

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Half-strength of potato dextrose broth (0.5XPDB) (Difco)

ซังอาหารสำเร็จรูป 12 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato dextrose broth (PDB) (Difco)

ซังอาหารสำเร็จรูป 24 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Sabourauds dextrose broth (SDB) (Difco)

ซังอาหารสำเร็จรูป 30 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Potato dextrose agar (PDA) (Difco)

ซังอาหารสำเร็จรูป 39 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast malt broth (YMB)

อาหารประกอบด้วย

Yeast extracts	4	กรัม
Malt extracts	10	กรัม
Glucose	10	กรัม

ซังอาหาร ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Low nutrient broth (LNB)

อาหารประกอบด้วย

Yeast extracts	0.1	กรัม
Malt extracts	0.2	กรัม
Glucose	2	กรัม

ซังอาหาร ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. การเตรียมน้ำทะเลที่มีความเค็มต่าง ๆ

เจือจางน้ำทะเล (ความเค็มประมาณ 35 ppt) ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt จากนั้นเตรียมอาหาร โดยใช้ น้ำทะเลเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเค็มต่าง ๆ นอกจากการวัดค่าความเค็มแล้วในการทดลองได้ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแต่ละชนิด ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ ก-1

ตารางที่ ก-1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ

ความเค็ม (ppt)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
	0.5xPDB	PDB	YMB	LNB	SDB	SW Conc.
0	5.25±0.03	5.14±0.04	6.36±0.01	6.27±0.02	5.64±0.02	6.36±0.02
10	4.84±0.02	4.71±0.02	6.18±0.02	6.79±0.01	5.16±0.02	7.73±0.03
15	5.00±0.04	4.70±0.04	6.17±0.03	6.98±0.02	5.18±0.01	7.92±0.03
20	5.0±0.04	4.71±0.02	6.21±0.02	7.03±0.02	5.24±0.03	7.92±0.02
30	5.46±0.01	4.96±0.02	6.29±0.01	7.14±0.02	5.32±0.02	7.91±0.01
33-35	-	-	-	-	-	7.84±0.01

หมายเหตุ - ไม่ได้ทำการศึกษา

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,

SW Conc.: Seawater concentration

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ภาคผนวก ข

สารเคมีและยาปฏิชีวนะ

สารเคมีและยาปฏิชีวนะ

1. สารละลาย 1 N NaOH (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

ชั่ง NaOH 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 1 N NaOH

2. สารละลาย 1 N HCl (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

ใช้ปิเปตดูดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 2 N HCl เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:1 จะได้ สารละลาย 1 N HCl

3. การเตรียมสารยา Fluconazole ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชั่งยา Fluconazole ชนิดผง 40.96 มิลลิกรัม ละลายยาใน 100% DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ยา Fluconazole ความเข้มข้น 40.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 100% DMSO เป็นความเข้มข้นสำหรับการใช้งาน (Working stock) ความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้หาค่า MIC และเจือจางด้วยอาหารทดสอบ (PDA) ด้วยอัตราส่วน 1:10 ในจานเพาะเชื้อ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 2 มิลลิลิตร จะได้อาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของยา Fluconazole 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (หลุมที่ 1) ดูดอาหารหลุมที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลุมที่ 2 และเจือจางด้วยอาหารทดสอบในอัตราส่วน 1:1 ทำให้ได้อาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของยา Fluconazole 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางด้วยอาหารทดสอบในอัตราส่วน 1:1 ในหลุมถัดไปเรื่อย ๆ ให้ได้อาหารทดสอบหลุมสุดท้ายมีความเข้มข้นเท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข-1

4. การเตรียมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

น้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากการขยายการหมักราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนสายพันธุ์ BUEN 830 ในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร พบน้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 274.20 และ 235.50 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ ข-1) เนื่องจากสารสกัดที่ได้ค่อนข้างเหนียว ยากต่อการแบ่งเพื่อชั่งน้ำหนักในปริมาณน้อย จำเป็นต้องละลายสารทั้งหมดในสารละลาย 100% DMSO ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (เป็นปริมาตรต่ำสุดที่ละลายสารสกัดให้เป็นเนื้อเดียวกัน) จะได้สารสกัดราทะเล สายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน BUEN 830 ในตัวทำละลาย 100% DMSO ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น (Stock solution) 68.550 และ 58.875 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นสำหรับการใช้งาน (Working solution) ใน 100% DMSO ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 40.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

(ความเข้มข้นสำหรับการใช้งานเป็น 10 เท่า ของค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้หาค่า MIC) โดยใช้สมการ $C_1V_1 = C_2V_2$ และเจือจางด้วยอาหารทดสอบ (PDA/DW) ด้วยอัตราส่วน 1: 10 ในจานเพาะเชื้อ 24 หลุม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะได้อาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารสกัด 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (หลุมที่ 1) คู่ออาหารหลุมที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลุมที่ 2 และเจือจางด้วยอาหารทดสอบในอัตราส่วน 1: 1 ทำให้ได้อาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารสกัด 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางด้วยอาหารทดสอบในอัตราส่วน 1:1 ในหลุมถัดไปเรื่อย ๆ และให้อาหารทดสอบหลุมสุดท้ายมีความเข้มข้นเท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข-1

