บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกและคัดเลือกราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างไม้ยางพารา

จากการแยกราจากตัวอย่างไม้ยางพาราที่มีปัญหาจากเชื้อราพบว่า สามารถแยกรา บนอาหารวุ้นแข็งตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1.1 ได้ 12 สายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบชนิดของรา โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดจำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม คือ Aspergillus spp. 5 สายพันธุ์ Penicillium sp. Trichoderma sp. Rhizopus sp. Syncephalustrum sp. กลุ่มละ 1 สายพันธุ์และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดจำแนก (เนื่องจากเป็นราที่ไม่สร้างสปอร์) 3 สายพันธุ์

เมื่อนำราแต่ละสายพันธุ์ มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหารวุ้นคาร์บอกซิเมธิลเซลลูโลสโดยวิธี Congo red Test ดังบทที่ 2 ข้อ 1.2 พบว่าราทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ และจากการประเมินค่าความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลส ไปทำลายการรวมตัวของ Congo red กับคาร์บอกซิเมธิลเซลลูโลส ที่ตำแหน่ง β-1 , 4 - D - glucan ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีรา พบว่าราแต่ละสายพันธุ์ มีค่าความสามารถในการสร้างเอนไซม์ต่างกัน คัดเลือกราสายพันธุ์ที่ให้บริเวณใสรอบโคโลนีกว้างจากราแต่ละกลุ่ม เพื่อเป็นตัวแทนสำหรับการทดสอบขั้นต่อไป ดังตารางที่ 7

2. การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของราที่คัดเลือกในอาหารเหลว

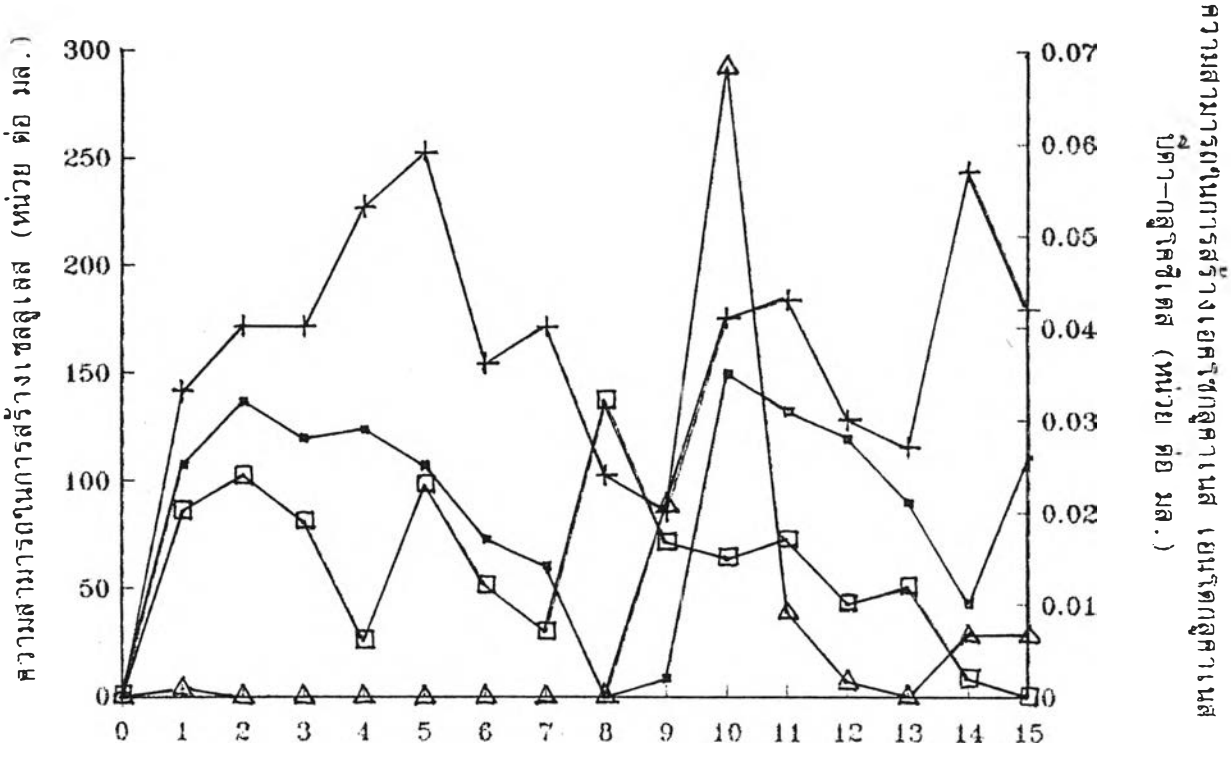
นำตัวแทนราที่คัดเลือกไว้ อันได้แก่ Syncephalustrum sp.YA_7 Aspergillus sp. Penicillium sp.YA_e และ Trichoderma sp.Pol_1 (ตารางที่ 7) มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek's dox media ที่มี 1% α-cellulose เป็นสารต้นตอคาร์บอน ใช้สูตรอาหารของ Mandel และ Sternberg ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1.4 โดยติดตามการสร้างเอนไซม์แบบต่างๆ ของราเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 วัน ดังแสดงในรูปที่ 10 , 11 , 12 , 13 ตามลำดับ สำหรับความสามารถสูงสุดในการสร้างเอนไซม์แบบต่าง ๆ ของราแต่ละสายพันธุ์ตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อนั้นแสดงไว้ในตารางที่ 8 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความสามารถสูงสุด ในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อต่าง ๆ พบว่า Trichoderma sp.

สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนสสูงสุด ในขณะที่ผลิตบีตา-กลูโคซิเดสในปริมาณใกล้เคียงกับ Aspergillus sp. CX_2

ตารางที่ 7 ผลการแยกและตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งCMC ของราจากตัวอย่างไม้ยางพารา

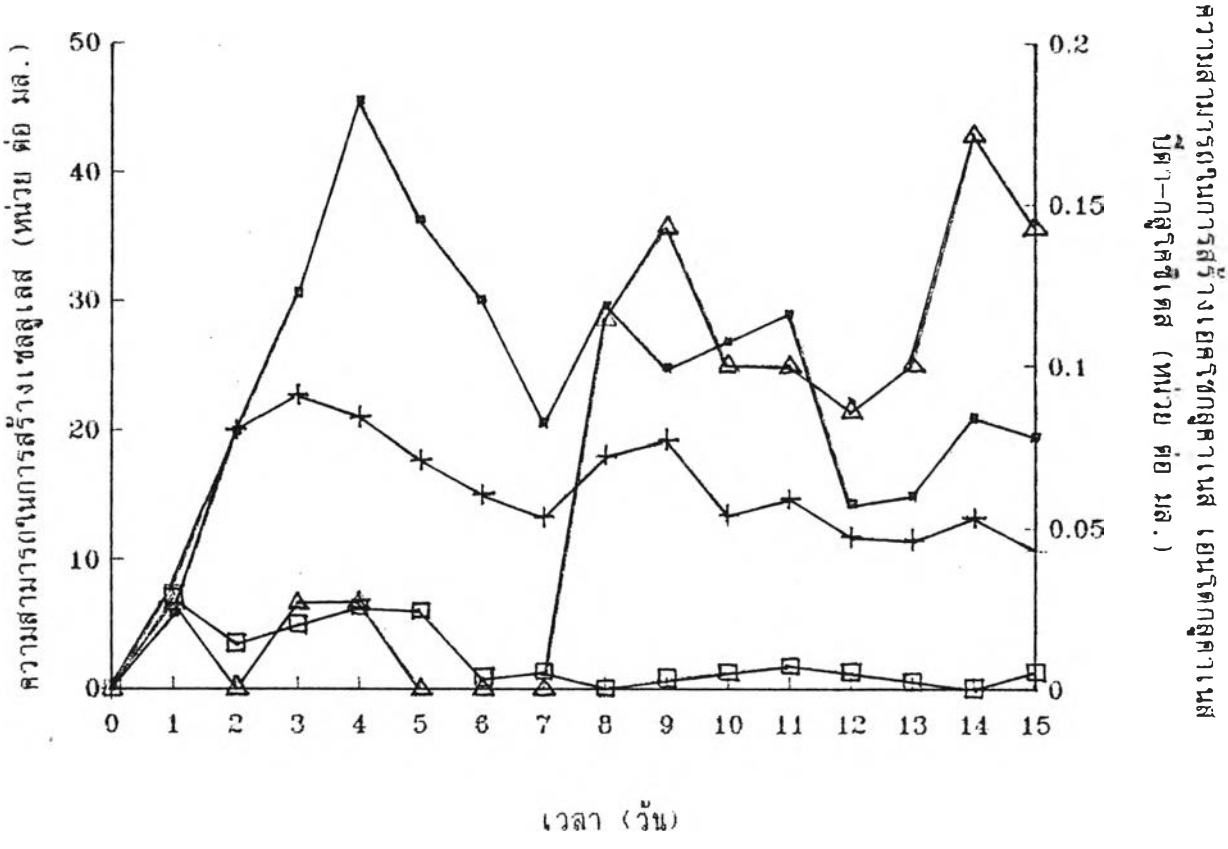
ชนิดของรา	หมายเลข ISOLATE	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี
Rhizopus sp.	YA_4*	1.0
Syncephalustrum sp.	YA_7*	1.0
Aspergillus spp.	YA_1*	1.21
	YA_3*	1.39
	YA_5	1.12
	CX_1	1.39
	CX_2*	1.53
Penicillium sp.	YA_8*	1.66
Trichoderma sp.	Pol_1*	2.0
Unidentified	YA_2	1.22
	CON_1	1.0
	CON_2	0.6

* สายพันธุ์ที่คัดเลือกสำหรับทดสอบขั้นต่อไป



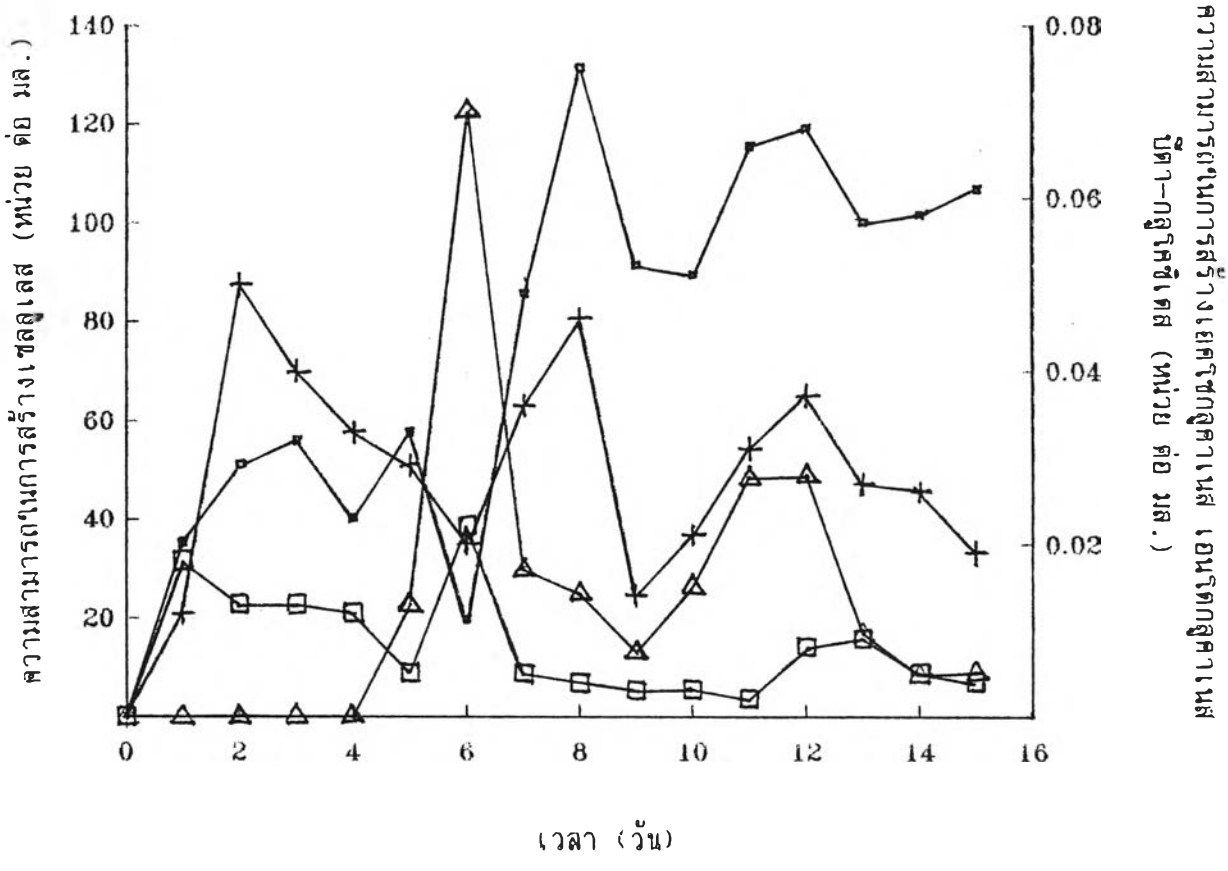
รูปที่ 10 การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส (C_1) เอนโดกลูคาเนส (Cx) บีตา-กลูโคซิเดส โดย Syncephalustrum sp. YA, เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวตามสูตรอาหารของ Mandels และ Sternberg โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

△—△ หมายถึง เซลลูเลส
□—□ หมายถึง เอคโซกลูคาเนส
+—+ หมายถึง เอนโดกลูคาเนส
▪—▪ หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส



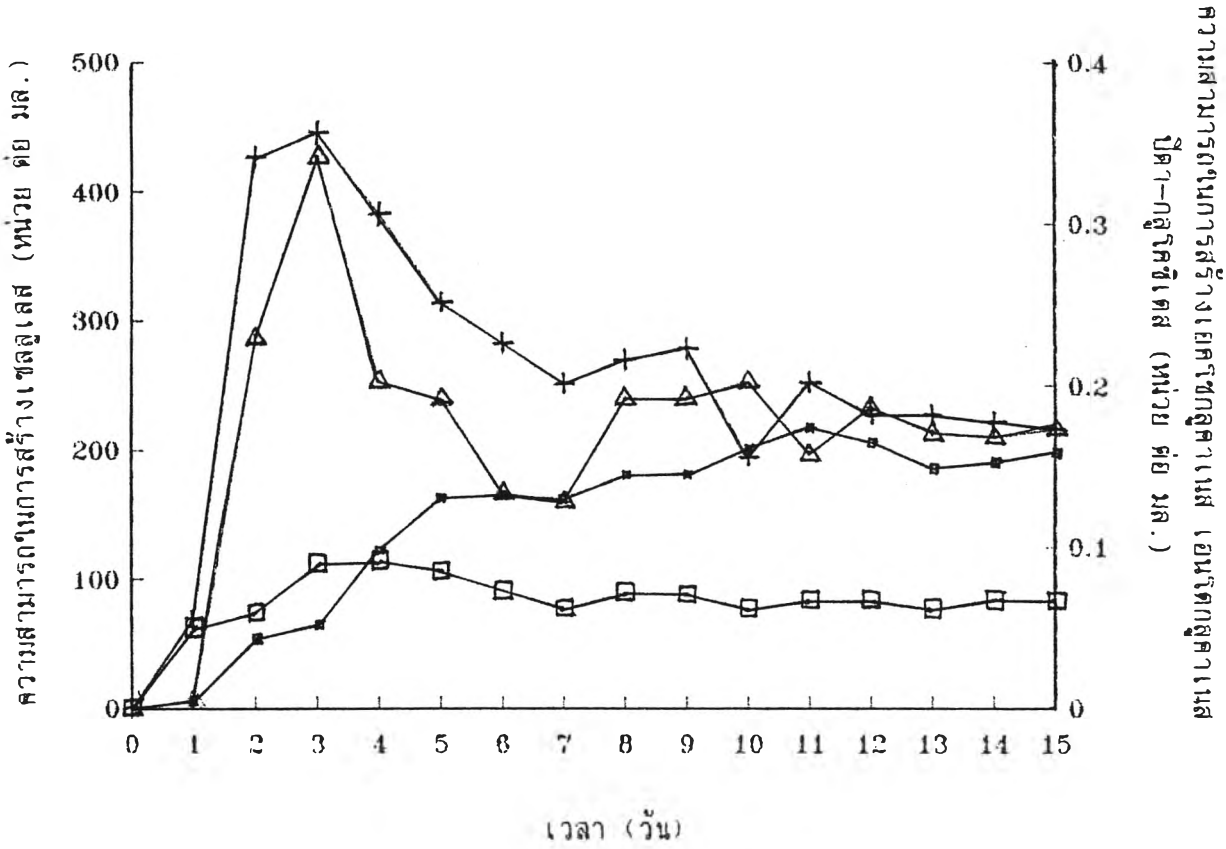
รูปที่ 11 การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส บีตา-กลูโคซิเดส โดย Aspergillus sp. CX_2 ภายใต้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 10

△—△ หมายถึง เซลลูเลส
□—□ หมายถึง เอคโซกลูคาเนส
+—+ หมายถึง เอนโดกลูคาเนส
■—■ หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส



รูปที่ 12 การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส โดย Penicillium sp. YA$_6$ ภายใต้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 10

หมายถึง เซลลูเลส
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส



รูปที่ 13 การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดสโดย Trichoderma sp. Pol ภายใต้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 10

