หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 แบบ Rotary ของบริษัท New Brunswick Seientific Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น F2-21 โดยใช้ Roter แบบ FA-14 ของบริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น ϕ 70 ของบริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. อ่างปรับอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W760 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมันนี

เคมีภัณฑ์

1. สารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา

1.1 สารประกอบดีบุกอินทรีย์

- สารประกอบดีบุกอินทรีย์จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่

  บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (ทีบีทีโอ) (Bistributyltinoxide; T.B.T.O.)

  ไตรบิวทิลทินอะซีเตต (Tributyltin acetate)

  ไตรเฟนิลทินอะซิเตต (Triphenyltin acetate)

  ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต (Tributyltin methanesulfinate)

  ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต (Tributyltin methanesulfonate)

  ไตรบิวทิลทินฟลูออไรด์ (Tributyltin fluoride)

- สารประกอบดีบุกอินทรีย์ของบริษัท Acima Chemical Industries Ltd. Inc. ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ได้แก่

  เมทาทิน 70-40 (ทีบีทีโอ) (Metatin 70-40; T.B.T.O.)

เมทาทิน 58-10 /101 (Metatin 58-10/101)

เมทาทิน 76-38 (ทีบีทีเอฟ) (Metatin 76-38; T.B.T.F.)

1.2 สารฆ่ารา

- สารฆ่าราของบริษัท Merck & Co.,Inc.ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่

เทคทาเมอร์ 38 พาวด์เดอร์ (Tektamer 38 Powder)

เมตาโซล ทีเค-100 (Metasol TK-100)

สูตรโครงสร้างและเปอร์เซ็นต์ active ingradient แสดงดังตารางที่ 6

เคมีภัณฑ์สำหรับ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

กลูโคส (Glucose) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

โพลีเปปโตน (Polypeptone) ของบริษัท Difco Laboratorie ประเทศสหรัฐอเมริกา

ผงสกัดยีสต์ (Yeast entract) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริก-

แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose fiber, 99.5% pure) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (Carboxymethyl Cellulose,sodium salt, Low viscosity) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. เคมีภัณฑ์สำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) จาก Trichoderma reesei และเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส จาก Aspergillus niger ของบริษัท Novo Industries ประเทศเดนมาร์ค

แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose fiber, 99.5% pure) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (Carboxymethyl Cellulose,sodium salt, Low viscosity) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

อะวิเซล (Avicel,Crystalline Cellulose) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริก-

แอโรซิล-200 (Aerosil-200) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

ซาลิซิน (Salicin) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitro-salicylic acid) ของบริษัท Fluka AG Buchs ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

โซเดียมซัลไฟต์ (Sodiumsulfite) ของบริษัท Mallinckrout Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

โปตัสเซียมโซเดียมตาร์เตรต (Potassium Sodium tartrate) ของบริษัท Fluka, AG Buch ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมันนี

5. เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน

กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (Glucosamine hydrochloride) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

อะเซทิลอะซีโตน (Acetyl acetone) ของบริษัท Fluka FG Buchs ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (4-dimethylamino benzaldehyde) ของบริษัท Fluka AG Buchs ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เอธานอล (Absolute Ethanal) ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมันนี

โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมันนี

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd. ประเทศอังกฤษ

6. สารดีเทอร์เจนท์ (Detergent)

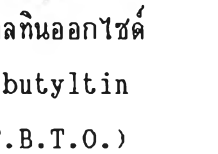
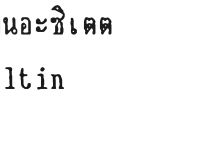
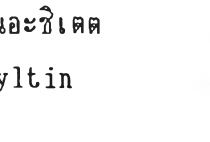
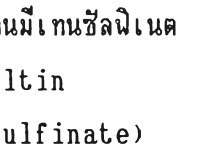
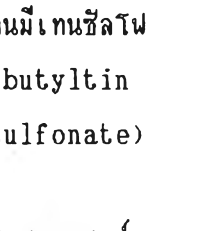
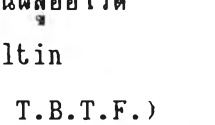
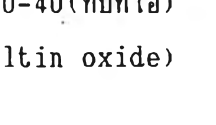
ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมันนี

ไตรตอน เอกซ์-100 (Triton X-100) ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมันนี

ซิทิลไพริดิเนียม คลอไรด์ (Cetylpyridinium Chloride) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

โซเดียม โดดีซิล ซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 6 ชนิดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราที่นำมาใช้ทดสอบ สูตรโครงสร้าง active ingradient และแหล่งสังเคราะห์

สาร	สูตรโครงสร้าง	%active ingra-dient	แหล่งสังเคราะห์
สารประกอบดีบุกอินทรีย์			
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (Bis-tributyltin oxide, T.B.T.O.)		1.0	ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต (Tributyltin acetate)		0.224	ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต (Triphenyltin acetate)		1.0	ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต (Tributyltin methanesulfinate)		1.0	ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต (Tributyltin methanesulfonate)		1.0	ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ไตรบิวทิลทินฟลูออไรด์ (Tributyltin fluoride T.B.T.F.)		1.0	ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เมทาทิล 70-40(ทีบีทีโอ) (Tributyltin oxide)		92.8	Acima Chemical Industries Ltd. Inc. Switzerland