ตารางที่ ข-1 น้ำหนักสารสกัดจากการขยายการหมักในการเลี้ยงรากจากป่าชายเลน

รากจากป่าชายเลน	น้ำหนักขวดและสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักขวด (กรัม)	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)
BUEN 830	18.8545	18.6190	235.50
BUSK.055-1	22.2778	22.0036	274.20

	1	2	3	4	5	6
A	Fluconazole 4096 µg/ml	Fluconazole 2048 µg/ml	Fluconazole 1024 µg/ml	Fluconazole 512 µg/ml	Fluconazole 256 µg/ml	Fluconazole 128 µg/ml
B	Fluconazole 64 µg/ml	Fluconazole 32 µg/ml	Growth control + 1% DMSO	Growth control + 1% DMSO	Sterility Control	Sterility Control
C	Crude extracts 4096 µg/ml	Crude extracts 2048 µg/ml	Crude extracts 1024 µg/ml	Crude extracts 512 µg/ml	Crude extracts 256 µg/ml	Crude extracts 128 µg/ml
D	Crude extracts 64 µg/ml	Crude extracts 32 µg/ml	Growth control + 1% DMSO	Growth control + 1% DMSO	Sterility Control	Sterility Control

ภาพภาคผนวก ข-1 แผนภาพแสดงความเข้มข้นของยา Fluconazole และความเข้มข้นของสารสกัดในอาหารทดสอบที่ระดับต่าง ๆ และชุดควบคุม ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม (Sterility Control: ชุดควบคุมปราศจากเชื้อ)

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางที่ ค-1 ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราป่าชายเลน เมื่อเลี้ยงในสภาวะตั้งต้นที่ดั่งทิ้งไว้

สารสกัดจาก ราป่าชายเลน	ระยะยับยั้งสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	<i>A. brassicicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BUCS 004	-	-	-	-
BUCS 032-2	0.14±0.05 ¹	0.12±0.04 ¹²	0.11±0.06 ¹	-
BUSK 055-1	0.16±0.07 ¹	0.17±0.07 ²	0.11±0.06 ¹	0.13±0.05 ¹
BUEN 121	0.12±0.04 ¹	0.16±0.05 ²	0.10±0.07 ¹	0.13±0.05 ¹
BUEN 830	0.11±0.06 ¹	0.10±0.05 ¹	-	0.11±0.06 ¹
BUEN 834	-	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ค-2 ระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากราป่าชายเลน เมื่อเลี้ยงในสภาวะตั้งต้นเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที

สารสกัดจาก ราป่าชายเลน	ระยะยับยั้งสาเหตุโรคพืช (เซนติเมตร)			
	<i>A. brassicicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BUCS 004	0.21±0.06 ¹	-	-	-
BUCS 032-2	0.19±0.06 ¹	0.11±0.03 ¹	-	-
BUSK 055-1	0.30±0.07 ²	0.30±0.07 ³	0.14±0.09 ¹	0.21±0.03 ¹
BUEN 121	0.32±0.07 ²	0.23±0.05 ²	0.22±0.04 ²	0.23±0.05 ¹
BUEN 830	-	-	-	-
BUEN 834	0.17±0.07 ¹	-	0.12±0.07 ¹	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่พบระยะยับยั้ง