หมายถึง เซลลูเลส
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส

ตารางที่ 8 ความสามารถสูงสุดในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส (C_1) เอนโดกลูคาเนส (CX) และ บีตา-กลูโคซิเดสจาก Syncephalustrum sp. YA_7 Aspergillus sp. CX_2 Penicillium sp. YA_6 และ Trichoderma sp. Pol_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวตามสูตรของ Mandels และ Sternberg ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที (ตัวเลขในวงเล็บท้ายปริมาณเอนไซม์แสดงวันที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด)

ราสายพันธุ์	ปริมาณเอนไซม์สูงสุด หน่วย ต่อ มล.(**)			
	เซลลูเลสรวม	เอคโซกลูคาเนส C_1	เอนโดกลูคาเนส CX	บีตา-กลูโคซิเดส
Syncephalustrum sp. YA_7	292.86(10)	0.032(8)	0.059(5)	0.035(10)
Aspergillus sp. CX_2	42.86(14)	0.028(1)	0.091(3)	0.182(4)
Penicillium sp. YA_6	122.62(6)	0.022(6)	0.050(2)	0.075(8)
Trichoderma sp. Pol_1	427.0 (3)	0.091(4)	0.356(3)	0.174(11)

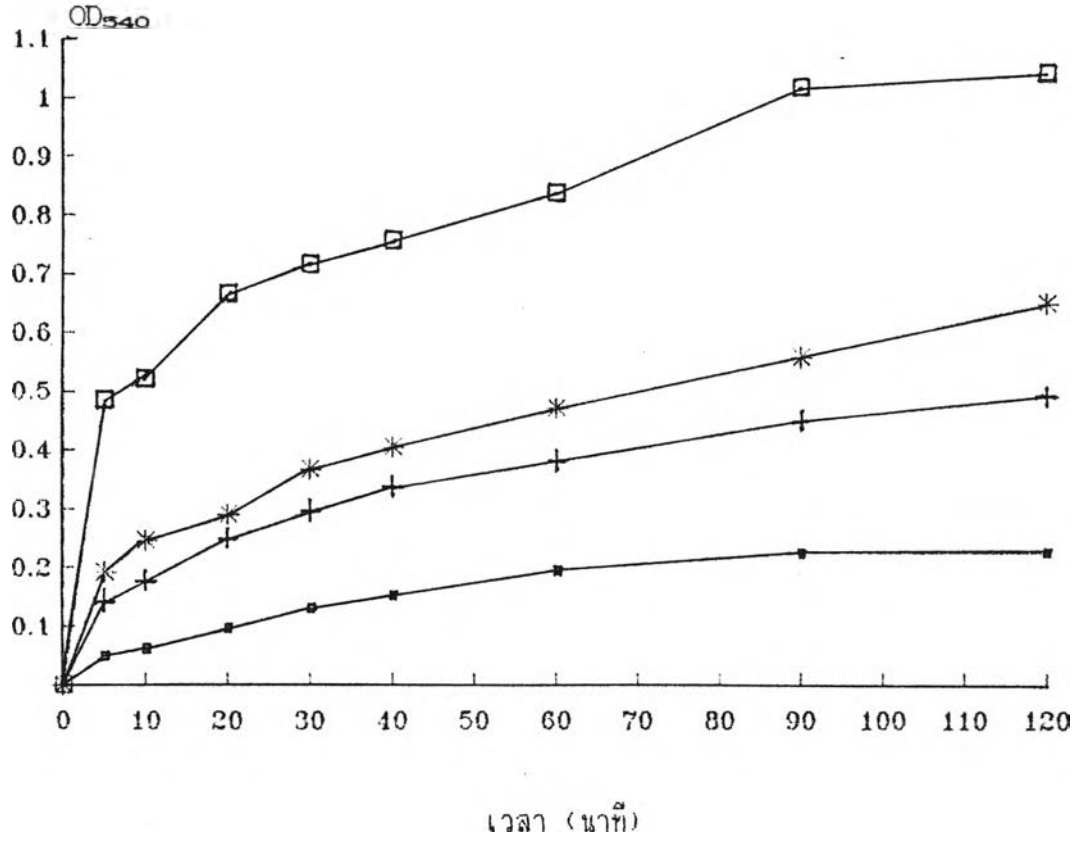
3. ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

จากผลการทดลองหัวข้อ 2 พบว่าราทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างไม้ยางพารา สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ เมื่อได้ทดสอบความสามารถของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 6 ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตขายทางการค้า และเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากตัวแทนราที่คัดเลือกไว้ พบว่า

3.1 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตทางพาณิชย์

3.1.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อความสามารถในการทำงานของสารละลายเอนไซม์ก่อนนำมาทดสอบกับสารประกอบดีบุกอินทรีย์

ผลการตรวจสอบหาความเข้มข้น ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ประเภทต่าง ๆ โดยใช้วิธีการตามข้อ 2.1 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอคโซกลูคาเนสคือ $5x10^{-2}$ เอนโดกลูคาเนส คือ $1x10^{-4}$ และ บีตา-กลูโคซิเดส คือ $1X10^{-3}$ ดังผลการทดลองในรูปที่ 14,15,16 จึงเลือกใช้ค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ได้นี้สำหรับในการทดลองขั้นต่อไป



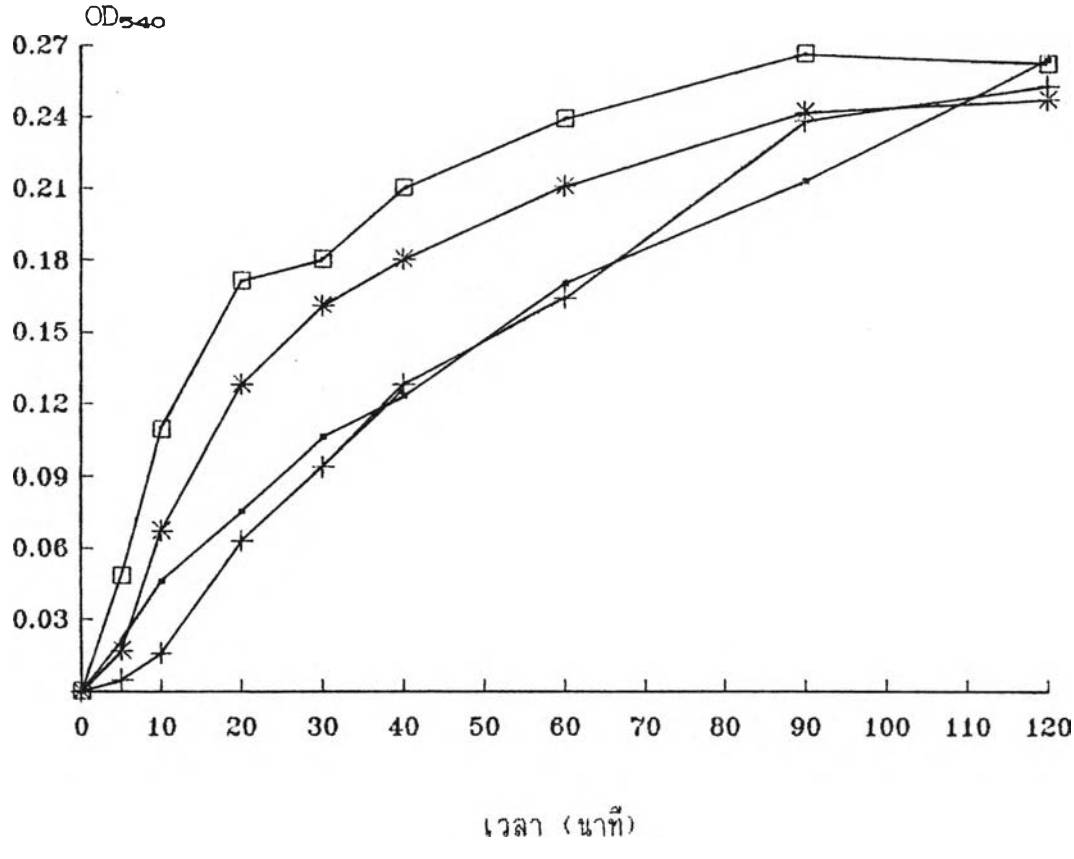
รูปที่ 14 ผลการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เอคโซกลูคาเนสที่ผลิตทางพาณิชย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

หมายถึง เอคโซกลูคาเนสเข้มข้น $1x10^{-3}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

หมายถึง เอคโซกลูคาเนสเข้มข้น $5x10^{-3}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

หมายถึง เอคโซกลูคาเนสเข้มข้น $1x10^{-2}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

หมายถึง เอคโซกลูคาเนสเข้มข้น $5x10^{-2}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น



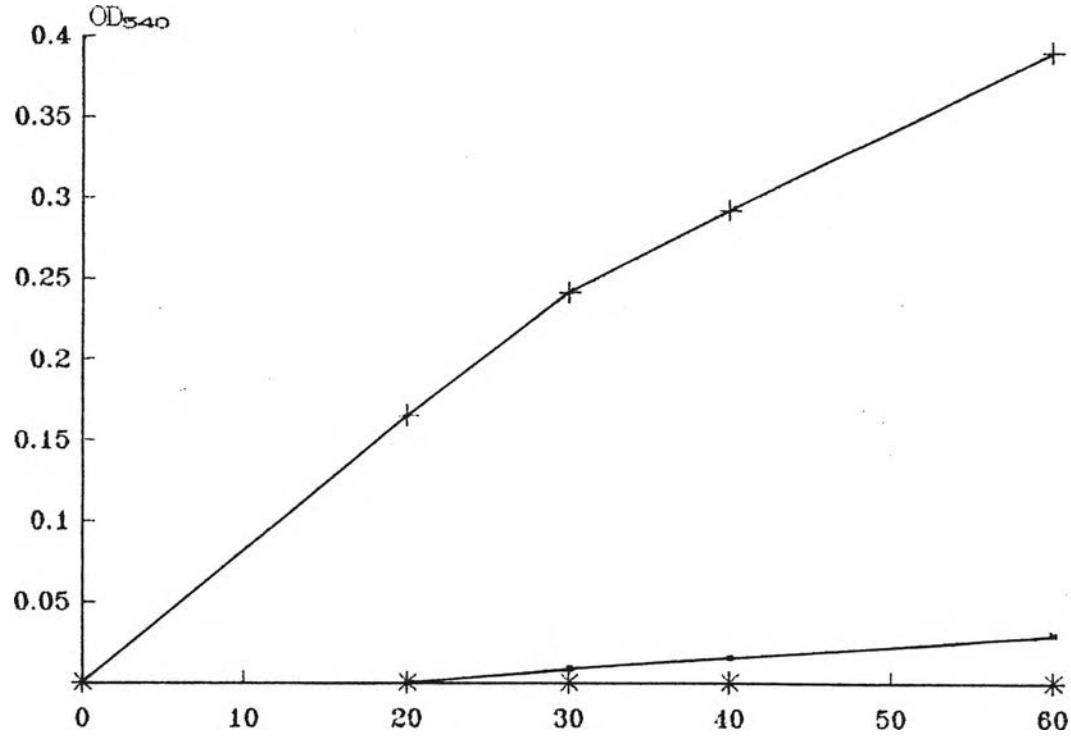
รูปที่ 15 ผลการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ผลิตทางพาณิชย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

หมายถึง เอนโดกลูคาเนสเข้มข้น $5x10^{-5}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

หมายถึง เอนโดกลูคาเนสเข้มข้น $1x10^{-4}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

หมายถึง เอนโดกลูคาเนสเข้มข้น $5x10^{-4}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

หมายถึง เอนโดกลูคาเนสเข้มข้น $1x10^{-3}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น



รูปที่ 16 ผลการแบ่รผันความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ บีตา-กลูโคซิเดสที่ผลิตทางพาณิชย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดสเข้มข้น $1x10^{-5}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดสเข้มข้น $1x10^{-4}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดสเข้มข้น $1x10^{-3}$ เท่าของเอนไซม์ตั้งต้น

3.1.2 การคัดเลือกสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนสที่ผลิตเชิงพาณิชย์

3.1.2.1 การคัดเลือกสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส

ทำการทดลองใช้สารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราตามในตารางที่ 6 มาทดสอบการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส โดยใช้ระยะเวลาบ่มสารละลายเอนไซม์ กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์นาน 5 นาที แล้วจึงนำสารละลายผสมมาทำปฏิกริยา กับสารละลายสับสเตรท และใช้ความเข้มข้นของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ ในระบบการทำงานของเอนไซม์ 100 ppm. ตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.2 พบว่าไตรเฟนิลทินอะซิเตต ให้ผลยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนสสูงสุด คือ 20.59% ดังแสดงใน ตารางที่ 9 จึงคัดเลือกไตรเฟนิลทินอะซิเตตเป็นตัวแทนสารประกอบดีบุกอินทรีย์ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.1.2.2 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส

ศึกษาผลของไตรเฟนิลทินอะซิเตตที่เข้มข้น 0.01, 1.0 และ 100 ppm. โดยแปรผันระยะเวลาบ่มสารละลายเอนไซม์ กับไตรเฟนิลทินอะซิเตตเป็น 2, 5 และ 10 นาทีก่อนนำมาทำปฏิกริยากับสารละลายสับสเตรท ตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.3 พบว่าที่สภาวะความเข้มข้นของไตรเฟนิลทินอะซิเตต 100 ppm.และระยะเวลาบ่มเอนไซม์กับไตรเฟนิลทินอะซิเตตนาน 10 นาที ให้ผลยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนสสูงสุดดังแสดงในรูปที่ 17 จึงคัดเลือกสภาวะการทดลองนี้สำหรับการทดลองต่อ ๆ ไป

3.1.2.3 ผลของไตรเฟนิลทินอะซิเตตต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอคโซกลูคาเนส

เมื่อนำไตรเฟนิลทินอะซิเตตที่ความเข้มข้น 100 ppm. มาบ่มกับเอนไซม์เอคโซกลูคาเนส นาน 10 นาที แล้วติดตามการเกิดน้ำตาลริดิวส์ ในระบบการทำงานของเอน

ไซม์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.4 พบว่าไตรเฟนิลทินอะซิเตตไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยปลดปล่อยระดับของน้ำตาลรีดิวส์ใกล้เคียงกันกับระบบควบคุม (รูปที่ 18)

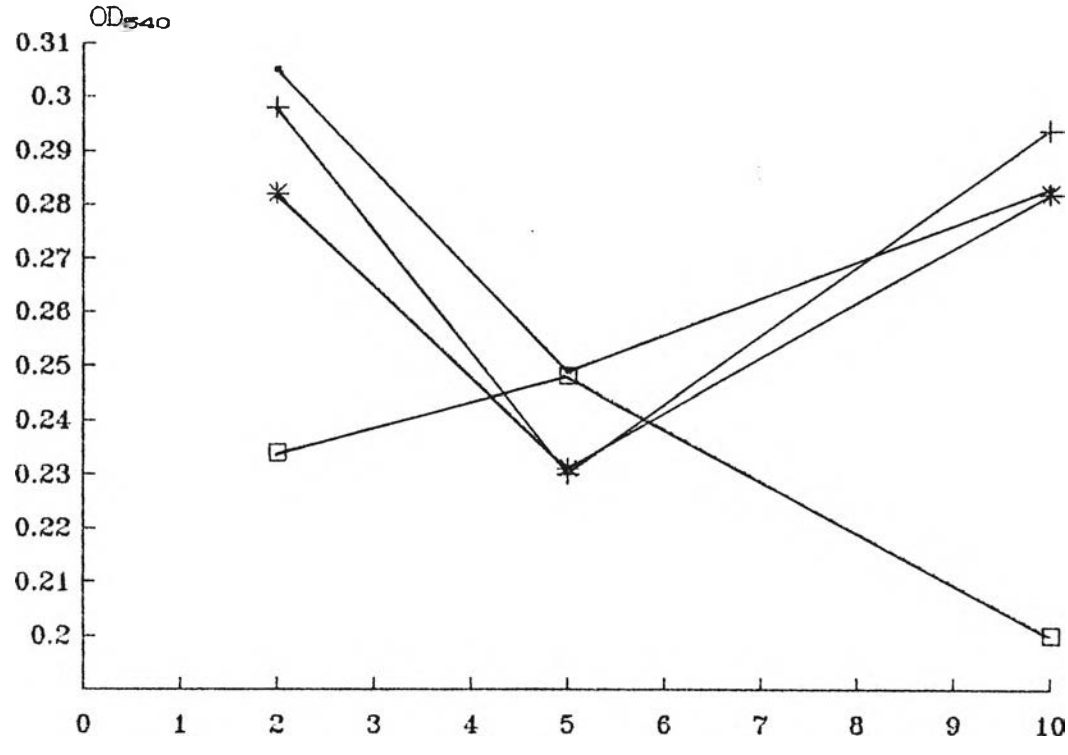
3.1.2.4 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนสที่สภาวะความเป็นกรดด่าง 4.0-8.0

เมื่อทดสอบผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราต่อการทำงานของเอคโซกลูคาเนส โดยใช้ความเข้มข้นของสารที่จะทดสอบเท่ากับ 100 ppm. พบว่า การยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนสค่อนข้างต่ำ ที่ pH 4.8 ดังตารางที่ 9 และเมื่อทดลองแปรผันค่าความเป็นกรดด่างในระบบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในช่วง pH 4.0-8.0 ตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.5 พบว่าการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างไม่มีผลต่อการเพิ่มความสามารถของสาร ที่นำมาทดสอบเข้มข้น 100 ppm. ในการยับยั้งการทำงานของเอคโซกลูคาเนส ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราต่อการยับยั้งการทำงานของเอคโซกลูคาเนส