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สาร	สูตรโครงสร้าง	%active ingra-dient	แหล่งสังเคราะห์
เมทาทิน 58-10/101 (metatin 58-10/101)			Acima Industries Ltd.Inc.
เมทาทิน 76-38 (TBTF) (tributyltin fluoride)	$(n\text{-}C_4H_9)_3SnF$	97.52	Acima Industries Ltd.Inc.
สารฆ่ารา			
เทคทาเมอร์ 38 พาวด์เดอร์ (Tektamer 38 Powder)	$\begin{array}{l} CH_2Br \\ \vert \\ Nc\text{-}C\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CN \\ \vert \\ Br \end{array}$	98.0	Merck & Co.,Inc.USA.
เมตาโซล ทีเค-100 (Metasol TK-100)		20.0	Merck & Co.,Inc.USA.

Bu หมายถึง C_4H_9

วิธีการทดลอง

1] การแยกและคัดเลือกราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างไม้ยางพารา

1.1 การแยกและการจัดจำแนกตรวจสอบชนิดของราจากตัวอย่างไม้ยางพารา

ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุ่มในน้ำกลั่น ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วป้าย (swab) บนแผ่นตัวอย่างไม้ยางพาราบริเวณที่พบการปนเปื้อนของรา จากนั้นนำมาป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารบ่มที่อุณหภูมิห้องจนสายใยราขึ้น แยกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงชนิดเดิม บ่มไว้จนเห็นสายใยราเจริญเต็มที่ นำราที่แยกได้มาทำการตรวจสอบชนิดโดยใช้วิธีเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture technique) โดยวางสไลด์เลี้ยงเชื้อและกระจกปิดสไลด์บนแท่งแก้วรูปตัววี (V) ในจานเพาะเชื้อที่ปิดฝาจานแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นตัดวุ้นเลี้ยงเชื้อ (PDA) ขนาด 0.5 x 0.5 ซม. วางบนสไลด์ในจานเพาะเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยเส้นใยของราลงบนชิ้นวุ้นแล้วใช้กระจกปิดสไลด์วางทับบนชิ้นวุ้นใส่ก้อนสำลีชุบน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ เมื่อราเจริญดีแล้วนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ ทำการตรวจสอบชนิดและจัดหมวดหมู่โดยใช้วิธีของ BarnettและHunter (57) และGillman (58)

1.2 การคัดเลือกราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงจากรากลุ่มต่าง ๆ ที่แยกได้

นำราที่แยกได้ไปเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้วิธีทดสอบที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Teacher และ Wood (59) โดยใช้ biscuit cutter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะวุ้นบริเวณที่มีปลายเส้นใยของราบน PDA นำไปวางบนจานอาหารวุ้นคาร์บอกซิเมธิลเซลลูโลส (CMC agar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาวัดขนาดโคโลนีจากนั้นเทราดด้วย 0.1% สารละลายคองโก เรด (Congo red) ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที เทสารละลายคองโกเรดออกแล้วเทราดด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ จะเห็นบริเวณใส (Clear zone) ของการย่อยสลายที่เกิดเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสไปทำลายการรวมตัวของ Congo red กับ CMC ที่ตำแหน่ง β-1,4-D-glucan การประเมินค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทำโดยคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีรา ทำการคัดเลือกราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดจากแต่ละกลุ่มไปศึกษาขั้นต่อไป

1.3 การเก็บรักษาราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำราสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกจากข้อ 1.2 ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง (PDA slant) บ่มที่อุณหภูมิห้องครบ 5 วัน ปิดทับจุกสำลีด้วยแผ่นพาราฟิล์ม เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้ในการทดลองนำเชื้อมาเลี้ยงบน PDA slant ใหม่จนอายุครบ 5 วัน แล้วจึงนำไปใช้

1.4 การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของราที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (liquid media)

1.4.1 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสจากราที่คัดเลือก

นำ 1 มล. ของสปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ใส่ลงใน 50 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Czapek's dox media) ตามสูตรอาหารของ Mandels และ Sternberg (60) ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน โดยแต่ละวันจะทำการเก็บเชื้อโดยนำมาทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง J2-21 และใช้ roter ชนิด JA-14 ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสซึ่งเป็น crude enzyme มาตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activities) ส่วนตะกอนนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชม. สำหรับนำไปวัดปริมาณกลูโคซามีนเพื่อติดตามการเจริญของรา

1.4.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

1.4.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเซลลูเลสรวม (Cellulase activity)

โดยวิธีของ Wood และ Mc.Crae (61) ผสม 0.2 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 0.4 มล. ของสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ แอลฟา-เซลลูโลส ใน 0.05 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 และ 1.4 มล. 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 โดยบ่มสารละลายสับสเตรทก่อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม. หยุดปฏิกริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นโดยใช้เครื่อง micro-centrifuge รุ่น KM-15200 ที่ความเร็ว 5,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA) ตามวิธีการข้อ 1.4.3

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit) ของเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลส แล้วได้น้ำตาลรีดิวส์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อ ชม.ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

1.4.2.2 <u>การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส</u> (Exoglucanase; C_1; β-1,4-glucancellobiohydrolase)

