาวะตั้งต้น (Static), b: สารสกัดสภาวะตั้งต้น (Shaking), c: สารสกัดที่ได้ก่อนการขยายขนาดการหมัก, d: สารสกัดที่ได้ภายหลังการขยายขนาดการหมัก, ภาพซ้ายคือแถบสารที่ได้ ภาพขวาคือแถบสารในภาพเดียวกันโดยระบุค่า Rf เพิ่มขึ้น

8. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชจากแถบของสารองค์ประกอบที่แยกได้บนแผ่น TLC ด้วยวิธี TLC Disc diffusion

เลือกสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 เนื่องจากเป็นสารที่ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ดีที่สุด และสารองค์ประกอบที่ได้มีแถบสารที่เข้ม และคมชัด นำสารสกัดที่ได้จากการขยายขนาดการหมักมาแยกสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC อีกครั้ง โดยหยดสารหลาย ๆ จุด (ภาพที่ 4-18) และทดสอบฤทธิ์ของสารองค์ประกอบต่อการเจริญของราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 ชนิด บนอาหาร PDA/DW ด้วยวิธี TLC Disc diffusion เทียบกับชุดควบคุมที่เจาะจากแผ่น TLC สำเร็จรูปที่ผ่านการวางแผ่น TLC ในสารละลายคลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต: เมทานอล ในอัตราส่วน 8: 1.5: 0.5 โดยไม่หยดสารสกัด พบว่าสารองค์ประกอบแต่ละชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแตกต่างกัน แสดงผลระยะยับยั้งดังตารางที่ 4-50 โดยพบระยะยับยั้ง *A. brassicicola* ของสารองค์ประกอบที่ 8 (Rf 0.78) ระยะยับยั้ง *C. gloeosporioides* ของสารองค์ประกอบที่ 2 (Rf 0.43), 3 (Rf 0.48), 5-6 (Rf 0.64, Rf 0.68) และ 7 (Rf 0.71) มากกว่า หรือเท่ากับ 0.20 เซนติเมตร และตัวอย่างการยับยั้ง *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *Pestalotiopsis* sp. แสดงดังภาพที่ 4-19 และภาพที่ 4-20



ภาพที่ 4-17 สารองค์ประกอบที่ได้จากการแยกสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ BUEN 830 บนแผ่น TLC; a: สารสกัดจากสภาวะตั้งต้น (Static), b: สารสกัดจากสภาวะตั้งต้น (Shaking), c: สารสกัดที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมัก, d: สารสกัดที่ได้ภายหลังขยายขนาดการหมัก, ภาพซ้ายคือแถบสารที่ได้ ภาพขวาคือแถบสารในภาพเดียวกันโดยระบุค่า Rf เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4-18 สารองค์ประกอบที่ได้จากการแยกสารสกัดจากราทะเล BUSK 055-1 จากการขยายขนาดการหมักบนแผ่น TLC ด้วยตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซีเตต: เมทานอล ในอัตราส่วน 8: 1.5: 0.5; a, b และ c เป็นสารองค์ประกอบที่แยกจากการหยดสารสกัดครั้งละหลาย ๆ จุด เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งด้วยวิธี TLC Disc diffusion

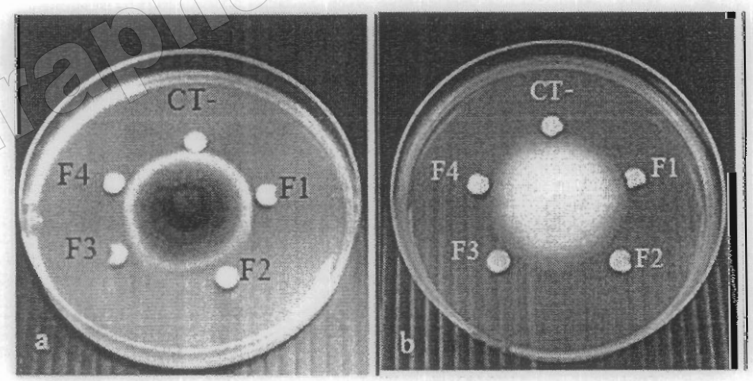
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-50 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบที่แยกบนแผ่น TLC ของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

แถบสารที่	ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	A. brassicicola	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*	*Pestalotiopsis* sp.
1	0.10±0.10	0.10±0.00	-	-
2	0.13±0.06	0.27±0.06	0.10±0.00	-
3	-	0.20±0.00	0.13±0.06	-
4	-	-	-	-
5-6	0.13±0.06	0.23±0.06	0.13±0.00	0.21±0.06
7	0.17±0.06	0.23±0.06	0.13±0.06	0.17±0.06
8	0.20±0.10	-	-	0.13±0.06
9	0.13±0.06	0.10±0.10	-	0.10±0.00

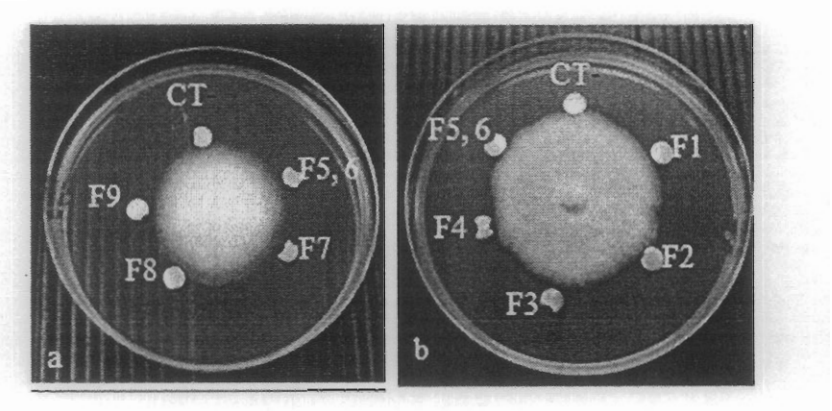
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง



ภาพที่ 4-19 ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่ทดสอบด้วยวิธี TLC Disc diffusion; a: ฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* (F1: สารองค์ประกอบที่ 1, F2: สารองค์ประกอบที่ 2, F3: สารองค์ประกอบที่ 3, F4: สารองค์ประกอบที่ 4), b: ฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* (F1: สารองค์ประกอบที่ 1, F2: สารองค์ประกอบที่ 2, F3: สารองค์ประกอบที่ 3, F4: สารองค์ประกอบที่ 4) ; CT-: TLC Disc ที่วางผ่านตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต: เมทานอล อัตราส่วน 8:1.5: 0.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-20 ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากราทะเล สายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่ทดสอบด้วยวิธี TLC Disc diffusion; a: ฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* (F5-6: สารองค์ประกอบที่ 5 และ 6, F7: สารองค์ประกอบที่ 7, F8: สารองค์ประกอบที่ 8, F9: สารองค์ประกอบที่ 9), b: ฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp (F1: สารองค์ประกอบที่ 1, F2: สารองค์ประกอบที่ 2, F3: สารองค์ประกอบที่ 3, F4: สารองค์ประกอบที่ 4) ; CT-: TLC Disc ที่วางผ่านตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต: เมทานอล อัตราส่วน 8: 1.5: 0.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University