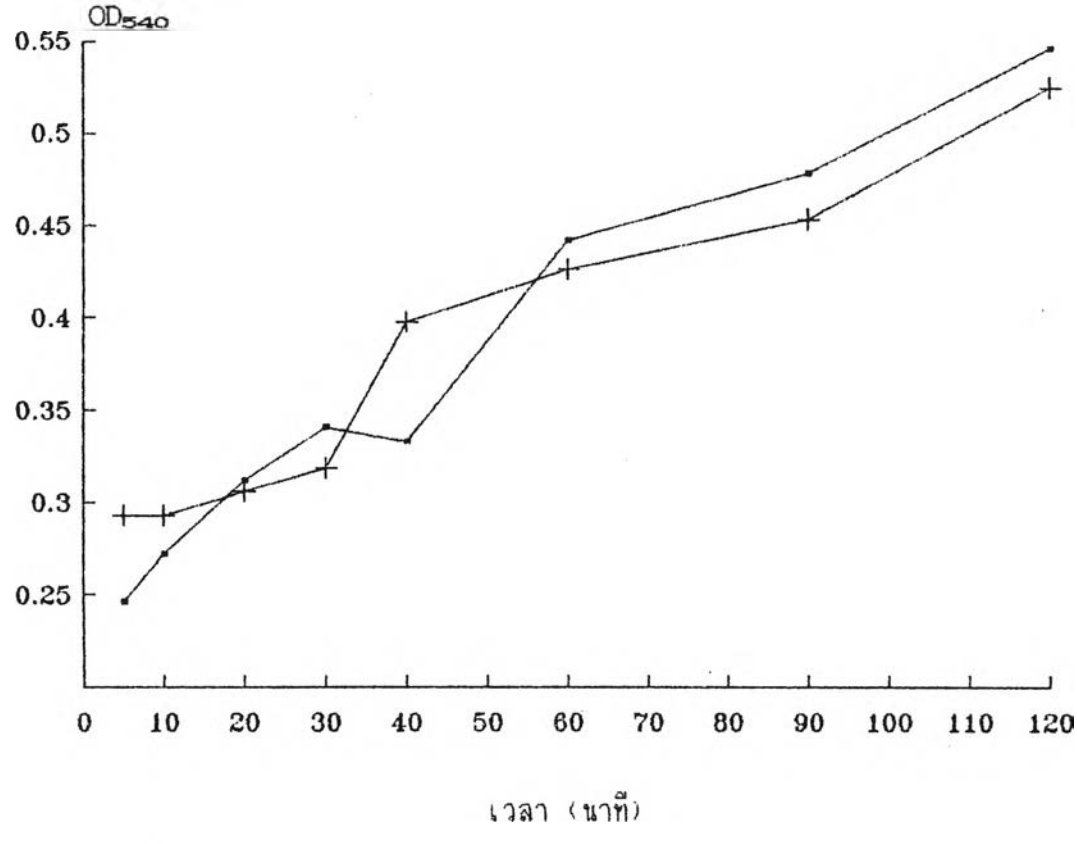
สาร	การยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส(เปอร์เซ็นต์)
สารประกอบดีบุกอินทรีย์	
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O)	16.37
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต	15.98
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต	20.59
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต	0.0
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต	11.38
ไตรบิวทิลทินฟลูออร์ไรด์ (T.B.T.F)	12.50
เมทาทิน 70-40 (T.B.T.O)	14.80
เมทาทิน 58-10/101	6.78
เมทาทิน 76-38 (T.B.T.F)	13.10
สารฆ่ารา	
เทคทาเมอร์ 38 พาวด์เดอร์	4.09
เมตาโซล ที เค - 100	17.52

ความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 100 ppm. ระยะเวลาบ่มเอนไซม์กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์นาน 5 นาที และเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบเป็นเอนไซม์ที่ผลิตทางพาณิชย์



รูปที่ 17 ผลการแปรผันความเข้มข้นไตรฟนิลทินอะซิเตตและระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับไตรฟนิลทินอะซิเตตต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส

หมายถึง ระบบควบคุม
หมายถึง ระบบที่บ่มกับไตรฟนิลทินอะซิเตตเข้มข้น 0.01 ppm
หมายถึง ระบบที่บ่มกับไตรฟนิลทินอะซิเตตเข้มข้น 1.0 ppm
หมายถึง ระบบที่บ่มกับไตรฟนิลทินอะซิเตตเข้มข้น 100 ppm



รูปที่ 18 ผลของไตรฟนิลทินอะซิเตตเข้มข้น 100 ppm และระยะเวลาที่บ่มกับสารละลายเอนไซม์นาน 10 นาที ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส

หมายถึง ระบบควบคุม

หมายถึง ระบบที่บ่มกับไตรฟนิลทินอะซิเตตเข้มข้น 100 ppm

ตารางที่ 10 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราเข้มข้น 100 ppm. ต่อการยับยั้งความสามารถ ในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส ที่ผลิตทางพาณิชย์ ที่สภาวะความเป็นกรดด่าง 4.0-8.0

สาร	การยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส(เปอร์เซ็นต์)				
	ความเป็นกรดด่าง (pH)				
	4.0	4.8	6.0	7.0	8.0
สารประกอบดีบุกอินทรีย์					
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O)	12.26	16.37	-	-	-
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต	12.26	15.98	12.16	-	-
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต	-	20.59	-	-	-
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต	-	-	-	14.86	-
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต	17.23	11.38	-	-	-
ไตรบิวทิลทินฟลูออไรด์ (T.B.T.F)	9.30	12.50	6.51	-	-
เมทาทิน 70-40 (T.B.T.O)	6.58	14.80	-	-	-
เมทาทิน 58-10/101	22.52	6.78	14.59	-	-
เมทาทิน 76-38 (T.B.T.F)	7.81	13.10	11.58	-	-
สารฆ่ารา					
เทคทาเมอร์ 38 พาวด์เดอร์	-	4.09	13.51	-	-
เมตาโซล ทีเด-100	12.26	17.52	-	-	-

เครื่องหมาย - แสดงไม่พบการยับยั้งการทำงานของเอคโซกลูคาเนส

3.1.3 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส

3.1.3.1 การคัดเลือกสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส

เมื่อนำสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราชนิดต่าง ๆ ตามตารางที่ 6 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนโดกลูคาเนส โดยใช้ระยะเวลาบ่มสารละลายกับสารประกอบดีบุกอินทรีย์ นาน 5 นาที ก่อนนำมาทำปฏิกริยากับสับสเตรท ตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.2 พบว่าบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ ไตรบิวทิลทินอะซิเตตและไตรเฟนิลทินอะซิเตตที่ความเข้มข้น 100 ppm. ให้ผลยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนสเท่ากับ 13.14 8.58 และ 8.3 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสารอื่นที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 11) จึงได้คัดเลือกสารประกอบดีบุกอินทรีย์ทั้งสามตัวไปศึกษาในการทดลองขั้นต่อไป

3.1.3.2 ผลการแปรผันความเข้มข้นของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่คัดเลือกและระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส

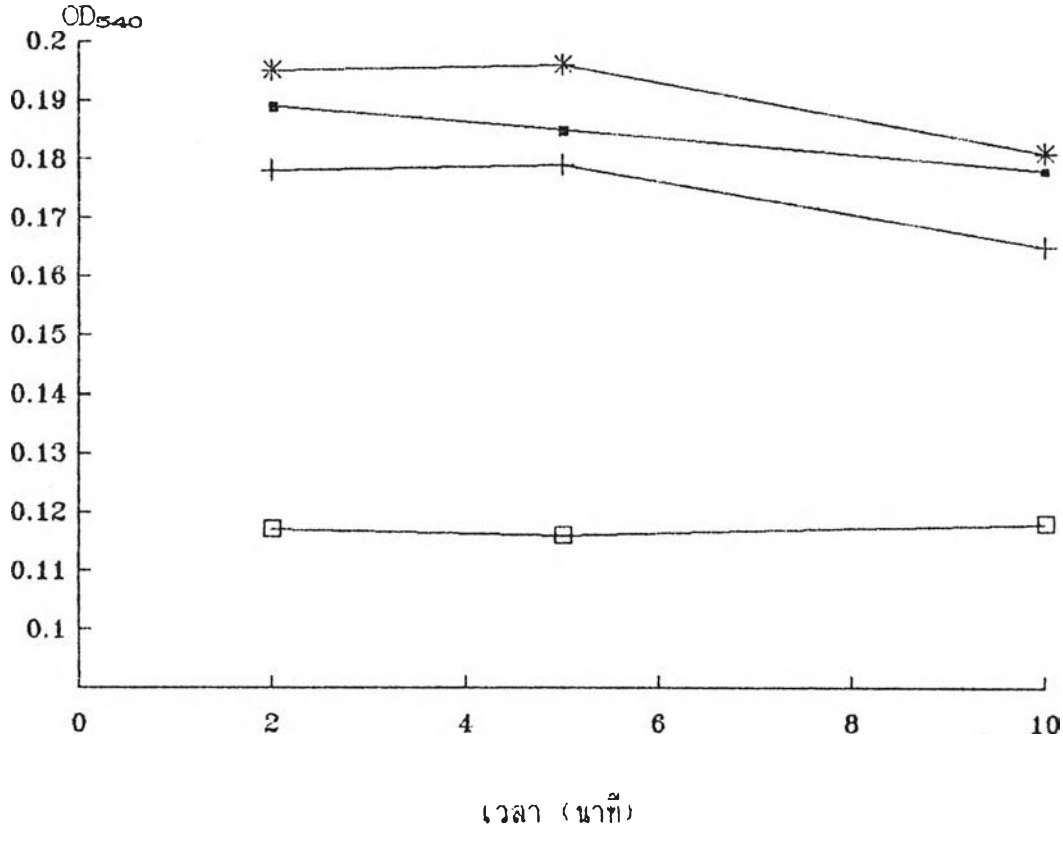
ทำการแปรผันความเข้มข้น ของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ไตรบิวทิลทินอะซิเตต และไตรเฟนิลทินอะซิเตต ให้มีความเข้มข้น 0.01, 1.0 และ 100 ppm.และแปรผันระยะเวลาบ่มสารละลายเอนไซม์ กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่ทดสอบเป็น 2,5 และ 10 นาที ก่อนมาทำปฏิกริยากับสารละลายสับสเตรท ตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.3 พบว่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ทั้งสามที่ความเข้มข้น 100 ppm. มากกว่า 0.01 ppm. มากกว่า 1.0 ppm. ในขณะที่การแปรผันระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์ไม่มีผลต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 19,20 และ 21

3.1.3.3 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราเข้มข้น 100 ppm. ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนสที่สภาวะความเป็นกรดด่าง4.0-8.0

จากการทดสอบผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราต่อการทำงานของเอนโดกลูคาเนส พบว่าการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนสค่อนข้างต่ำ โดยอาจมีสาเหตุจากค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้ในการทดลองคือ pH 4.8 ไม่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา ดังแสดงในตารางที่ 6 จึงได้ทำการทดลองแปรผันค่าความเป็นกรดด่าง ในระบบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.5 พบว่าการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถของสาร ที่นำมาทดสอบเข้มข้น 100 ppm. ในการยับยั้งการทำงานของเอนโดกลูคาเนสค่อนข้างต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 12

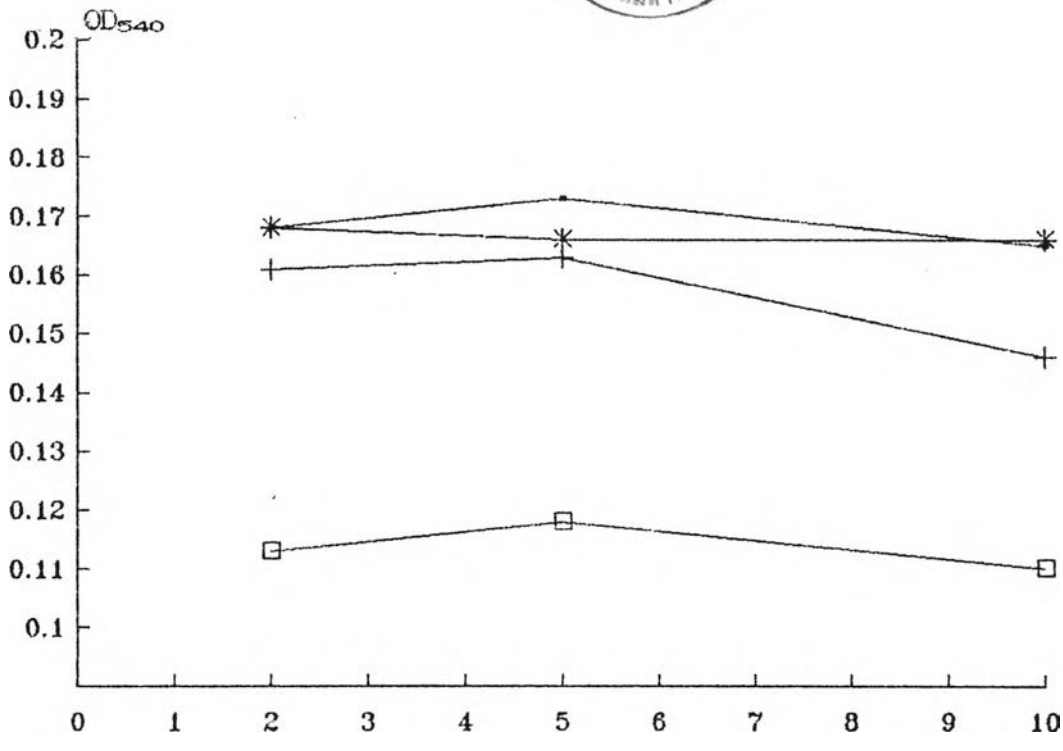
ตารางที่ 11 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราเข้มข้น 100 ppm. และระยะเวลาบ่มเอนไซม์กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์นาน 5 นาที ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนสที่ผลิตทางพาณิชย์

สาร	การยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส(เปอร์เซ็นต์)
สารประกอบดีบุกอินทรีย์	
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O)	13.14
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต	8.58
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต	8.30
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต	6.17
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต	1.34
ไตรบิวทิลทินฟลูออร์ไรด์ (T.B.T.F)	7.12
เมทาทิน 70-40 (T.B.T.O)	6.83
เมทาทิน 58-10/101	1.07
เมทาทิน 76-38 (T.B.T.F)	6.85
สารฆ่ารา	
เทคทาเมอร์ 38 พาวด์เดอร์	0.0
เมตาโซล ที เค - 100	0.0



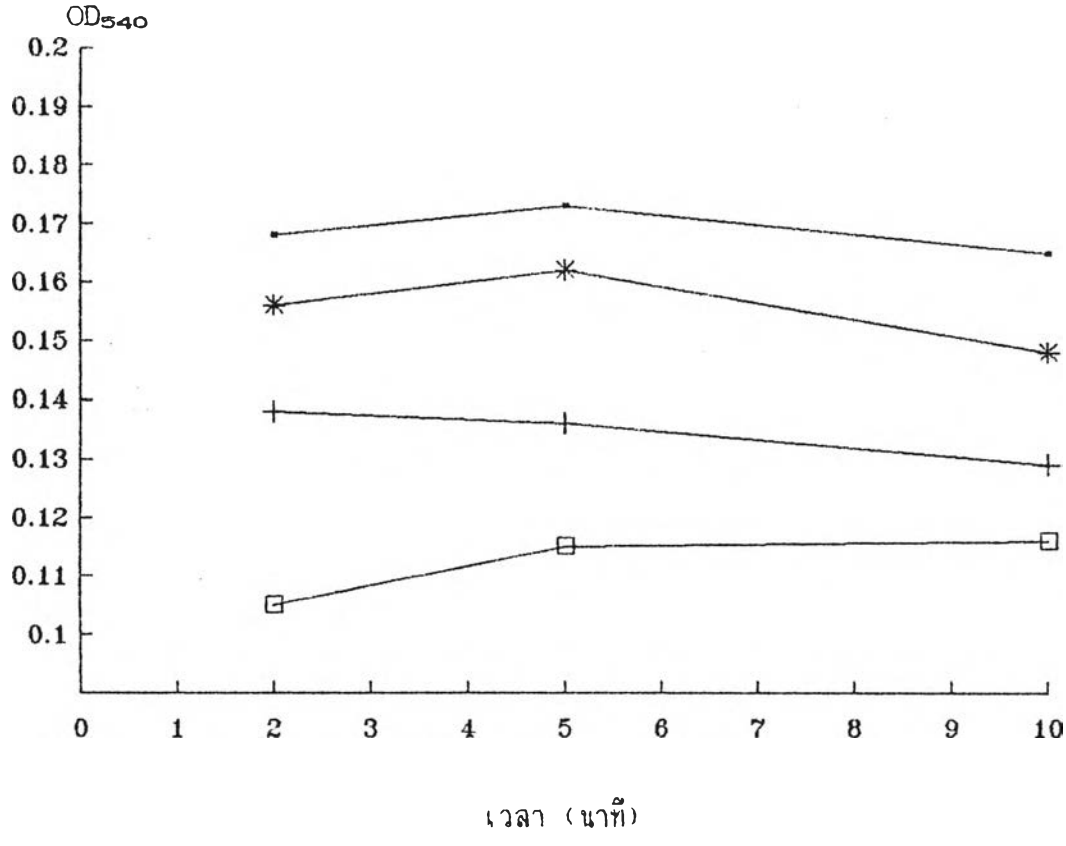
รูปที่ 19 ผลการแปรผันความเข้มข้นบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) และระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส

หมายถึง ระบบควบคุม
หมายถึง ระบบที่บ่มกับบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์เข้มข้น 0.01 ppm
หมายถึง ระบบที่บ่มกับบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์เข้มข้น 1.0 ppm
หมายถึง ระบบที่บ่มกับบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์เข้มข้น 100 ppm



รูปที่ 20 ผลการแปรผันความเข้มข้นบิสไตรบิวทิลทินอะซิเตตและระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับบิสไตรบิวทิลทินอะซิเตต ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส

หมายถึง ระบบควบคุม
หมายถึง ระบบที่บ่มกับบิสไตรบิวทิลทินอะซิเตตเข้มข้น 0.01 ppm
หมายถึง ระบบที่บ่มกับบิสไตรบิวทิลทินอะซิเตตเข้มข้น 1.0 ppm
หมายถึง ระบบที่บ่มกับบิสไตรบิวทิลทินอะซิเตตเข้มข้น 100 ppm



รูปที่ 21 ผลการแปรผันความเข้มข้นไตรฟนิลทินอะซิเตตและระยะเวลาที่ใช้บ่มสารละลายเอนไซม์กับไตรฟนิลทินอะซิเตตต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส

หมายถึง ระบบควบคุม
หมายถึง ระบบที่บ่มกับไตรฟนิลทินอะซิเตตเข้มข้น 0.01 ppm
หมายถึง ระบบที่บ่มกับไตรฟนิลทินอะซิเตตเข้มข้น 1.0 ppm
หมายถึง ระบบที่บ่มกับไตรฟนิลทินอะซิเตตเข้มข้น 100 ppm

ตารางที่ 12 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราเข้มข้น 100 ppm. ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนสที่ผลิตทางพาณิชย์ ที่สภาวะการเป็นกรดด่าง 4.0-8.0

สาร	การยับยั้งความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส(เปอร์เซ็นต์)				
	ความเป็นกรดด่าง (pH)				
	4.0	4.8	6.0	7.0	8.0
สารประกอบดีบุกอินทรีย์					
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O)	11.5	13.14	10.74	16.49	-
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต	4.97	8.58	11.12	13.40	18.18
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต	6.02	8.30	11.99	19.59	-
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต	2.88	6.17	4.84	-	11.82
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต	-	1.34	5.50	-	7.27
ไตรบิวทิลทินฟลูออไรด์ (T.B.T.F)	7.32	7.12	8.31	3.15	-
เมทาทิน 70-40 (T.B.T.O)	4.32	6.83	3.51	4.35	-
เมทาทิน 58-10/101	-	1.07	7.16	13.92	-
เมทาทิน 76-38 (T.B.T.F)	3.37	6.85	2.49	1.57	-
สารฆ่ารา					
เทคทาเมอร์ 38 พาวด์เดอร์	0.05	-	-	-	-
เมตาโซล ทีเค-100	-	-	0.39	7.22	-

เครื่องหมาย - แสดง ไม่มีผลการยับยั้งการทำงานของเอนโดกลูคาเนส

3.1.4 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อความสามารถในการทำงานของ บีตา-กลูโคซิเดส ที่ผลิตทางพาณิชย์ ที่สภาวะความเป็นกรดด่าง 4.0-8.0

เมื่อทดสอบความสามารถของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราที่ความเข้มข้น 100 ppm. ต่อการยับยั้งการทำงานของ บีตา-กลูโคซิเดส ที่ผลิตทางพาณิชย์ โดยแปรผันที่สภาวะความเป็นกรดด่าง 4.0-8.0 ตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.5 พบว่าภายใต้สภาวะการทดลองนี้สารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา มีผลต่อการยับยั้งการทำงาน ของ บีตา-กลูโคซิเดสต่ำดังแสดงในตารางที่ 13

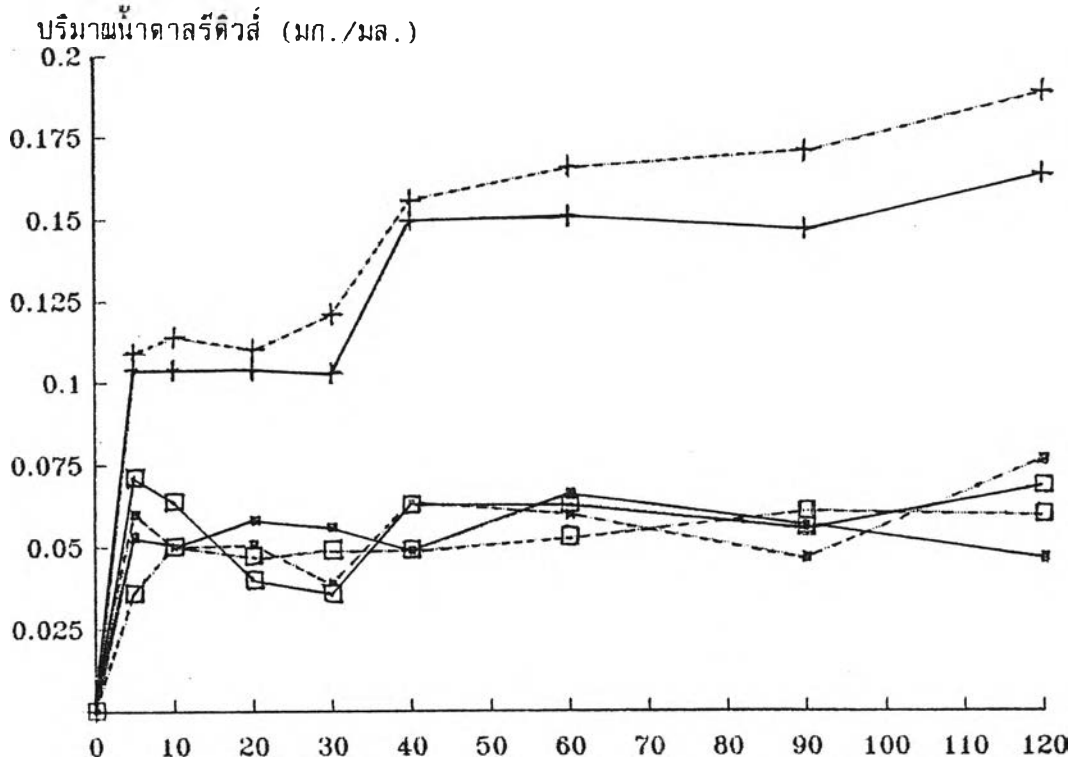
3.2 **ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O) เข้มข้น 100 ppm. ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากตัวแทนราที่คัดเลือก**

สืบเนื่องจากผลการทดลองข้างต้นพบว่า จากกลุ่มสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่ทดสอบนั้น T.B.T.O. ให้ผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับตัวอื่น ๆ ดังนั้นจึงทำการทดสอบผลของ T.B.T.O ต่อการทำงานของเอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส ที่สร้างจากตัวแทนราบางกลุ่ม ที่คัดเลือกไว้อันได้แก่ Syncephalustrum sp.YA_7 Aspergillus sp.CX_2 Penicillium sp.YA_8 และ Trichoderma sp.Pol_1 ตามวิธีการทดลองข้อ 2.2 โดยใช้ความเข้มข้นของ T.B.T.O. 100 ppm. พบว่า T.B.T.O. มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่ำ ดังรูป 22 , 23, 24 และ 25 ตามลำดับ

ตารางที่ 13 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราเข้มข้น 100 ppm. ต่อการยับยั้งความสามารถในการทำงานของ บีตากลูโคซิเดส ที่ผลิตทางพาณิชย์ ที่สภาวะความเป็นกรดด่าง 4.0-8.0

สาร	การยับยั้งความสามารถในการทำงานของ บีตา-กลูโคซิเดส (เปอร์เซ็นต์)				
	ความเป็นกรดด่าง (pH)				
	4.0	4.8	6.0	7.0	8.0
สารประกอบดีบุกอินทรีย์					
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O)	-	-	4.95	-	8.04
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต	-	3.73	2.23	-	-
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต	-	1.54	7.55	-	5.36
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต	-	-	5.69	-	-
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต	-	0.77	2.23	-	2.68
ไตรบิวทิลทินฟลูออไรด์ (T.B.T.F)	-	0.30	3.18	-	-
เมทาทิน 70-40 (T.B.T.O)	-	0.51	5.41	0.08	3.41
เมทาทิน 58-10/101	-	-	0.97	-	-
เมทาทิน 76-38 (T.B.T.F)	-	-	2.15	-	-
สารฆ่ารา					
เทลทาเมอร์ 38 พาวด์เดอร์	-	-	4.21	-	-
เมตาโซล ทีเค-100	-	0.39	3.47	-	-

เครื่องหมาย - แสดงไม่พบผลยับยั้งการทำงานของ บีตา-กลูโคซิเดส



รูปที่ 22 ผลของสารประกอบตัวยกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 100 ppm ต่อความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส เอนโด-กลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส ที่สร้างจาก Syncephalustrum sp. YA_7

หมายถึง เอคโซกลูคาเนส

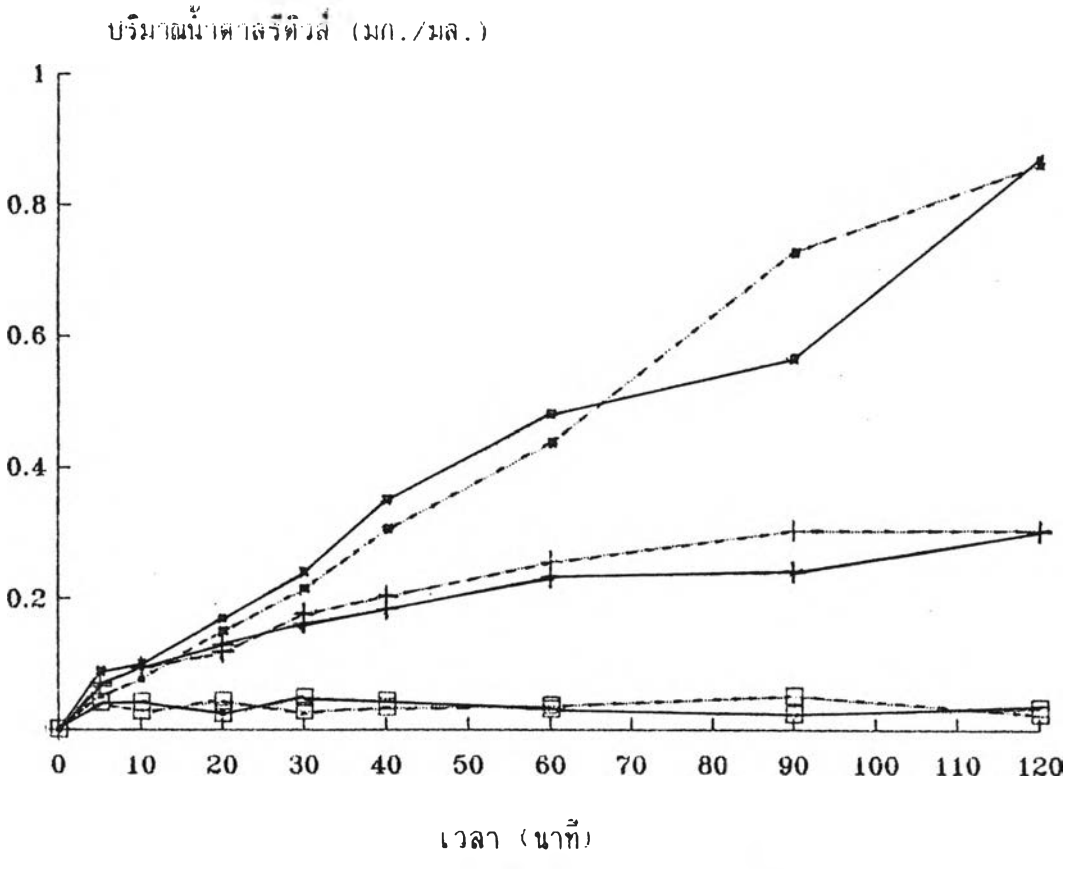
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส + T.B.T.O.

หมายถึง เอนโดกลูคาเนส

หมายถึง เอนโดกลูคาเนส + T.B.T.O.

หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส

หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส + T.B.T.O.



รูปที่ 23 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 100 ppm ต่อความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส เอนโด-กลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส ที่สร้างจาก Aspergillus sp. YA_6

หมายถึง เอคโซกลูคาเนส

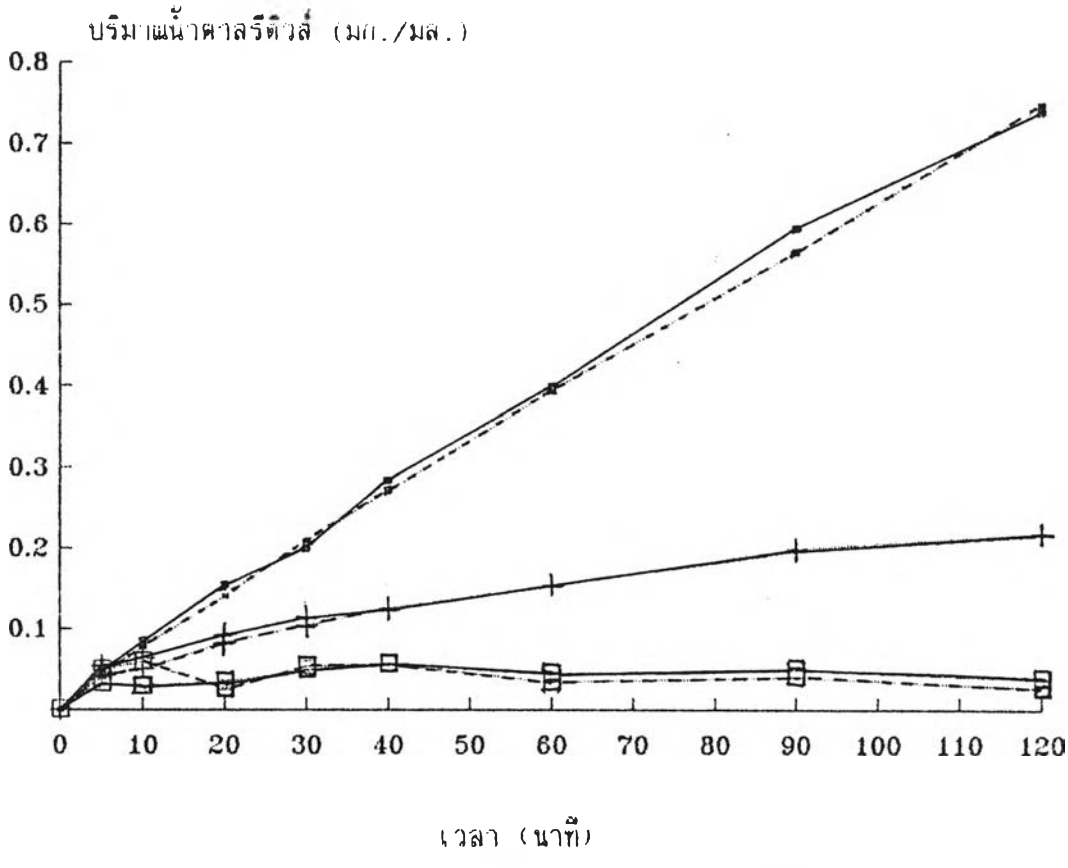
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส - T.B.T.O.

หมายถึง เอนโดกลูคาเนส

หมายถึง เอนโดกลูคาเนส + T.B.T.O.

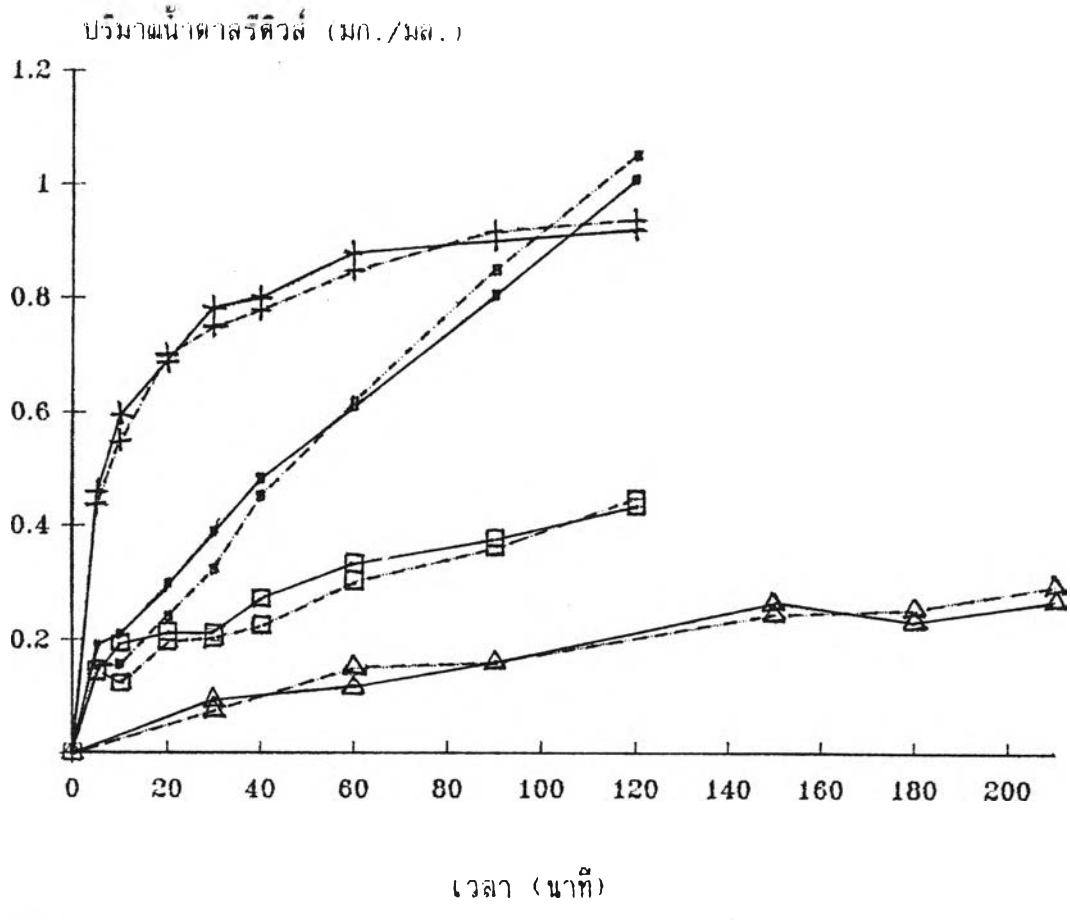
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส

หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส + T.B.T.O.