โดยวิธีของ Wood (62) ผสม 0.5 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับ 1 มล. ของสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อะวิเซลและ 0.25 เปอร์เซ็นต์ แอโรซิล 200 ใน 0.05 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 (ผสมสารละลายสับสเตรทให้เข้ากันโดยการคน (stir) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชม. ก่อนนำมาใช้) โดยบ่มสารละลายสับสเตรทก่อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดโดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ตามวิธีการข้อ 1.4.3

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit)ของเอคโซกลูคาเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายอะวิเซลแล้วได้น้ำตาลรีดิวส์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

1.4.2.3 <u>การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส</u> (Endoglucanase; C_x ; β-1 ,4 -glucanglucanohydrolase)

โดยวิธีของ Ryu และ Mandel (29) ผสม 0.5 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับ 1.0 มล. ของสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอกซิ-เมทธิลเซลลูโลสใน0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีหยุดปฏิกริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดโดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิกตามวิธีการข้อ 1.4.3

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit) ของเอนโดกลูคาเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลสแล้วได้น้ำตาลรีดิวส์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะที่ทดลอง

1.4.2.4 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของ บีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase)

โดยวิธีของ Ryu และ Mandel (29) ผสม 0.5 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับ 1.0 มล. ของสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ซาลิซิน ใน 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดโดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ตามวิธีการข้อ 1.4.3

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit) ของ บีตา-กลูโคซิเดส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายซาลิซินแล้วได้น้ำตาลรีดิวส์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ต่อนาทีภายใต้สภาวะที่ทดลอง

1.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

โดยวิธีของ Miller (63) นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 1 มล. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA) (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมแล้วต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นจัด เติมน้ำกลั่น 10 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 100-600 ไมโครกรัมต่อ มล.

2] การศึกษาหาผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

สารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา (fungicide) ที่นำมาศึกษาแสดงดังตารางที่ 6

2.1 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ผลิตโดยบริษัทโนโว (เอนไซม์เซลลูเลสที่ขายทางการค้าผลิตโดยบริษัทโนโว)

2.1.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อความสามารถในการทำงานของสารละลายเอนไซม์ก่อนนำมาทดสอบกับสารประกอบดีบุกอินทรีย์

2.1.1.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารละลายเอนไซม์เอคโซกลูคาเนส (C_1)

เจือจางสารละลายเอนไซม์ Celluclast (Cellulase จาก Trichoderma reesei) ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ซิเตรท

บัฟเฟอร์ pH 4.8 ให้ได้ความเข้มข้น 5×10^{-2}, 10^{-2}, 5×10^{-3}, และ 10^{-3} เท่า ของสารละลายเอนไซม์ตัวต้น แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส ตามวิธีการข้อ 1.4.2.2

2.1.1.2 <u>การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารละลายเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (C_x)</u>

เจือจางสารละลายเอนไซม์ Celluclast (เซลลูเลสจาก <u>Trichoderma reesei</u>) ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 5×10^{-4}, 10^{-4}และ 5×10^{-5} เท่าของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส ตามวิธีการข้อ 1.4.2.3

2.1.1.3 <u>การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารละลายเอนไซม์ บีตา-กลูโคซิเดส</u>

เจือจางสารละลายเอนไซม์ เบตา-กลูโคซิเดส (จาก <u>Aspergillus niger</u>)ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า ของสารละลายตั้งต้น แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำงานของ บีตา-กลูโคซิเดส ตามวิธีการข้อ 1.4.2.4.

2.1.2 <u>ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์เข้มข้น 100 ppm ในระบบการทำงานของเอนไซม์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์</u>

ผสมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางได้ความเข้มข้นเหมาะสมแล้วจากการทดลองที่ 2.1.1 กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ในสารละลายผสมเป็น 300 ppm บ่มสารละลายผสมที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 1.4.2 (โดยจะพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ ในระบบการทำงานของเอนไซม์เป็น 100 ppm) เปรียบเทียบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในระบบที่มีสารประกอบดีบุกอินทรีย์กับระบบควบคุมที่ใช้สารละลายเอนไซม์ผสมกับสารละลาย 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 แทนสารประกอบดีบุกอินทรีย์ นำผลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนไซ์โดยใช้สมการ

$$\text{การยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดในระบบควบคุม} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดในระบบที่มีสารประกอบดีบุกอินทรีย์เข้มข้น 100 ppm}}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในระบบควบคุม}} \times 100$$

2.1.3 การแปรผันความเข้มข้นของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.2 โดยแปรผันให้ความเข้มข้นสุดท้ายสารประกอบดีบุกอินทรีย์ ในระบบการทำงานของเอนไซม์เป็น 0.01 , 1.0 และ 100 ppm ตามลำดับและแปรผันระยะเวลาบ่มเอนไซม์กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์เป็น 2 , 5 และ 10 นาที ตามลำดับก่อนนำมาทดสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 1.4.2

2.1.4 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่บ่มสารประกอบดีบุกอินทรีย์กับสารละลายเอนไซม์แล้วให้ผลยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนไซม์สูงสุด จากการทดลองที่ 2.1.3 ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โดยแปรผันระยะเวลาที่บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.2 โดยใช้ความเข้มข้นของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์แล้วให้ผลยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนไซม์สูงสุดจากการทดลองที่ 2.1.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดในระบบการทำงานของเอนไซม์ที่เวลา 10 , 20 , 30 , 40, 60 , 90 และ 120 นาที ตามลำดับเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในระบบที่มีสารประกอบดีบุกอินทรีย์กับระบบควบคุม