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

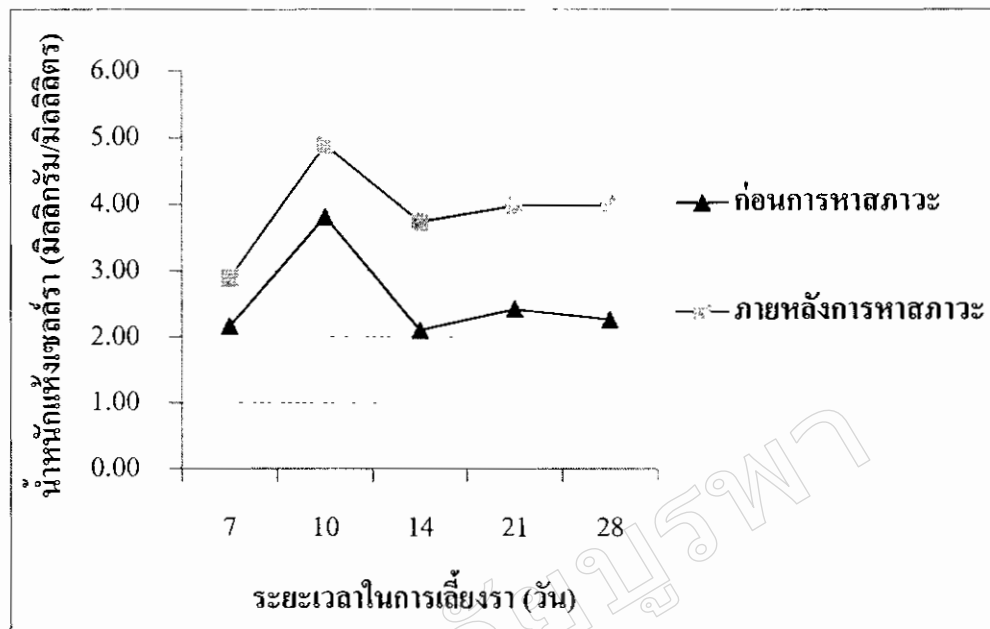
ตารางที่ ก-3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากปัสายเลนที่ผ่านการขยายขนาดการหมัก
ต่อการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช บนอาหารทดสอบ PDA/DW ด้วยวิธี
Agar dilution ป่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ราสาเหตุโรคพืช	สารทดสอบ	การเจริญของราสาเหตุโรคพืช						
		ความเข้มข้นของสารทดสอบ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)						
		4096	2048	1024	512	256	128	64
<i>A. brassicicola</i>	Fluconazole	ND	ND	ND	ND	-	+	+
	BUEN 830	-	+	+	+	+	+	+
	BUSK 55-1	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. gloeosporioides</i>	Fluconazole	ND	-	-	+	+	+	+
	BUEN 830	-	+	+	+	+	+	+
	BUSK 55-1	-	-	-	+	+	+	+
<i>F. oxysporum</i>	Fluconazole	ND	-	+	+	+	+	+
	BUEN 830	+	+	+	+	+	+	+
	BUSK 55-1	-	+	+	+	+	+	+
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Fluconazole	ND	-	+	+	+	+	+
	BUEN 830	-	+	+	+	+	+	+
	BUSK 55-1	-	+	+	+	+	+	+

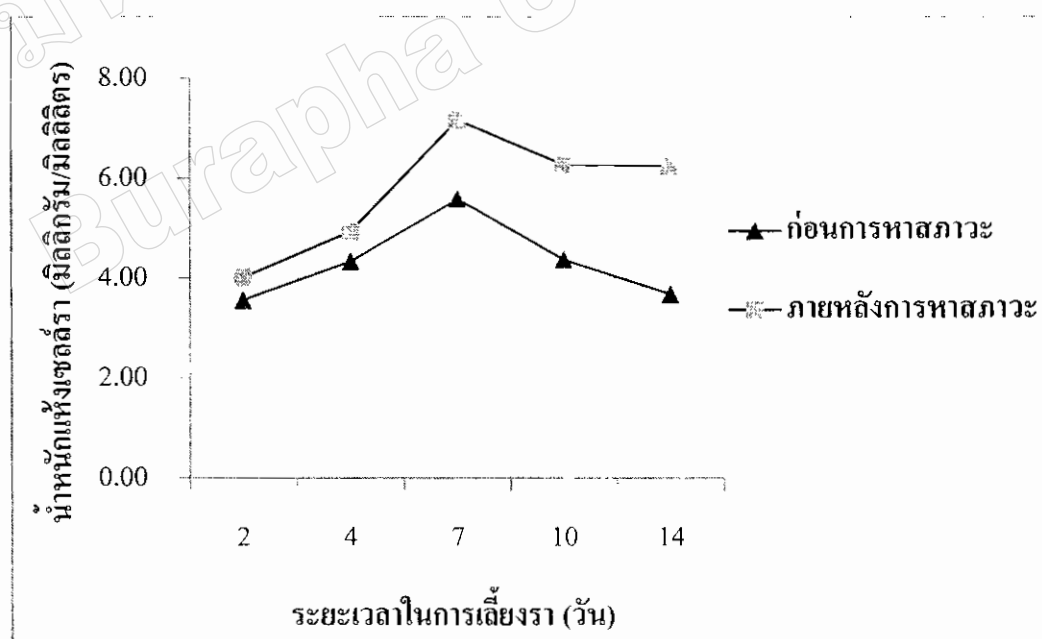
หมายเหตุ - ราสาเหตุโรคพืชไม่เจริญ

+ ราสาเหตุโรคพืชเจริญ

ND (Not determine): ไม่ได้ทำการศึกษา



ภาพภาคผนวก ค-1 รูปแบบการเจริญก่อน และหลังการหาสภาวะที่เหมาะสมของรากทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1



ภาพภาคผนวก ค-2 รูปแบบการเจริญก่อน และหลังการหาสภาวะที่เหมาะสมของรากออนโดไฟต์ สายพันธุ์ BUEN 830