รูปที่ 24 ผลของสารประกอบตีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 100 ppm ต่อความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส เอนโด-กลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส ที่สร้างจาก Penicillium sp. CX$_2$

หมายถึง เอคโซกลูคาเนส
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส + T.B.T.O.
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส + T.B.T.O.
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส + T.B.T.O.



รูปที่ 25 ผลของสารประกอบตัวยกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 100 ppm ต่อความสามารถในการทำงานของเอคโซกลูคาเนส เอนโด-กลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส ที่สร้างจาก Trichoderma sp. Pol

หมายถึง เซลลูเลส
หมายถึง เซลลูเลส + T.B.T.O.
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส + T.B.T.O.
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส + T.B.T.O.
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส + T.B.T.O.

4. <u>ผลการทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์จากตัวแทนราที่คัดเลือก</u>

จากการศึกษาผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ ทำให้สามารถจำแนกลักษณะการยับยั้งการงอกของสปอร์แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราว (static effect) การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า (sub lethal effect) การยับยั้งการงอกของสปอร์และให้ผลฆ่าสปอร์ (cidal effect) โดยกำหนดให้มีลักษณะการยับยั้งแต่ละชนิดดังนี้

<u>การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราว</u> (static effect)

หมายถึง การยับยั้งการงอกของสปอร์ในอาหารเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์หรือสารฆ่ารา เป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน แต่เมื่อล้างเอาสารยับยั้งออกและย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ สปอร์จะเจริญได้

<u>การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า</u> (sub lethal effect)

หมายถึง การที่พบการยับยั้งการงอกของสปอร์ ในอาหารเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์หรือสารฆ่ารา และเมื่อล้างสปอร์แล้วนำไปเลี้ยงอาหารใหม่ จะไม่พบการเจริญของสปอร์ แต่หากเติมสารดีเทอร์เจนท์ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม จะพบการงอกของสปอร์ที่เคยถูกยับยั้งได้ (reverse spore germination)

<u>การยับยั้งการงอกของสปอร์และให้ผลฆ่าสปอร์</u> (cidal effect)

หมายถึง พบผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อสปอร์เช่นเดียวกับ sub lethal effect แต่ดีเทอร์เจนท์ไม่สามารถช่วยให้งอกใหม่ได้

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์จากตัวแทนของรา ที่คัดเลือกไว้แบบชั่วคราว(static effect) ตามวิธีการทดลองข้อ 3.2 และเมื่อเพิ่มปริมาณของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3 สารเหล่านี้จะยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า (sub lethal effect) โดยพบว่าปริมาณต่ำสุด และจำนวนวันที่บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์แล้วทำให้เกิดการยับยั้งดังกล่าวของราแต่ละชนิดแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่15

จากการทดลองหาระยะเวลา (วัน) ที่ใช้บ่มสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์หรือสารฆ่าราเข้มข้น 15 ppm. แล้วให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า ตามวิธีการทดลองข้อ 3.4 พบระยะเวลาที่แน่นอนที่บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ ที่ผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และ สารฆ่ารา แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 16

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่นำมาทดสอบต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบต่าง ๆ จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 14,15,16 พบว่า T.B.T.O. ที่สังเคราะห์โดยภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ราและเนื่องจาก T.B.T.O เป็นสารต้นแบบหรือใช้เป็นส่วนประกอบในการปรับปรุงสูตรโครงสร้าง ของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ชนิดอื่นๆ(45) จึงเลือก T.B.T.O เป็นตัวแทน ในการศึกษาผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อตัวแทนราที่แยกจากไม้ยางพาราในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 14 ปริมาณต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ ที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราว (Static effect)*

สาร	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา (ppm.) ที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์					
	ราสายพันธุ์					
	Rhizopus sp.YA_4	Syncephalustrum sp.YA_7	Aspergillus sp.YA_3	Aspergillus sp.CX_2	Penicillium sp.YA_9	Trichoderma sp.Pol_1
สารประกอบดีบุกอินทรีย์						
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O)	5	5	5	5	5	2
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต	5	5	5	1<X<5	5	5
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต	5	5	5	1<X<5	5	1<x<5
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต	10	10	15	10	15	10
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต	5	5	5	1<X<5	5	5

* การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราว (static effect) หมายถึง การยับยั้งการงอกของสปอร์ในอาหารเหลวผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์หรือสารฆ่าราเป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน แต่เมื่อล้างเอาสารยับยั้งออกและย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ สปอร์จะเจริญได้

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สาร	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา (ppm.) ที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์					
	ราสายพันธุ์					
	Rhizopus sp.YA_4	Syncephalustrum sp.YA_7	Aspergillus sp.YA_3	Aspergillus sp.CX_2	Penicillium sp.YA_6	Trichoderma sp.Pol_1
ไตรบิวทิลทินฟลูออไรด์ (T.B.T.F.)	5<X<10	10	5<X<10	5	5<X<10	5
เมทาทิน 70-40 (T.B.T.O)	15	5	15	15	15	15
เมทาทิน58-10/101	5	5	15	5	5	
เมทาทิน 76-38 (T.B.T.F.)	5	5	5	5	5	5
สารฆ่าราเทคทาเมอร์ 38 พาวเดอร์	25	40	25	20	20	20
เมตาโซลที่เค-100	20	60	30	20	25	25

ตารางที่ 15 ปริมาณต่ำสุดของสารประกอบคีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ ที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า (sub lethal effect)*

สาร	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบคีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา (ppm.) ที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์					
	ราสายพันธุ์					
	Rhizopus sp.YA$_4$	Syncephalustrum sp.YA$_7$	Aspergillus sp.YA$_3$	Aspergillus sp.CX$_2$	Penicillium sp.YA$_6$	Trichoderma sp.Pol$_1$
สารประกอบคีบุกอินทรีย์						
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)	10(3)**	20(8)	15(2)	10(1)	15(1)	5(1)
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต	20(6)	20(10)	20(6)	5(4)	15(10)	10(7)
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต	15(4)	70(2)	15(1)	5(1)	15(1)	5(1)
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต	20(4)	30(8)	30(10)	20(2)	25(4)	15(6)
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต	20(6)	50(10)	15(10)	5(7)	15(6)	10(8)

* การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า (sub lethal effect) หมายถึง การยับยั้งการงอกของสปอร์ในอาหารเหลวผสมสารประกอบคีบุกอินทรีย์หรือสารฆ่ารา – และเมื่อล้างสปอร์แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารใหม่ จะไม่พบการเจริญของสปอร์ แต่หากเติมสารดีเทอร์เจนท์ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม จะพบการงอกของสปอร์ที่เคยถูกยับยั้งได้

** ตัวเลขใน ( ) แสดงจำนวนวันที่บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์แล้วพบผลการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า

ตารางที่ 15 (ต่อ)

สาร	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา (ppm.) ที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์					
	ราสายพันธุ์					
	Rhizopus sp.YA_4	Syncephalustrum sp.YA_7	Aspergillus sp.YA_8	Aspergillus sp.CX_2	Penicillium sp.YA_9	Trichoderma sp.Pol_1
ไตรบิวทิลทินฟลูออไรด์(T.B.T.F.)	10(8)	40(3)	10(3)	10(8)	10(8)	10(8)
เมทาทิน 70-40 (T.B.T.O)	15(10)	20(5)	15(10)	15(10)	15(10)	15(10)
เมทาทิน58-10/101	15(6)	55(10)	35(2)	10(6)	10(9)	10(3)
เมทาทิน 76-38 (T.B.T.F.)	10(6)	50(10)	15(2)	5(6)	15(2)	5(3)
สารฆ่ารา						
เทคทาเมอร์ 38 พาวเดอร์	30(3)	40(10)	30(4)	20(8)	25(8)	20(9)
เมตาโซลที่เค-100	35(4)	80(5)	40(3)	30(5)	45(3)	

** ตัวเลขใน ( ) แสดงจำนวนวันที่บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์แล้วพบผลการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า

ตารางที่ 16 ระยะเวลา(วัน) ที่บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่ผสมสารประกอบดีบุกอินทรีย์หรือสารฆ่าราเข้มข้น 15 ppm.แล้วให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า** (sub lethal effect)

สาร	ระยะเวลา(วัน)					
	ราสายพันธุ์					
	Rhizopus sp.YA$_4$	Syncephalustrum sp.YA$_7$	Aspergillus sp.YA$_9$	Aspergillus sp.CX$_2$	Penicillium sp.YA$_6$	Trichoderma sp.Pol
สารประกอบดีบุกอินทรีย์						
บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)	1	40	2	1	1	11
ไตรบิวทิลทินอะซิเตต	*	*	*	4	10	1
ไตรเฟนิลทินอะซิเตต	4	45	1	1	10	1
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลฟิเนต	10	45	40	10	30	6
ไตรบิวทิลทินมีเทนซัลโฟเนต	40	45	10	1	6	1
ไตรบิวทิลทินฟลูออไรด์(T.B.T.F.)	1	45	1	1	1	1

* แสดงไม่พบผลการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าเมื่อบ่มในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ครบ 45 วัน

** หมายถึง พบผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อสปอร์เช่นเดียวกับ sub lethal effect แต่ดีเทอร์เจนท์ไม่สามารถช่วยให้งอกใหม่ได้

ตารางที่ 16 (ต่อ)

สาร	ระยะเวลา(วัน)					
	ราสายพันธุ์					
	Rhizopus sp.YA_4	Syncephalustrum sp.YA_7	Aspergillus sp.YA_3	Aspergillus sp.CX_2	Penicillium sp.YA_6	Trichoderma sp.Pol
เมทาทิน 70-40 (T.B.T.O)	10	40	10	10	10	10
เมทาทิน58-10/101	6	45	*	1	1	1
เมทาทิน 76-38 (T.B.T.F.)	1	45	2	1	2	1
สารฆ่ารา						
เทคทาเมอร์ 38 พาวเดอร์	*	*	*	*	*	*
เมตาโซลทีเค-100	*	*	*	*	40	*

* แสดงไม่พบผลการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าเมื่อบ่มในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ครบ 45 วัน

5. การหาข้อมูลเบื้องต้นของการยับยั้งการงอกของสปอร์จากตัวแทนราที่คัดเลือกโดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)

จากการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา พบว่าสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) ที่สังเคราะห์โดยภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของตัวแทนรา ที่คัดเลือกจากกลุ่มราที่แยกจากไม้ยางพารา จึงใช้สารประกอบดีบุกอินทรีย์ T.B.T.O. เป็นตัวแทนในการหาข้อมูลเบื้องต้นของการยับยั้งการงอกของสปอร์

5.1 ผลของสารกลุ่มดีเทอร์เจนท์ต่อสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า(sub lettal effect) โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)

เนื่องจากการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า อาจเกิดเนื่องจาก T.B.T.O. จับรอบผิวสปอร์ทำให้อาหารจากภายนอกเข้าในสปอร์ไม่ได้ ดังนั้น ถ้าใช้ดีเทอร์เจนท์ตัวที่เหมาะสมเติมในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์อาจดึง T.B.T.O. ออกจากผิวสปอร์ทำให้สปอร์ germinate ใหม่ได้ จึงได้ทดลองใช้สารดีเทอร์เจนท์ทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ 1.Non-ionic detergentได้แก่ tween 80 triton x-100 2.กลุ่ม Cationic detergent ได้แก่ cetylpyridinium chloride และ 3.กลุ่ม Anionic detergent ได้แก่ S.D.S. มาทดสอบผลของสารดีเทอร์เจนท์ ต่อสปอร์ที่ถูกยับยั้งแบบกึ่งฆ่า อนึ่งการจับของ T.B.T.O. นั้นหากไม่มีสารอาหารอยู่การจับของ T.B.T.O. น่าจะจับกับผิวสปอร์ จึงทำการศึกษาในระบบที่มีแต่น้ำเท่านั้น เพื่อศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ด้วย จึงทดสอบผลของดีเทอร์เจนท์ ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าในระบบการยับยั้งที่ตัวกลางเป็นอาหารเหลว PDB และ ในระบบการยับยั้งที่ตัวกลางเป็นน้ำ (Distilled water)

5.1.1 ผลของสารกลุ่มดีเทอร์เจนท์ต่อสปอร์ที่ถูกยับยั้งแบบกึ่งฆ่าโดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิลทิลทินออกไซด์ T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่มีตัวกลางเป็นอาหารเหลว

ทำการทดลองใช้ดีเทอร์เจนท์ดังกล่าวข้างต้นเติม ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่พบว่ามีการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าแล้ว โดยแปรผันหาความเข้มข้นต่ำสุดของดีเทอร์เจนท์ที่สามารถทำให้เกิดการงอกของสปอร์ที่ถูกยับยั้งได้ (reverse spore germination) ตามวิธีการทดลองข้อ 4.1.1 พบสารดีเทอร์เจนต์บางตัวสามารถ ทำให้เกิดการงอกของสปอร์ที่ถูกยับยั้งแบบกึ่งฆ่าได้ดังแสดงในตารางที่ 17

5.1.2 ผลของสารกลุ่มดีเทอร์เจนท์ต่อสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าโดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.) ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่มีตัวกลางเป็นน้ำกลั่น

จากการทดลองตามวิธีที่ 4.1.2 พบว่าสารดีเทอร์เจนท์ไม่สามารถทำให้เกิด reverse spore germination ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่มีตัวกลางเป็นน้ำกลั่น

ตารางที่ 17 ปริมาณต่ำสุดของสารดีเทอร์เจนท์ ที่ทำให้เกิดการงอกของสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า (sub lethal effect) โดย T.B.T.O. ในระบบการยับยั้ง ที่ตัวกลางเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDB)

ราสายพันธุ์	ปริมาณต่ำสุดของสารดีเทอร์เจนท์ที่ทำให้เกิดการงอกของสปอร์(%)			
	สารดีเทอร์เจนท์			
	TWEEN 80	TRITON X-100	CETYLPYRIDINIUMCHLORIDE	SDS
Syncephalustrum sp.YA$_7$	2 (2)	3(6)	-	-
Aspergillus sp.CX$_2$	2 (7)	-	-	-
Penicillium sp.YA$_2$	2 (7)	-	-	-
Trichoderma sp. Pol$_1$	0.01(2)	-	-	-

ตัวเลขใน () แสดงจำนวนวันที่ตรวจพบการงอกของสปอร์ภายหลังเติมสารดีเทอร์เจนท์ ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ (detergent-incubation time)

เครื่องหมาย - แสดงไม่พบการงอกของสปอร์ ภายหลังเติมสารดีเทอร์เจนท์เข้มข้น 0.01-3.0% ตลอดระยะเวลา 10 วัน ที่บ่มเชื้อในระบบที่มีดีเทอร์เจนท์

5.2 ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)ต่อสปอร์ของ Trichoderma sp. Pol,

เพื่อศึกษาข้อมูลเบื้องต้น ของการยับยั้งการงอกของสปอร์โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์โดยใช้T.B.T.O.เป็นตัวแทนของสารประกอบดีบุกอินทรีย์และใช้ Trichoderma sp.Pol, เป็นตัวแทนราที่ใช้ในการทดลอง เนื่องจากเป็นราที่มีความสามารถ ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์อื่นที่แยกจากไม้ยางพาราดังแสดงในผลการทดลองตารางที่ 7 และ 8 นอกจากนี้ Trichoderma sp. ยังเป็นราที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของการทำลายเนื้อไม้ (19,20) ใช้ Tween 80 เป็นตัวแทนสารดีเทอร์เจนท์ในการศึกษาการ reverse effect ของ T.B.T.O. ต่อสปอร์พบว่าผลการทดลองขั้นต่างแสดงดังต่อไปนี้

5.2.1 การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราว (Static effect)

ทำการทดสอบยับยั้งการงอกของสปอร์ Trichoderma sp.Pol, โดยT.B.T.O. พบว่า T.B.T.O. เข้มข้น 2 ppm. ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราวดังแสดงในผลการทดลองตารางที่ 14

จากผลการทดลองพบว่าสปอร์ถูกยับยั้งการงอก ในระบบการยับยั้งขณะที่พบการเจริญได้ เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่อาจเกิดจากโมเลกุลของอาหารในระบบการยับยั้งถูกจับด้วย T.B.T.O. ทำให้สปอร์ไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้และปริมาณ T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งไม่เพียงพอต่อการทำให้เกิดผลฆ่าสปอร์