2.1.5 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์เข้มข้น 100 ppm ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่สภาวะความเป็นกรดค่าง 4.0-8.0

ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.2 โดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองเป็น 4.0 , 4.8 , 6.0 , 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ โดยที่ pH 4.0-6.0 ใช้สารละลาย 0.05 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ และที่ pH 7.0-8.0 ใช้สารละลาย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2.2 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 100 ppm ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากตัวแทนราที่คัดเลือก

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากวิธีการข้อ 1.4.1 โดยเลือกใช้สารละลายเอนไซม์ที่สร้างจากวันที่เลี้ยงเชื้อแล้วตรวจพบว่าให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด ผสมกับสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) โดยให้ความเข้มข้นสุด

ท้ายของ T.B.T.O. ในสารละลายผสมเป็น 300 ppm บ่มสารละลายผสมที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 1.4.2 (จะพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ในระบบการทำงานของเอนไซม์เป็น 100 ppm) เปรียบเทียบกับความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในระบบควบคุมที่ใช้สารละลายเอนไซม์ผสมกับสารละลาย 0.05 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 แทนสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O.

3] ทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ตัวแทนราที่คัดเลือก

3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยตั้งต้น

นำราที่เก็บรักษาตามวิธีการข้อ 1.3 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเอียง (PDA slant) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนครบ 5 วัน ใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในน้ำ กรองสปอร์แขวนลอยผ่านนที่กรองสปอร์ (filter tube วิธีเตรียมในภาคผนวก ค) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อแยกส่วนของสายใยราออก นำสปอร์ที่กรองได้มาแขวนลอยในน้ำและนับสปอร์เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 3×10^7 สปอร์/มล. โดยใช้ Haemacytometer (วิธีใช้แสดงในภาคผนวก ค)

3.2 ปริมาณต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราว (Static effect)

นำสปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ปริมาตร 5 มล. ใส่ลงใน 45 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่ผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์โดยแปรผันให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1, 5, 10 และ 15...ppm ตามลำดับ (เพิ่มความเข้มข้นครั้งละ 5 ppm) แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน โดยทุกวันนำมาตรวจสอบผล ของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อสปอร์ดังนี้

3.2.1 ตรวจสอบลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วไม่พบการเปลี่ยนแปลงขนาดของสปอร์ และไม่พบการสร้าง germtube ตลอดระยะเวลา 10 วัน ที่บ่มสปอร์ในอาหารเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์

3.2.2 ตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์

นำ 1 มล. ของสปอร์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ ปั่นล้างสปอร์โดยเครื่อง microcentrifuge รุ่น KM-15200 ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที 3 ครั้ง

โดยใช้ปริมาตรของน้ำกลั่นต่อปริมาตรของสปอร์แขวนลอยเท่ากับ 10:1 จากนั้นนำสปอร์ที่ล้างแล้วไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA plate) และเลี้ยงใน 50 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDB) ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 30 วัน

การรายงานผลการทดลอง รายงานความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ (ppm) ที่ผสมในอาหารเหลว PDB แล้วให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ ตลอดระยะเวลา 10 วัน แต่สามารถพบการเจริญของเชื้อ เมื่อย้ายสปอร์ที่ล้างแล้วไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่

3.3 <u>ปริมาณต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า</u> (Sub Lethal Effect)

ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 3.2 โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDB) ที่ใช้บ่มสปอร์ จนพบความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ (ppm) และระยะเวลา (วัน) ที่บ่มสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์แล้วให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเมื่อตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2 ไม่พบการเจริญของเชื้อ

3.4 <u>ระยะเวลา (วัน) ที่ใช้บ่มสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDB) ผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์เข้มข้น 15 ppm แล้วให้ผลยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า</u> (Sub Lethal Effect)

นำสปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 5 มล. ใส่ลงใน 45 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDB) ที่ผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็น 15 ppm แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 วัน โดยทุกวันนำมาตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2 แล้วไม่พบการเจริญของเชื้อ รายงานจำนวนวันที่บ่มสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ (organotin incubation time) แล้วตรวจพบการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า (Sub Lethal Effect)

4] การหาข้อมูลเบื้องต้นของการยับยั้งการงอกของสปอร์จากตัวแทนราที่คัดเลือกโดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)

4.1 ผลของสารกลุ่มดีเทอร์เจนท์ต่อสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า (Sub Lethal Effect) โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)

สารดีเทอร์เจนท์ที่นำมาทดลองได้แก่

Non-ionic detergent ; ทวีน 80 (Tween 80) ไตรตอน X-100 (Triton X-100)

สารกลุ่มแคทไอออนิกดีเทอร์เจนท์ ; ซิทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (cetylpyridinium chloride)

สารกลุ่มแอนไอออนิกดีเทอร์เจนท์ ; โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (Sodiumdodecyl sulfate ; SDS)

4.1.1 ผลของสารกลุ่มดีเทอร์เจนท์ต่อสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า โดย T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่มีตัวกลางเป็นอาหารเหลว (PDB)

นำสปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 1 มล. ผสมลงใน 9 มล. ของอาหารเหลวผสม T.B.T.O. ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายผสมเท่ากับความเข้มข้นที่ให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาเท่ากับระยะเวลาบ่มสปอร์แล้วพบผลการยับยั้งแบบกึ่งฆ่า (T.B.T.O. incubation time) จากผลการทดลองที่ 3.3 จากนั้นนำมาทดลองดังต่อไปนี้

4.1.1.1 ตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์

ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 3.2.2 เพื่อเป็นระบบควบคุมที่แสดงว่าที่ระยะเวลาบ่มสปอร์ถึงช่วงเวลานี้แล้ว พบผลการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า

4.1.1.2 หาชนิดและปริมาณต่ำสุดของสารดีเทอร์เจนท์ที่มีผลต่อการ Reverse Germination ของสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า

เติมสารดีเทอร์เจนท์ลงในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่สภาวะที่พบว่าเกิดการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า โดยแปรผันปริมาณดีเทอร์เจนท์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์เป็น 0.01 , 0.05 , 0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน โดยทุกวันหลังจากเติมสารดีเทอร์เจนท์ ทำการตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2 บันทึกชนิด ความเข้มข้นของ

สารดีเทอร์เจนท์ และระยะเวลาที่บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ผสมสารดีเทอร์เจนท์ แล้วพบการเจริญของเชื้อ

4.1.2 ผลของสารกลุ่มดีเทอร์เจนท์ต่อสปอร์ที่ถูกยับยั้งแบบกึ่งฆ่าโดย T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่มีตัวกลางเป็นน้ำกลั่น (Distilled water)

ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 4.1.1 โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแทนอาหารเหลว PDB และทำการทดลองเพิ่มจากการทดลองที่ 4.1.1 คือ เมื่อพบว่าสปอร์ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าแล้ว นำสปอร์ที่บ่มในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ (น้ำกลั่นผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์) มาปั่นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที 3 ครั้ง แล้วนำมาทดลองต่อดังนี้

4.1.2.1 บ่มสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDB) นาน 24 ชม. แล้วเติมทวีน 80 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มต่อนาน 10 วัน โดยทุกวันนำมาตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2

4.1.2.2 บ่มสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่ผสม 3 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 80 เป็นเวลา 10 วัน โดยทุกวันทำการตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2

4.2 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) ต่อสปอร์ของ Trichoderma sp. Pol.

จากการทดลองที่ 3.3 พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. 5 ppm และระยะเวลาต่ำสุดที่บ่มสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์เท่ากับ 24 ชม. สามารถตรวจพบผลการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า และจากผลการทดลองที่ 4.1.2.2 พบว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 สามารถทำให้สปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่ตัวกลางเป็นอาหารเหลว สามารถงอกและเจริญได้ (reverse germination)

1030 8295

4.2.1 ผลของ Tween 80 ต่อความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าของ T.B.T.O.

4.2.1.1 ผลของ Tween 80 ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ในระบบที่ตัวกลางเป็นอาหารเหลว (PDB)

นำสปอร์แขวนลอยของ Trichoderma sp. Pol_1 ที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 1 มล. ผสมลงใน 9 มล. ของอาหารเหลวที่มี T.B.T.O. เข้มข้น 5 ppm และ Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน โดยทุกวันนำมาตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2

4.2.1.2 ผลของ Tween 80 ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ในระบบที่ตัวกลางเป็นน้ำกลั่น

4.2.1.2.1 ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 4.2.1.1 โดยเติมน้ำกลั่นแทนอาหารเหลว

4.2.1.2.2 ผสม Tween 80 และ T.B.T.O. ใน 9 มล. น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยแปรผันให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Tween 80 เป็น 0.01 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ T.B.T.O. เป็น 5 และ 10 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเติม 1 มล. ของสปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. นำมาตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2

4.2.2 ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. และการลดผลการยับยั้งโดย Tween 80 อย่างต่อเนื่อง

นำสปอร์ Trichoderma sp. Pol_1 แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 10 มล. ผสมลงใน 90 มล. ของอาหารเหลว PDB ที่มี T.B.T.O. เข้มข้น 5 ppm ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ที่เวลา 24 และ 48 ชม. นำไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตตามวิธีการข้อ 3.2.2 และเติม Tween 80 ลงในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มต่อ 48 ชม. แล้วนำไปปั่นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที 3 ครั้ง ส่วนหนึ่งนำไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตตามวิธีการข้อ 3.2.2 และนำสปอร์ที่ล้างแล้วมาแขวนลอยในน้ำกลั่น นับให้มีความเข้มข้นตั้งต้นประมาณ 3×10^7 สปอร์ต่อ มล. แล้วนำ 1 มล. สปอร์แขวนลอยผสมลงใน 9 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี T.B.T.O. เข้มข้น 5 ppm ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 และ 48 ชม. นำ 1 มล.ของสารละลายผสมที่บ่มครบ 24 และ 48 ชม. ไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2 และเติม Tween 80 ลงในระบบการยับยั้ง

การงอกของสปอร์ให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน โดยทุก 2 วันนำไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2

4.2.3 ระยะเวลาต่ำสุดของการบ่มสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. เข้มข้น 5 ppm ที่ให้ผลฆ่าสปอร์ Trichoderma sp. Pol$_1$