5.2.2 การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า (Sub lethal effect)

พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ให้มีความเข้มข้น 5 ppm.และใช้ระยะเวลาบ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งนาน 24ชม. สามารถพบผลการยับยั้งแบบกึ่งฆ่า ดังแสดงในตารางที่ 15

จากผลการทดลองพบว่าสปอร์ถูกยับยั้งการงอกทั้งในระบบการยับยั้งและพบผลการยับยั้งภายหลังล้างสปอร์และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่แสดงให้เห็นว่า การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า T.B.T.O. จะต้องมีผลโดยตรง กับสปอร์ด้วยโดยอาจเกิดจากการที่ T.B.T.O. จับกับ binding site บนผิวสปอร์ ทำให้มีผลต่อระบบการนำสาร

อาหารเข้าสู่สปอร์ หรือ T.B.T.O. เข้าไปภายในสปอร์และมีผลต่อเมตาโบลิสมของสปอร์หรืออาจเกิดโดยทั้งสองกลไก

5.2.3 ผลของ Tween 80 ต่อสปอร์ของ Trichoderma sp.Pol, ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าโดย บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)

เพื่อทดสอบสมมุติฐานการยับยั้งการงอกของสปอร์ เกิดจากการที่ T.B.T.O.จับกับสารอาหารในระบบการยับยั้งและ T.B.T.O. จับกับ binding site บนผิวสปอร์โดยถ้า T.B.T.O. มีการสร้างพันธะกับสารอาหารหรือผิวสปอร์จริงสารดีเทอร์เจนท์อาจทำให้ T.B.T.O. ที่ขัดขวางการนำสารอาหารเข้าสู่สปอร์หลุดออกได้ เมื่อสารอาหารเข้าสู่สปอร์ได้สปอร์ก็จะ germinate

จากผลการทดลองที่ 5.1 พบว่า Tween 80 เข้มข้น 0.01% สามารถทำให้สปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า ในระบบที่ตัวกลางเป็นอาหารเหลวงอกได้ (reverse spore germination) ภายหลังจากบ่มสปอร์ในระบบที่เติม Tween 80 แล้ว 2 วัน ขณะที่ไม่พบการ reverse spore germination) ของสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าในระบบที่ตัวกลางเป็นน้ำ อาจเนื่องจากการยับยั้งการงอกของสปอร์ในระบบที่มีตัวกลางเป็นอาหารเหลว T.B.T.O. ไม่ได้จับกับ binding site บนผิวสปอร์โดยตรง แต่จับกับชั้นของโมเลกุลอาหาร ที่จับรอบผิวสปอร์ และการ reverse germination เกิดจาก Tween 80 ไปถึงชั้นของอาหารเหลวและ T.B.T.O. ออกจากผิวสปอร์ ขณะที่การยับยั้งการงอกของสปอร์ในระบบที่ตัวกลางเป็นน้ำกลั่น T.B.T.O. สามารถจับโดยตรงกับ binding site บนผิวสปอร์ด้วยพันธะที่แข็งแรง Tween 80 ไม่สามารถถึง T.B.T.O. ออกจากผิวสปอร์ได้แสดงให้เห็นว่ามีการจับระหว่าง T.B.T.O. กับโมเลกุลอาหารเลี้ยงเชื้อและสปอร์จริง หรืออาจเป็นไปได้ว่าการยับยั้งการงอกของสปอร์ในน้ำกลั่นมี T.B.T.O. เข้าไปสะสมในสปอร์ด้วย

5.2.4 ผลของTween 80 ต่อความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าโดย บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)

เพื่อศึกษาถึงรายละเอียดของการที่ Tween 80 มีผลต่อการทำให้สปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าโดยในระบบการยับยั้งที่เป็นอาหารเหลวสามารถงอกและเจริญได้ขณะที่ระบบที่ตัวกลางเป็นน้ำไม่พบการ reverse germination โดยทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 พบผลการทดลองแสดงดังนี้

5.2.4.1 ผลของ Tween 80 ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ในระบบการยับยั้งที่ตัวกลางเป็นอาหารเหลว

จากการทดลองที่ 4.2.1.1 พบว่า เมื่อบ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่ประกอบด้วย T.B.T.O. 5 ppm. และ Tween 80 เข้มข้น 1เปอร์เซ็นต์ สปอร์สามารถงอกและเจริญได้ขณะที่สปอร์ที่บ่มในระบบควบคุมไม่ผสม Tween 80 ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Tween 80 ทำให้การยับยั้งการงอกของสปอร์ โดย T.B.T.O.ไม่เกิดขึ้น ซึ่งอาจเกิดเนื่องจาก Tween 80 ช่วยให้ T.B.T.O. ละลายได้ดีขึ้น (66) ทำให้การจับระหว่าง T.B.T.O. กับผิวสปอร์และโมเลกุลของสารอาหารเกิดได้น้อย หรือ Tween 80 อาจไปดึงส่วน binding site ของ T.B.T.O. บนผิวสปอร์ออกหรือทำให้ binding site เปลี่ยนแปลงไปยังผลให้ T.B.T.O.ไม่สามารถจับผิวสปอร์ได้

5.2.4.2 ผลของ Tween 80 ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ในระบบที่ตัวกลางเป็นน้ำกลั่น

เนื่องจากผลการทดลองที่ 5.1.2 พบว่า Tween 80 ไม่สามารถดึง T.B.T.O. ออกจากผิวสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าในระบบการยับยั้งที่ตัวกลางเป็นน้ำกลั่นได้จึงทำการทดลองศึกษาผลของ Tween80 ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ในระบบที่ตัวกลางเป็นน้ำกลั่น โดย

5.2.4.2.1 เมื่อบ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่ประกอบด้วย T.B.T.O. เข้มข้น 5 ppm. และ 1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1.2.1 พบว่าสปอร์สามารถงอก และเจริญได้ขณะที่สปอร์ที่บ่มในระบบควบคุมไม่ผสม Tween 80 สปอร์ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า Tween 80 ทำให้การยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าไม่เกิดขึ้นเช่นเดียวกับผลการทดลองที่ 5.2.4.1

5.2.4.2.2 จากการทดลองที่ 4.2.1.2.2 เมื่อนำสปอร์บ่มในสารละลายผสม T.B.T.O. เข้มข้น 5 หรือ 10 ppm กับ Tween 80 เข้มข้น 0.01 หรือ 1.0% ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ก่อนเติมสปอร์แขวนลอย พบว่าสปอร์ที่ผ่าน

การบ่มในสารละลายข้างต้นสามารถงอกและเจริญได้ขณะที่สปอร์ที่ผ่านการบ่มในระบบควบคุมที่ไม่ผสม Tween 80 สปอร์ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า

จากผลการทดลองสามารถพิสูจนให้เห็นว่า Tween 80 มีผลช่วยลดผล (effect) ของ T.B.T.O. ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์จริง

5.2.5 ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)และการลดผลการยับยั้งโดย Tween 80 อย่างต่อเนื่อง

จากสมมติฐานการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า เกิดจากการที่ T.B.T.O. จับบน binding site บริเวณผิวสปอร์และ Tween 80 สามารถ reverse ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ กรณีที่ตัวกลางของระบบการยับยั้งเป็นอาหารเหลว ดังนั้น ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ในอาหารเหลวทุกๆ ครั้ง Tween 80 จะต้องสามารถ reverse ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ จึงทำการทดลองเพื่อพิสูจน์สมมติฐานตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2

พบว่าเมื่อนำสปอร์ ที่ผ่านการยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่า ครั้งที่ 1 และผ่านการ reverse spore germination โดย Tween 80 ครั้งที่ 1 ไปบ่มต่อในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ ครั้งที่ 2 แล้วเติม Tween 80 ลงในระบบการยับยั้งเมื่อพบว่าสปอร์ถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าแล้วพบว่าการเติม Tween 80 ในระบบการยับยั้งครั้งที่2ไม่สามารถ reverse spore germination ได้นั้นคือพบผลการฆ่าสปอร์ (cidal effect)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในการฆ่าสปอร์จะต้องเกิดจากการที่มี T.B.T.O. เข้าไปภายในสปอร์ด้วย

5.2.6 การตรวจสอบคุณสมบัติของ Trichoderma sp.Pol. ที่เกิดจากการทำให้งอกใหม่ โดย Tween 80 ภายหลังการถูกยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่าโดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ T.B.T.O. (revertant) เปรียบเทียบกับคุณสมบัติของ Trichoderma sp. Pol. ปรกติ (Control)

จากผลการทดลองที่ 5.2.5 พบแนวโน้มในการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบฆ่า (cidal effect) เกิดจากการมี T.B.T.O.ภายในสปอร์ ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่ามีการนำ T.B.T.O.เข้าสปอร์จริง จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทาง morphology และ physiology ของเชื้อที่เกิดจากสปอร์ที่เคยถูกยับยั้งการงอกแบบกึ่งฆ่าแล้วทำให้งอกใหม่

โดย Tween 80 (revertant) เชื้อปรกติ (control) และ เชื้อที่เกิดจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มในสารละลาย Tween 80 (tween) ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.5 โดยพบผลการทดลองดังนี้

5.2.6.1 ตรวจสอบลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง(PDA)

จากการตรวจสอบลักษณะของ เชื้อปรกติ เชื้อที่ผ่านการบ่มใน Tween และ revertant ตามวิธีการทดลองที่ 4.2.5.2 พบว่าเชื้อทั้งสามประเภทสามารถเจริญ และสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAได้ดังแสดงในรูปที่ 26 และเมื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างสี (pigment) ลงในอาหารแข็ง PDA พบว่าเชื้อปรกติและเชื้อที่ผ่านการบ่มใน Tween 80 สามารถสร้าง pigment สีส้มแดงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ revertant ไม่สามารถสร้าง pigment ดังแสดงในรูปที่ 27 และ พบว่าการขาดคุณสมบัติการสร้าง pigment สามารถพบได้ใน revertant รุ่นต่อไปด้วย(พบว่าเป็นลักษณะที่สามารถถ่ายทอดได้)

5.2.6.2 การตรวจสอบขนาดของสปอร์

จากการวัดขนาดสปอร์ของเชื้อ ทั้ง 3 ประเภท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.5.3 พบว่าขนาดเฉลี่ยของสปอร์ทั้ง 3 ประเภทใกล้เคียงกันคือ Control ขนาดเท่ากับ Tween คือ 3.7 ไมโครเมตร และสปอร์ของ revertant เท่ากับ 3.3 ไมโครเมตร

จากการศึกษาลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบพบลักษณะของสปอร์ไม่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 28-30

5.2.6.3 การงอกของสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB

จากการติดตามเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.5.4 พบว่าอัตราการงอกของสปอร์จากเชื้อที่ผ่านการบ่มในสารละลาย Tween 80 สูงกว่าอัตราการงอกของสปอร์ปรกติ และ revertant ซึ่งมีอัตราใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 31

5.2.6.4 การสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB

จากการติดตามการสร้างสปอร์ของเชื้อ ทั้ง 3 ประเภท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ตามวิธีการทดลองที่ 4.2.5.5 พบอัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อทั้ง 3 ประเภท ใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 32

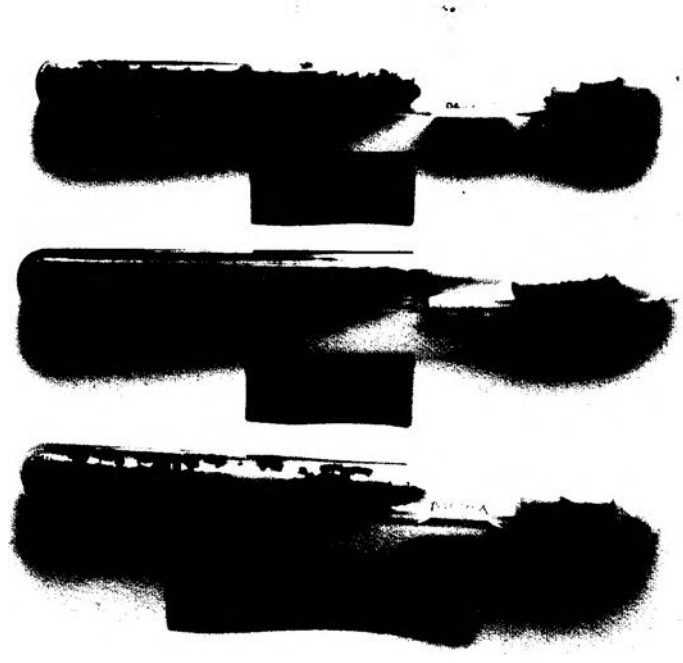
5.2.6.5 การตรวจวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ

จากการติดตามการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ประเภท โดยติดตามน้ำหนักแห้งของเซลล์ และติดตามปริมาณกลูโคซามีน ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.5.6 พบผลการติดตามการเจริญโดยการวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ระยะต่างๆของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อปรกติสูงกว่าเชื้อที่ผ่านการบ่มใน Tween 80 และพบว่าสูงกว่า revertant ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 33 และจากการติดตามการเจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีนที่ระยะต่าง ๆ ของการเลี้ยงเชื้อพบว่า เชื้อปรกติมีการเจริญสูงกว่า revertant ดังแสดงในรูปที่ 34

5.2.6.6 การสร้างแอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อปรกติเทียบกับ revertant

จากการติดตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ของเชื้อปรกติ และ revertant ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.5.7 โดยติดตามการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตากลูโคซิเดส พบว่าเชื้อปรกติมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์สูงกว่า revertant ดังแสดงในรูปที่ 4 , 35 และ 36

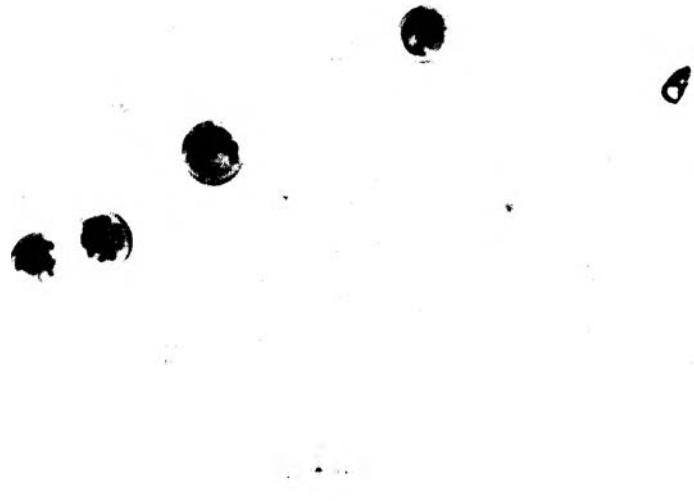
จากการตรวจสอบลักษณะต่างๆของเชื้อสามารถพิสูจน์ได้ว่า T.B.T.O. เข้าภายในสปอร์จริงโดยพบว่าทำให้ลักษณะบางอย่างของ Trichoderma sp.Pol, รุ่นต่อมาเปลี่ยนแปลงไป



รูปที่ 26 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อปรกติ (control) เชื้อที่ผ่านการบ่มใน Tween 80 (+ tween) และ revertant บนอาหารแข็ง PDA

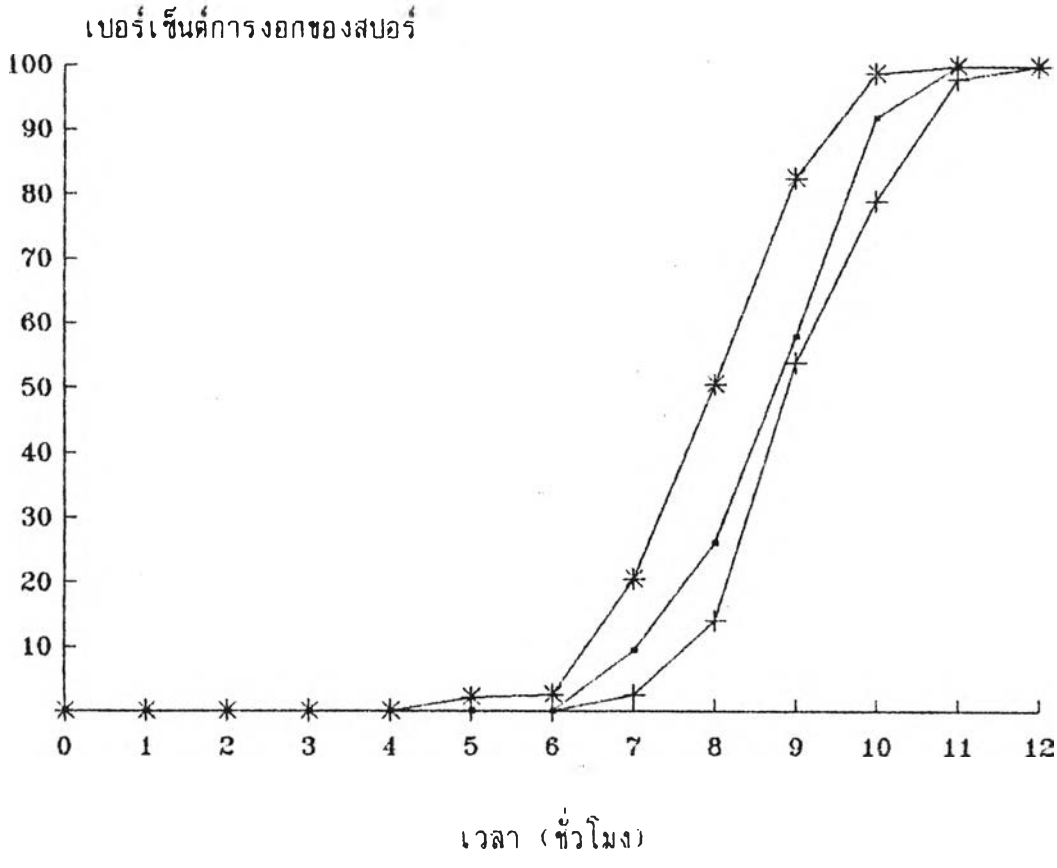
รูปที่ 27 ลักษณะการสร้างสีลงในอาหารแข็ง PDA ของเชื้อปรกติเชื้อที่ผ่านการบ่มใน Tween 80 (+tween) และ revertant