นำ 20 มล. ของสปอร์ Trichoderma sp. Pol$_1$ แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ผสมลงใน 180 มล. อาหารเหลว PDB ที่มี T.B.T.O. เข้มข้น 5 ppm ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 120 ชม. โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทุก 12 ชม. นับแต่บ่มครบ 24 ชม. ดูด 1 มล. ของสปอร์แขวนลอยในระบบการยับยั้ง ไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2 และดูด 10 มล. สปอร์แขวนลอยจากระบบการยับยั้งข้างต้นใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผสม Tween 80 ให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน โดยทุกวันนำไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตของสปอร์ตามวิธีการข้อ 3.2.2 เก็บเชื้อที่สามารถเจริญภายหลังเติม Tween 80 (revertant) ตามวิธีการข้อ 1.3 เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติของเชื้อต่อไป

คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด revertant ของแต่ละระยะการบ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ (organotin-incubation time) โดยคำนวณจากจำนวนซ้ำที่ตรวจพบการเจริญภายหลังเติม Tween 80 เทียบกับจำนวนซ้ำที่ทำการทดลองยับยั้งการงอกของสปอร์

4.2.4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่ให้ผลฆ่าสปอร์ Trichoderma sp. Pol1

นำ 5 มล. สปอร์ Trichoderma sp. Pol$_1$ แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ผสมลงใน 45 มล. อาหารเหลว PDB ที่มีสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. เข้มข้น 5 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30 , 40 , 60 , 70 , 80 , 90 , 100 , 150 และ 200 ppm ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องและที่เวลา 48 และ 60 ชม. ของการบ่มเชื้อ นำไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตตามวิธีการข้อ 3.2.2 และดูดสปอร์แขวนลอยของแต่ละความเข้มข้นของ T.B.T.O. ปริมาตร 10 มล.(ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) เติม Tween 80 ให้มีความเข้มข้น 1% ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องจนครบ 10 วัน นำไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตตามวิธีการข้อ 3.2.2

4.2.5 การตรวจสอบคุณสมบัติของ Trichoderma sp. Pol$_1$ ที่เกิดจากการทำให้งอกใหม่โดย Tween 80 ภายหลังการถูกยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า โดย T.B.T.O. (Revertant) เปรียบเทียบกับคุณสมบัติของ Trichoderma sp. Pol$_1$ ปรกติ (control)

4.2.5.1 การเตรียมสปอร์ Trichoderma sp. Pol$_1$

4.2.5.1.1 Revertant

นำเชื้อที่ตรวจพบการเจริญภายหลังจากเติม 1% Tween 80 ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า จากการทดลองที่ 4.2.3 เลือกใช้เชื้อที่ผ่านการบ่มในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ ในอาหารเหลว PDB ที่มี T.B.T.O. เข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 60 ชม. และผ่านการบ่มต่อภายหลังเติม Tween 80 เป็นเวลา 6 วัน และเก็บรักษาไว้ตามวิธีการข้อ 1.3

4.2.5.1.2 สปอร์ที่ผ่านการบ่มในอาหารเหลว PDB ที่มี Tween 80 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

นำ 1 มล. สปอร์ Trichoderma sp. Pol$_1$ แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ผสมลงใน 9 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี Tween 80 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน นำไปปั่นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที 3 ครั้ง จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (PDA plate) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เก็บรักษาเชื้อตามวิธีการข้อ 1.3

4.2.5.2 ตรวจสอบลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง (PDA)

นำเชื้อปกติ revertant และเชื้อที่สร้างจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มใน Tween 80 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเอียง (PDA Slant) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน นำมาศึกษาลักษณะการสร้างสปอร์และการสร้างสี (pigment) ลงในอาหารแข็ง

4.2.5.3 การตรวจสอบขนาดของสปอร์

นำเชื้ออายุ 5 วันที่เตรียมในวิธีการข้อ 4.2.5.2 มาเตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีการข้อ 3.1 จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยมาสุ่มวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ ocular micrometer (วิธีวัดตามภาคผนวก ค) โดยสุ่มวัดขนาดของสปอร์จำนวน 100 สปอร์ แล้วรายงานค่าเฉลี่ยขนาดสปอร์แต่ละชนิด

โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2.5.4 การงอกของสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB

นำ 1 มล. สปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ผสมลงใน 50 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยทุกชั่วโมงดูดสปอร์แขวนลอยมาตรวจนับปริมาณสปอร์ที่พบการสร้าง germtube เทียบกับปริมาณสปอร์ทั้งหมดโดยใช้ Haemacytometer แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่เวลาใด ๆ ตามสมการดังนี้

$$\text{การงอกของสปอร์ (\%)} = \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่สร้าง germtube}}{\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมด}} \times 100$$

โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และติดตามการงอกของสปอร์จนพบการงอก 100 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 12 ชม.)

4.2.5.5 การสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB

ทำการทดลองตามวิธีกาข้อ 4.2.5.4 โดยเมื่อบ่มเชื้อครบ 15 ชม. ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในระบบการเลี้ยงเชื้อมาตรวจนับปริมาณสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Haemacytometer และตรวจวัดปริมาณสปอร์ทุก 2 ชม. ของการบ่มเชื้อจนครบ 40 ชม. คำนวณปริมาณสปอร์ที่สร้างต่อ มล. ที่เวลาใด ๆ

4.2.5.6 การตรวจวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ (Growth)

4.2.5.6.1 โดยการติดตามน้ำหนักแห้งของเซลล์ (dry weight)

นำ 1 มล. สปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ผสมลงใน 50 มล. บนอาหารเหลว PDB ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 6,12,18,24,30,48,96,144,192 และ240 ชม.ของการเลี้ยงเชื้อ นำมาหาน้ำหนักแห้งโดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 48 ชม. ชั่งหาน้ำหนักแห้งแล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.5.6.2 โดยการติดตามปริมาณกลูโคซามีน

ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของ Revertant และเชื้อปกติในอาหารเหลว Czapek's dox media ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ แอลฟา-เซลลูโลส เป็นสารต้นตอคาร์บอน โดยอาศัยปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ในผนังเซลล์เป็นดัชนี ตามวิธีการของ Cochran และ Vercelloti (64)

การสกัดกลูโคซามีนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำตะกอนที่ปั่นแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อจากวิธีการข้อ 1.4.1 ไปอบ

แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. นำตะกอนที่อบแล้ว 0.2 กรัม ไปย่อยเพื่อสกัดกลูโคซามีนด้วยกรดเกลือเข้มข้นจำนวน 5 มล. บ่มในน้ำเดือด 2 ชม. แล้วทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนทิ้ง โดยเครื่องปั่นเหวี่ยง J2-21 และใช้ Rotor แบบ JA14 ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) ไปปรับค่า pH ให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนทิ้งที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสมาปรับให้ได้ปริมาตรครบ 10 มล. แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาตรกลูโคซามีน

กำหนดให้ การเจริญเติบโตของราในอาหารเหลวเป็นมิลลิกรัมกลูโคซามีนต่อกรัมน้ำหนักตะกอนแห้ง

<u>การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน</u>

วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน ตามวิธีการของ Morgan และ Elson ที่ปรับปรุงแล้ว โดย Johnson (65)

ดูดสารละลายกลูโคซามีน (25-200 ไมโครกรัม) ปริมาตร 1 มล. ผสมกับ 1 มล. ของสารละลายอะเซทิลอะซิโตน (ประกอบด้วย อะซิทิลอะซิโตนเข้มข้น 4% ในสารละลาย 1.25 โมลาร์โซเดียมคาร์บอเนต) บ่มในน้ำเดือด 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม 10 มล. เอธานอลและ 1 มล. เออร์ลิกรีเอเจนต์ (Erhlich's reagent ประกอบด้วยพาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ เข้มข้น 2.67 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายกรดเกลือเข้มข้น และเอธานอลอัตราส่วน 1:1) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ปั่นแยกตะกอนทิ้งที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

4.2.5.7 <u>การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของ Revertant เทียบกับเชื้อปกติ</u>

นำ revertant ที่เตรียมตามวิธีการข้อ 4.2.5.1.1 และเชื้อปกติมาตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีการข้อ 1.4

5] <u>ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) ต่อการยับยั้งการเจริญของสายใยตัวแทนราที่คัดเลือกเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB</u>

เชื้อที่นำมาศึกษา คือ <u>Syncephalastrum</u> sp. YA_7

<u>Aspergillus</u> sp. CX_2

Penicillium sp. YA_6

Trichoderma sp. Pol_1

5.1 ปริมาณต่ำสุดของ T.B.T.O. เมื่อเติมลงในระบบการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 12 18 24 และ 30 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อแล้วให้ผลยับยั้งการเจริญแบบชั่วคราว (Static effect)

โดยทำการทดบองเป็น 5 ชุด คือ

ชุดที่ 1 เติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ที่เวลา 12 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ
ชุดที่ 2 เติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ที่เวลา 18 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ
ชุดที่ 3 เติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ที่เวลา 24 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ
ชุดที่ 4 เติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ที่เวลา 30 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ
ชุดที่ 5 เป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์
แต่ละชุดทำ 3 ซ้ำ

นำ 1 มล. สปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ใส่ลงใน 50 มล.อาหารเหลว PDB แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อบ่มครบ 12 18 24 30 ชม. เติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ในระบบการเลี้ยงเชื้อชุดต่าง ๆ โดยแปรผันหาความเข้มข้นของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ในระบบการเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่ำสุดของ T.B.T.O. ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของสายใยทุกชุดของการทดลอง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเริ่มจากความเข้มข้น 5 ppm แล้วเพิ่มความเข้มข้นครั้งละ 5 ppm จนพบความเข้มข้นต่ำสุดของ T.B.T.O. ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของสายใย แล้วนำมาทดลองดังนี้

5.1.1 ติดตามการเจริญของสายใย

โดยติดตามน้ำหนักแห้งของเซลล์เป็นเวลา 10 วัน นับตั้งแต่เริ่มบ่มเชื้อในอาหารเหลว จากทุกชุดของการทดลอง ตามวิธีการข้อ 4.2.5.6.1

5.1.2 ความสามารถในการมีชีวิตของสายใย

โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 10 วัน ดูด 1 มล. ของสายใยจากการทดลองชุดต่าง ๆ ปั่นล้างสายใยด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที 3 ครั้ง (อัตราส่วนระหว่างปริมาตรน้ำกลั่นต่อปริมาตรเชื้อ เท่ากับ 10 ต่อ 1) แล้วนำไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA Plate) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ติดตามการเจริญเป็นเวลา 30 วัน