รูปที่ 28 ลักษณะสปอร์ของ Trichoderma sp. Pol$_1$ ปรกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000เท่า



รูปที่ 29 ลักษณะสปอร์ของ Trichoderma sp. Pol$_1$ ที่สร้างจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มในสารละลาย Tween 80 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000เท่า

รูปที่ 30 ลักษณะสปอร์ Trichoderma sp. Pol_1 (revertant) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

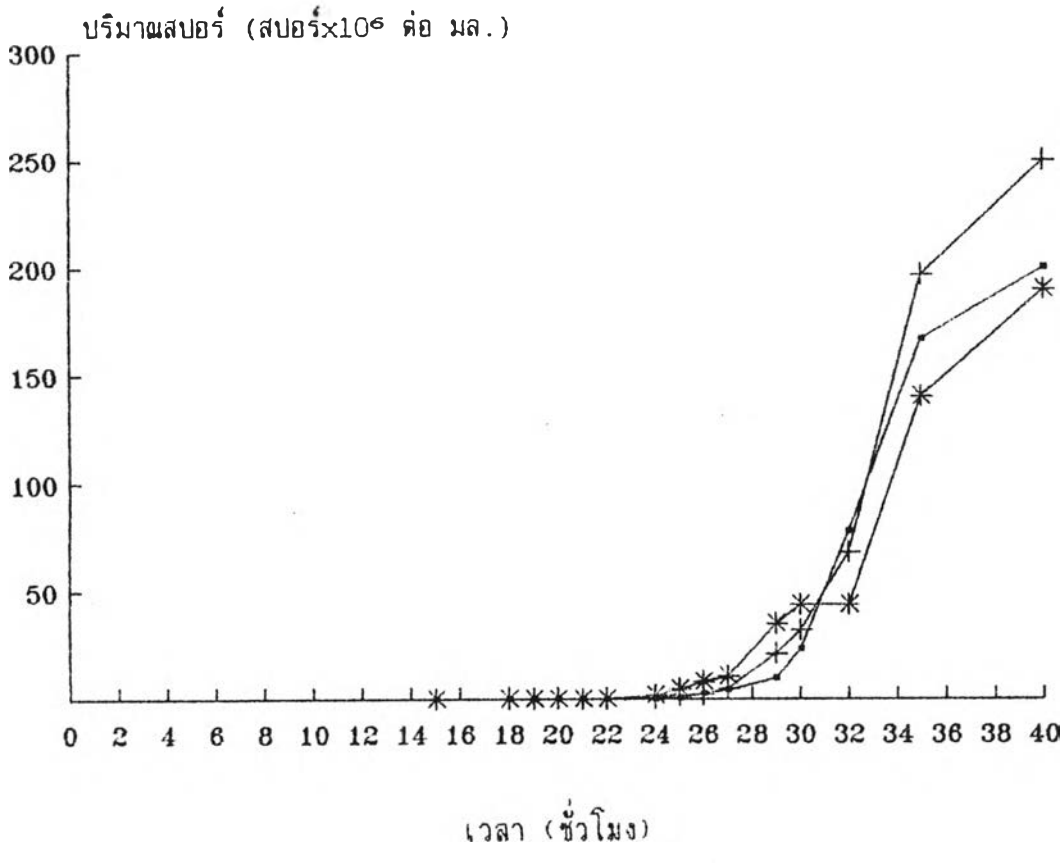


รูปที่ 31 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ Trichoderma sp. Pol, ในชุดควบคุม (control) สปอร์ของเชื้อที่เกิดจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มใน Tween 80 และสปอร์ที่สร้างจาก revertant เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB

■——■ หมายถึง การงอกของสปอร์ในชุดควบคุม

✳——✳ หมายถึง การงอกของสปอร์ของเชื้อที่เกิดจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มใน Tween 80

+——+ หมายถึง การงอกของสปอร์ที่สร้างจาก revertant

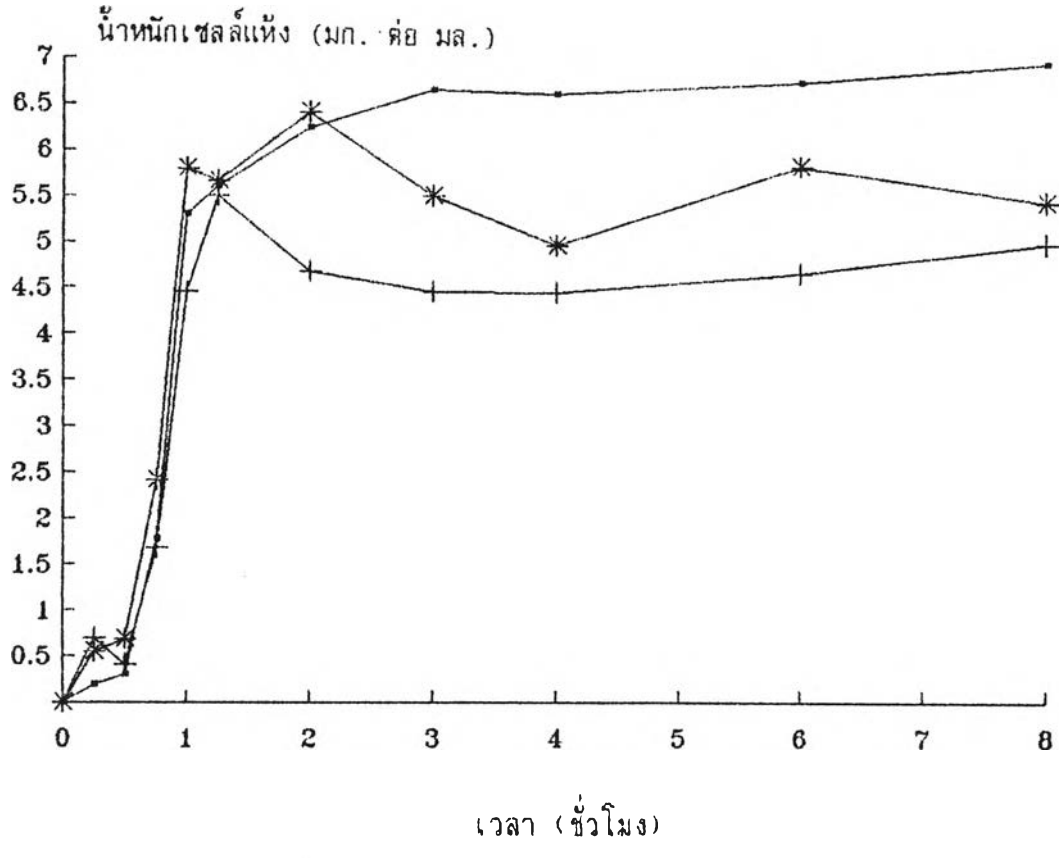


รูปที่ 32 เปรียบเทียบปริมาณการสร้างสปอร์ของ Trichoderma sp. Pol$_1$ ในชุดควบคุม (control) เชื้อที่เกิดจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มใน Tween 80 และเชื้อที่เกิดจาก revertant เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB

■——■ หมายถึง การสร้างสปอร์ในชุดควบคุม

✱——✱ หมายถึง การสร้างสปอร์ของเชื้อที่เกิดจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มใน Tween 80

+——+ หมายถึง การสร้างสปอร์ของเชื้อที่เกิดจาก revertant

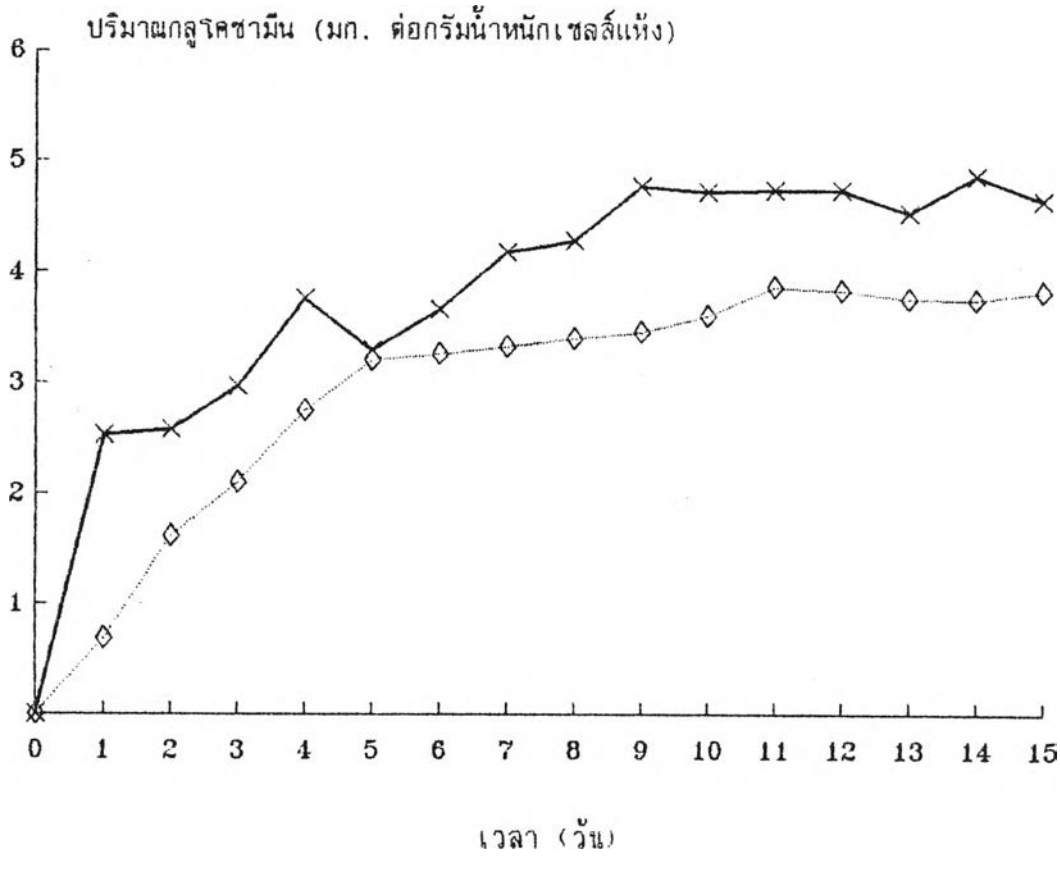


รูปที่ 33 เปรียบเทียบการเจริญโดยการติดตามน้ำหนักเซลล์แห้งของ Trichoderma sp. Pol_1 ในชุดควบคุม (control) เชื้อที่เกิดจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มใน Tween 80 และเชื้อที่เกิดจาก revertant เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB

■——■ หมายถึง การเจริญของเชื้อในชุดควบคุม

✳——✳ หมายถึง การเจริญของเชื้อที่เกิดจากสปอร์ที่ผ่านการบ่มใน Tween 80

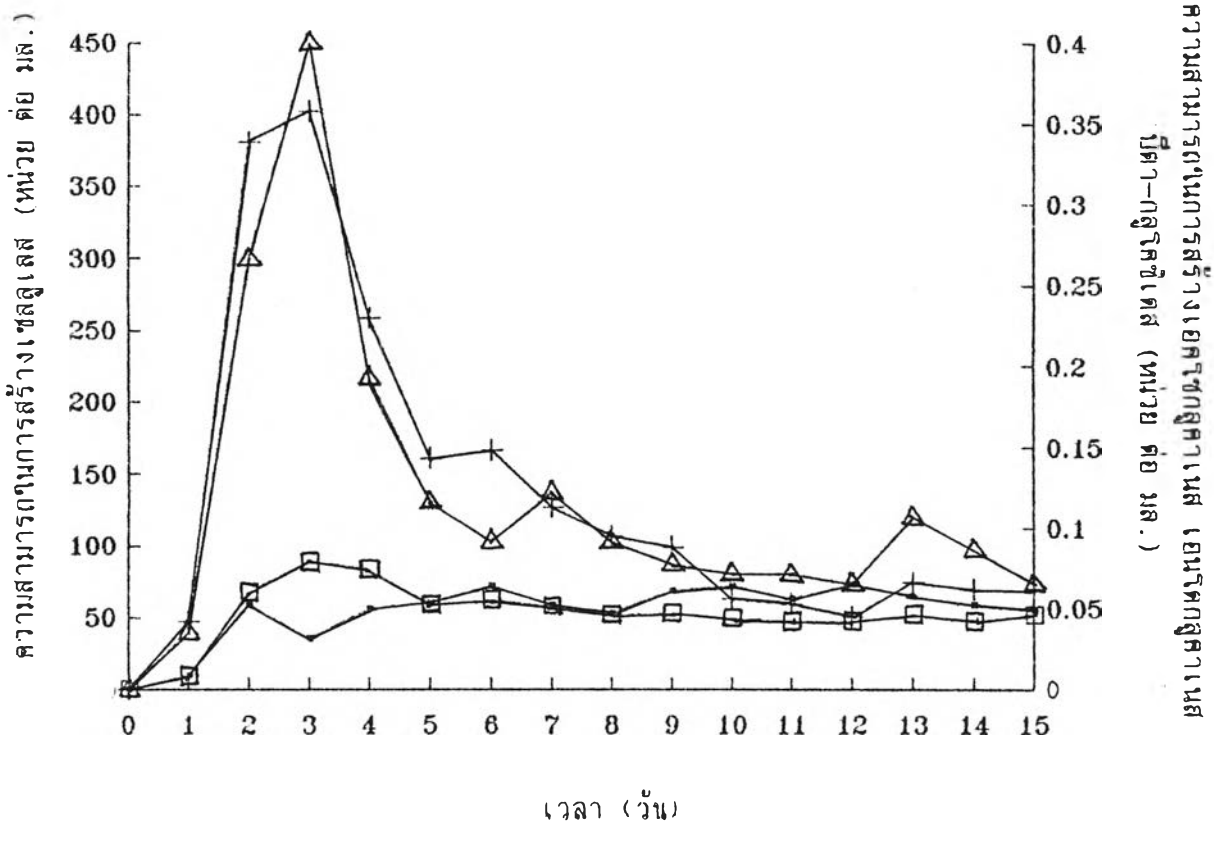
+——+ หมายถึง การเจริญของเชื้อที่เกิดจาก revertant



รูปที่ 34 เปรียบเทียบการเจริญโดยติดตามปริมาณกลูโคซามีนของ Trichoderma sp.Pol$_1$ ในชุดควบคุม และเชื้อที่เกิดจาก revertant เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ตามสูตรอาหารของ Mandels และ Sternberg

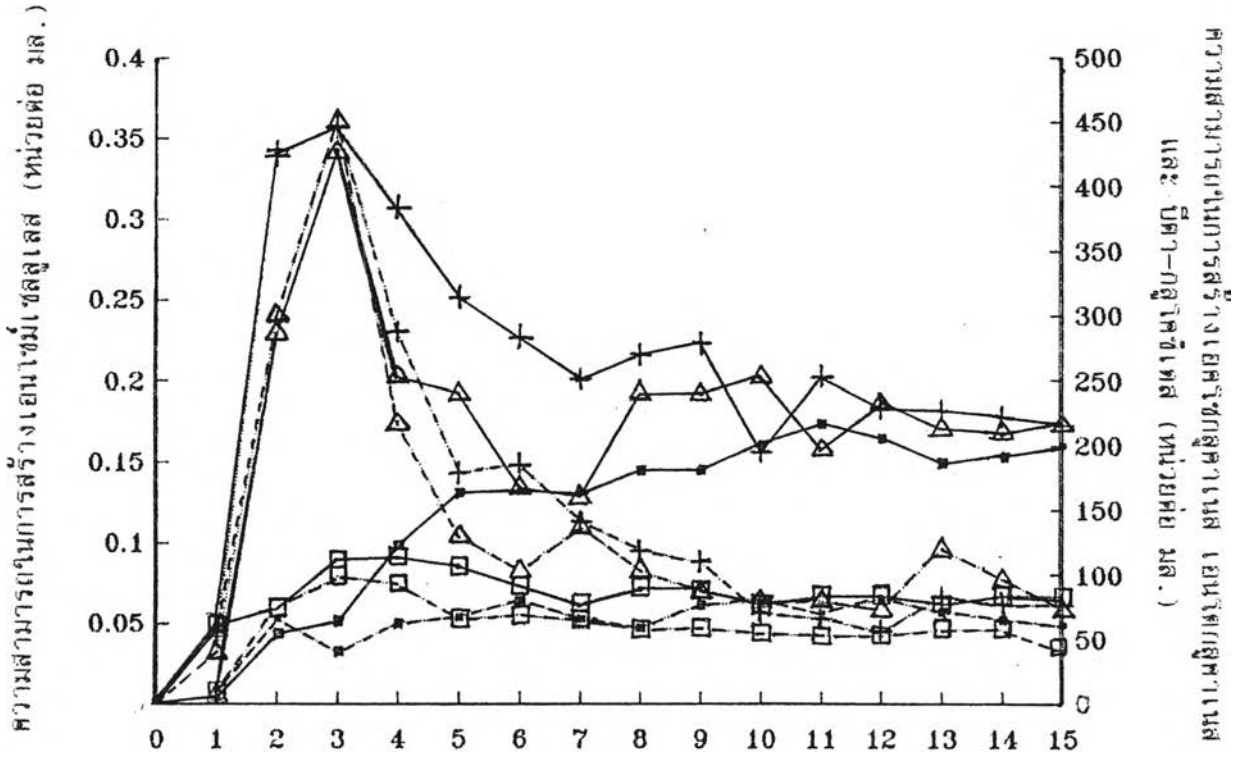
✕——✕ หมายถึง การเจริญของเชื้อในชุดควบคุม