5.1.3 ความสามารถในการสร้างสปอร์

โดยนับปริมาณสปอร์ในอาหารเหลวก่อนเติม T.B.T.O. เทียบกับปริมาณสปอร์ในอาหารเหลวเมื่อบ่มเชื้อครบ 10 วัน

5.2 ปริมาณต่ำสุดของ T.B.T.O. เมื่อเติมลงในระบบการเลี้ยงเชื้อเมื่อเชื้อเจริญถึง mid-log phase แล้วให้ผลยับยั้งการเจริญของสายใยแบบกึ่งฆ่า (Sub lethal effect)

จากการทดลองที่ 5.1 พบว่าระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อแล้วเจริญถึง mid log phase ดังนี้

Aspergillus sp. CX_2 ระยะ mid log phase คือ ชั่วโมงที่ 18

Penicillium sp. YA_8 ระยะ mid log phase คือ ชั่วโมงที่ 24

Syncephalustrum sp. YA_7 ระยะ mid log phase คือ ชั่วโมงที่ 18

Trichoderma sp. Pol_1 ระยะ mid log phase คือ ชั่วโมงที่ 18

นำ 1 มล. สปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ใส่ลงใน 50 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องจนครบเวลาที่เชื้อมีการเจริญถึง Mid log phase เติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. โดยแปรผันเพิ่มความเข้มข้นครั้งละ 5 ppm เริ่มจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของสายใยแบบชั่วคราว จากผลการทดลองตามวิธีการข้อ 5.1 แล้วนำไปบ่มต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 10 วัน โดยทุกวันหลังจากการเติม T.B.T.O. ดูดสายใยราไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตตามวิธีการข้อ 5.1.2 บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของ T.B.T.O. และระยะเวลาที่บ่มเชื้อในอาหารเหลวภายหลังเติม T.B.T.O. (T.B.T.O. incubation time) แล้วพบว่าให้ผลยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่า คือ ไม่พบการเจริญของเชื้อเมื่อนำไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิต

6) การหาข้อมูลเบื้องต้นของการยับยั้งการเจริญของสายใยตัวแทนราที่คัดเลือกโดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)

6.1 ผลของสารกลุ่มดีเทอร์เจนท์ต่อสายใยราที่ถูกยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่า (Sub lethal effect) โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O.

ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 5.2 โดยใช้สภาวะการยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่าของสายใยราที่เจริญในระยะ mid log จากผลการทดลองตามวิธีการข้อ 5.2 และเมื่อพบว่าสายใยของเชื้อถูกยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่าแล้ว เติมสารดีเทอร์เจนท์ โดยแปรผันให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในระบบการยับยั้งการเจริญเป็น 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มต่อบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน โดยทุกวันหลังจากการเติมดีเทอร์เจนท์ ดูดสายใยราไปตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตตามวิธีการข้อ 5.1.2

บันทึกชนิดและปริมาณต่ำสุดของดีเทอร์เจนท์ และระยะเวลาที่บ่มเชื้อในดีเทอร์เจนท์ (detergent incubation time) แล้วสามารถตรวจพบการเจริญของเชื้อได้

6.2 ระยะเวลาต่ำสุดที่บ่มสายใย Trichoderma sp. Pol. ระยะ Mid log ในระบบการยับยั้งการเจริญที่มี T.B.T.O. เข้มข้น 40 ppm แล้วพบผลฆ่าสายใยรา (Cidal effect)

นำ 1 มล. สปอร์แขวนลอยที่เตรียมตามวิธีการข้อ 3.1 ใส่ลงใน 50 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อบ่มเชื้อครบ 18 ชม. เติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในระบบการยับยั้งเป็น 40 ppm บ่มต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 20 วัน โดยทุก 2 วันตั้งแต่บ่มเชื้อในระบบที่มี T.B.T.O. ครบ 4 วัน นำมาเติม Tween 80 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในระบบการยับยั้งการเจริญเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน บ่มเชื้อต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 10 วัน นำสายใยมาตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตตามวิธีการข้อ 5.1.2 บันทึกระยะเวลาต่ำสุด (วัน) ที่บ่มเชื้อในสาระประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. แล้วไม่พบการเจริญของเชื้อภายหลังเติม Tween 80

6.3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสาประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งการเจริญของสายใย Trichoderma sp. Pol. ระยะ Mid log แล้วให้ผลฆ่าสายใย (Cidal effect)

ทำการทดลองตามวิธีการข้อ 6.2 โดยเมื่อเชื้อเจริญถึง mid log phase (18 ชม.) เติมสารประกอบดีบุกอินทรี T.B.T.O. โดยแปรผันให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในระบบการยับยั้งการเจริญของสายใยเป็น 40 , 50,60,70,80,90, 100 , 120 , 150 , 200 ppm ผสมให้เข้ากันบ่มต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 วัน แล้วเติม Tween 80 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในระบบการยับยั้งการเจริญเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 10 วันนำสายใยมาตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตตามวิธีการข้อ 5.1.2 บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของ T.B.T.O. (ppm) ที่ให้ผลฆ่าสายใย (cidal effect) ในระบบการยับยั้งการเจริญของสายใยราไม่พบการเจริญภายหลังเติม Tween 80