◇——◇ หมายถึง การเจริญของเชื้อที่เกิดจาก revertant



รูปที่ 35 การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส (C_1) เอนโดกลูคาเนส (Cx) และ บีตา-กลูโคซิเดส โดย Trichoderma sp. Pol_1 revertant เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวตามสูตรอาหารของ Mandels และ Sternberg โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

หมายถึง เซลลูเลส
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส



รูปที่ 36 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวม เอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส ของ Trichoderma sp. Pol$_1$ ปรกติกับ revertant ภายใต้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 35

หมายถึง เซลลูเลส จากเชื้อปรกติ
หมายถึง เซลลูเลส จาก revertant
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส จากเชื้อปรกติ
หมายถึง เอคโซกลูคาเนส จาก revertant
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส จากเชื้อปรกติ
หมายถึง เอนโดกลูคาเนส จาก revertant
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส จากเชื้อปรกติ
หมายถึง บีตา-กลูโคซิเดส จาก revertant

5.2.7 ผลของระยะเวลาที่ปมสปอร์ในสารประกอบคีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)ต่อการฆ่าสปอร์

เมื่อทดลองแปรผันเวลา ของการบ่มสปอร์ต่อการฆ่าสปอร์ของ Trichoderma sp.Pol$_1$ โดยสารประกอบคีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) ที่ 5 ppm.พบว่าหากบ่มสปอร์ร่วมกับ T.B.T.O. นาน 72 ชม. แล้วสปอร์จะถูกฆ่าโดยที่ Tween 80 ไม่สามารถ revese ได้ ดังตารางที่ 18 นอกจากนี้พบว่าเวลาที่ใช้บ่มสปอร์ร่วมกับ T.B.T.O. นั้นหากลดลงจาก 72 ชม. แล้วผลจะสู้ที่ 72 ชม.ไม่ได้ถึงแม้จะเพิ่มปริมาณของ T.B.T.O. ก็ตามดังตารางที่ 19

ตารางที่ 18 ผลของระยะเวลาที่ใช้บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่ประกอบด้วยสารประกอบคีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)เข้มข้น 5 ppm. ในการเกิด revertant (%) ภายหลังเติม 1% Tween 80 ของสปอร์ Trichoderma sp.Pol$_1$

ระยะเวลาที่บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ (ชม.)	การเกิด revertant (เปอร์เซ็นต์)
24	100
36	66.67
48	66.67
60	33.33
72	0.0
84	0.0
96	0.0
108	0.0
120	0.0
240	0.0

ตารางที่ 19 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของ บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) ในระบบการยับยั้งการงอกต่อการฆ่าสปอร์(true cidal effect)ที่ระยะเวลาบ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งนาน 48 และ 60 ชม.

ความเข้มข้นของ T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ (ppm)	ผลการฆ่าสปอร์ (cidal effect)	
	ระยะเวลาที่บ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์ (ชม.)	
	48	60
5	–	–
10	–	–
15	–	–
20	+	+
25	+	–
30	–	+
40	+	+
60	–	+
70	–	–
80	–	+
90	–	–
100	–	–
150	–	–
200	+	–

เครื่องหมาย – แสดง พบว่าสปอร์ยังมีชีวิต

\+ แสดง พบว่าสปอร์ถูกฆ่า

6. ผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) ต่อการยับยั้งการเจริญของสารใยตัวแทนราที่คัดเลือกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB

เมื่อนำT.B.T.O.ที่สังเคราะห์โดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการงอกของสปอร์ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายใยราที่คัดเลือกโดยจากผลการทดลองพบว่าการยับยั้งการเจริญของสายใยแบ่งเป็น 3ระดับ เช่นเดียวกับการยับยั้งการงอกของสปอร์คือ

การยับยั้งการเจริญแบบชั่วคราว(Static effect)

หมายถึง ผลการยับยั้งการเจริญของสายใยโดยการติดตามน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงเชื้อแล้วพบว่าค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์คงที่ แต่เมื่อนำสายใยที่ถูกยับยั้งการเจริญไปเลี้ยงในอาหารใหม่พบว่าสายใยสามารถเจริญได้

การยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่า (Sub lethal effect)

หมายถึง ผลการยับยั้งการเจริญของสายใย และพบว่าเมื่อนำสายใยที่ถูกยับยั้งการเจริญไปเลี้ยงในอาหารใหม่ สายใยไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้าเติมสารดีเทอร์เจนท์ชนิดและปริมาณที่เหมาะสมในระบบการยับยั้งเมื่อพบผลการยับยั้งข้างต้นพบว่า สายใยสามารถเจริญได้

การยับยั้งการเจริญและฆ่าสายใย (Cidal effect)

หมายถึง ผลการยับยั้งการเจริญของสายใยเช่นเดียวกับการยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่า แต่พบว่าสารดีเทอร์เจนท์ ไม่สามารถทำให้เกิดการเจริญใหม่ของสายใยที่ถูกยับยั้งการเจริญได้

6.1 ปริมาณต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อที่เวลา12 , 18 , 24 และ 30 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อแล้วให้ผลการยับยั้งการเจริญแบบชั่วคราว (Static effect)

การทดลองหาความเข้มข้นต่ำสุดของ T.B.T.O. ที่เติมในระบบการเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อแล้วให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบบชั่วคราว โดยใช้วิธีตามวิธีการทดลอง 5.1 พบว่าจะให้ผลแตกต่างกันในราแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 20 และให้ผลฆ่าสายใยเมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อ เมื่อสายใยมีอายุ 12 ชม.

และนอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการสร้างของสปอร์ดังแสดงในตารางที่ 21 และรูปที่ 37 จากการติดตามน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ พบลักษณะการยับยั้งการเจริญของตัวแทนราที่ระยะการเจริญช่วงต่าง ๆ แสดงดังรูป 38 , 39 ,40 และ 41 ขณะที่ T.B.T.O. เข้มข้น 5 ppm. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์ Trichoderma sp.Pol$_1$ แบบกึ่งฆ่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของสายใยและการสร้างสปอร์ Trichoderma sp. Pol$_1$ ได้ดังแสดงในรูปที่ 42

6.2 ปริมาณต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อเมื่อเชื้อเจริญถึง mid log phase แล้วให้ผลยับยั้งการเจริญของสายใยแบบกึ่งฆ่า(sub lethal effect)

จากผลการทดลองที่ 6.1 พบความเข้มข้นต่ำสุดของ T.B.T.O. ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของสายใยราแบบชั่วคราว จึงได้ทำการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของ T.B.T.O. ตามวิธีการทดลองข้อ 5.2 พบความเข้มข้นต่ำสุดของ T.B.T.O.ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่าของตัวแทนราสายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาทดสอบแสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 20 ปริมาณต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.) ในระบบการเจริญของสายใยราที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของสายใยอายุ 12 , 18 24 , 30 ชม. แบบชั่วคราว (Static effect)

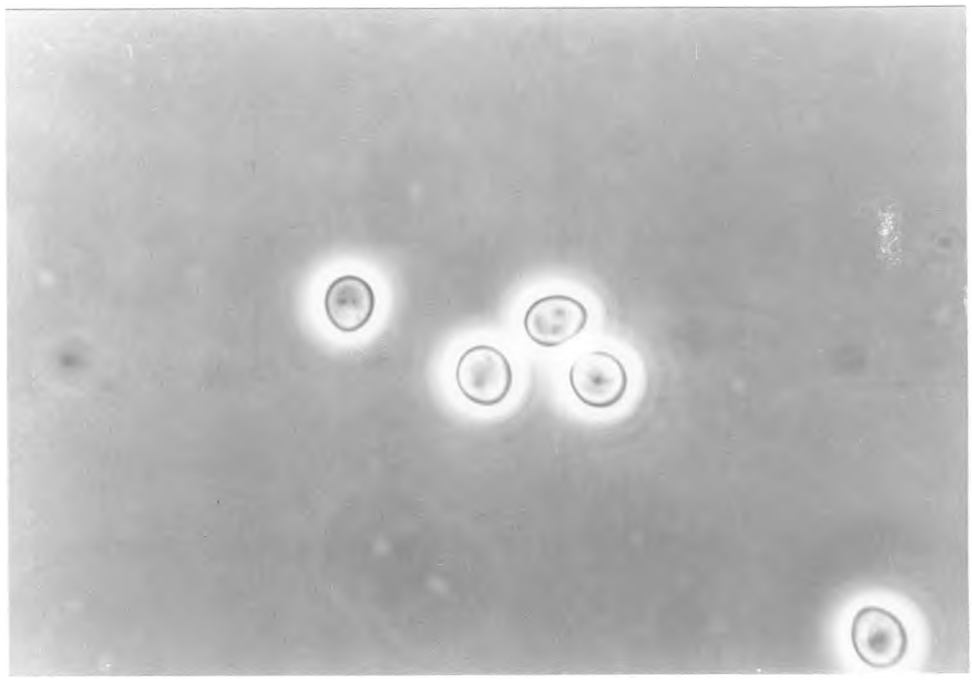
ราสายพันธุ์	ปริมาณ T.B.T.O.(ppm) ในระบบการเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลยับยั้งการเจริญแบบชั่วคราว
Syncephalustrum sp. YA$_7$	15
Aspergillus sp. CX$_2$	15
Penicillium sp. YA$_8$	15
Trichoderma sp. Pol$_1$	10

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณสปอร์ที่สร้างขณะเลี้ยงเชื้อที่เวลา 12 , 18 , 24 , 30 ชม. ก่อนเติมสารประกอบตีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)และปริมาณสปอร์ที่สร้างภายหลังเติม T.B.T.O. ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของรา เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 10 วัน

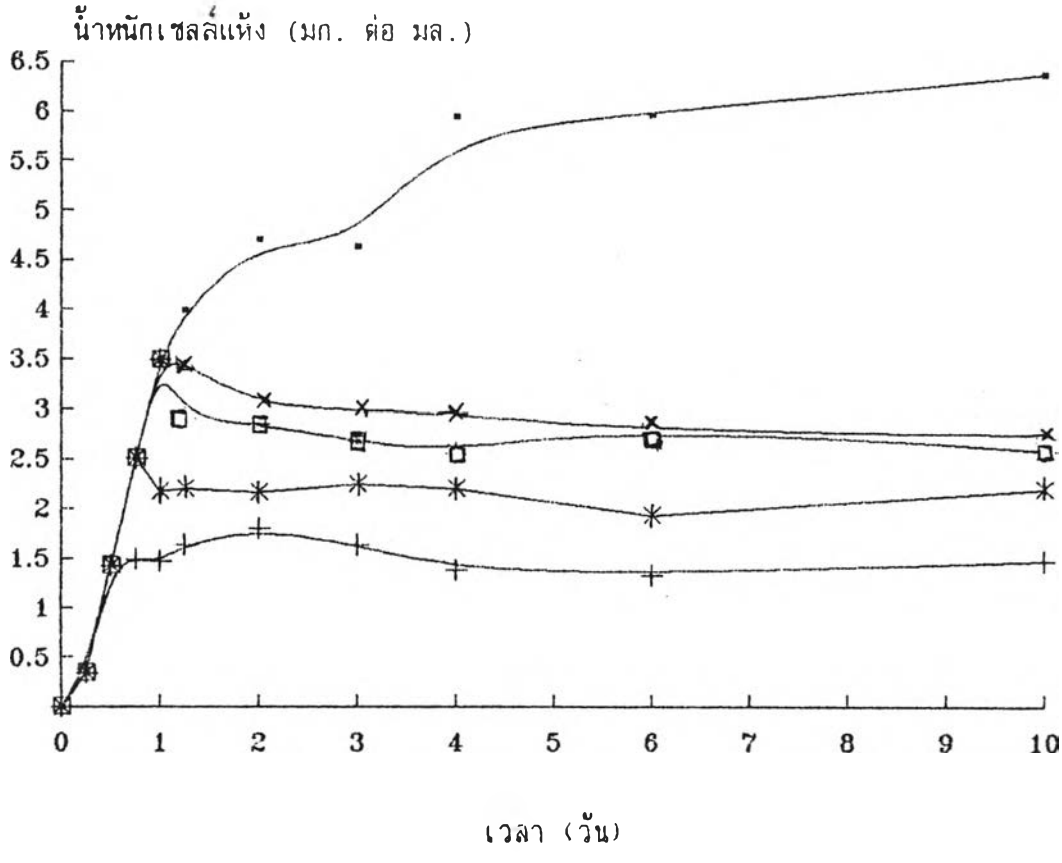
ราสายพันธุ์	ปริมาณสปอร์ (สปอร์/ม.ล.)ในการทดลองชุดต่าง ๆ								
	ชุดควบคุม เมื่อบ่มครบ 10 วัน	12 ชม.		18 ชม.		24 ชม.		30 ชม.	
		ก่อนเติม T.B.T.O.	หลังเติม T.B.T.O.	ก่อนเติม T.B.T.O.	หลังเติม T.B.T.O.	ก่อนเติม T.B.T.O.	หลังเติม T.B.T.O.	ก่อนเติม T.B.T.O.	หลังเติม T.B.T.O.
Syncephalustrum sp.YA$_7$	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Aspergillus sp.CX$_2$	3.8×10^{7}	0.0	0.0	0.0	0.0	5×10^{4}	3×10^{4}	4.2×10^{5}	3.9×10^{5}
Penicillium sp.YA$_6$	7.8×10^{6}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Trichoderma sp.Pol$_1$	2.9×10^{8}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7×10^{5}	7.0×10^{5}

หมายเหตุ Syncephalustrum sp.YA$_7$ ไม่สร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

พระบรมราชูปถัมภ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

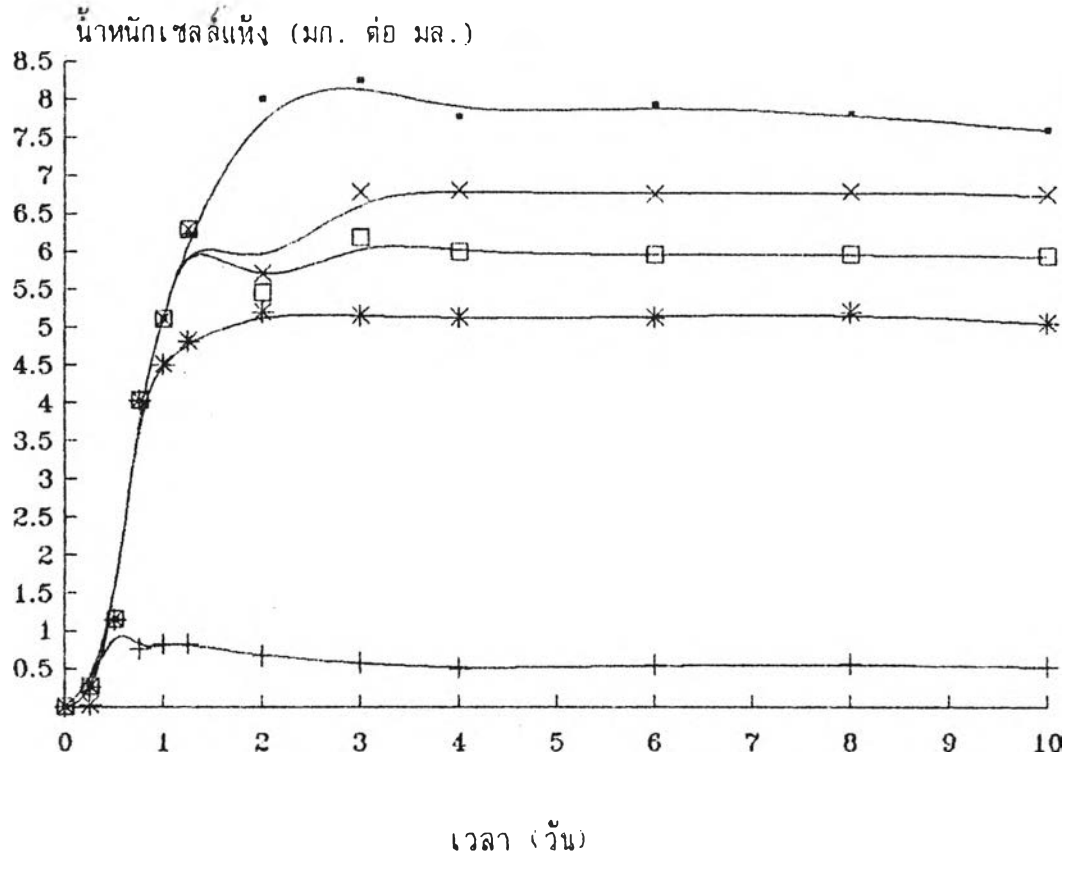


รูปที่ 37 ผลของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)เข้มข้น 10ppm.ต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ Trichoderma sp.Pol, เมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PDB ที่เวลา 12 , 18 , 24 และ 30 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อเทียบกับระบบควบคุม (C)



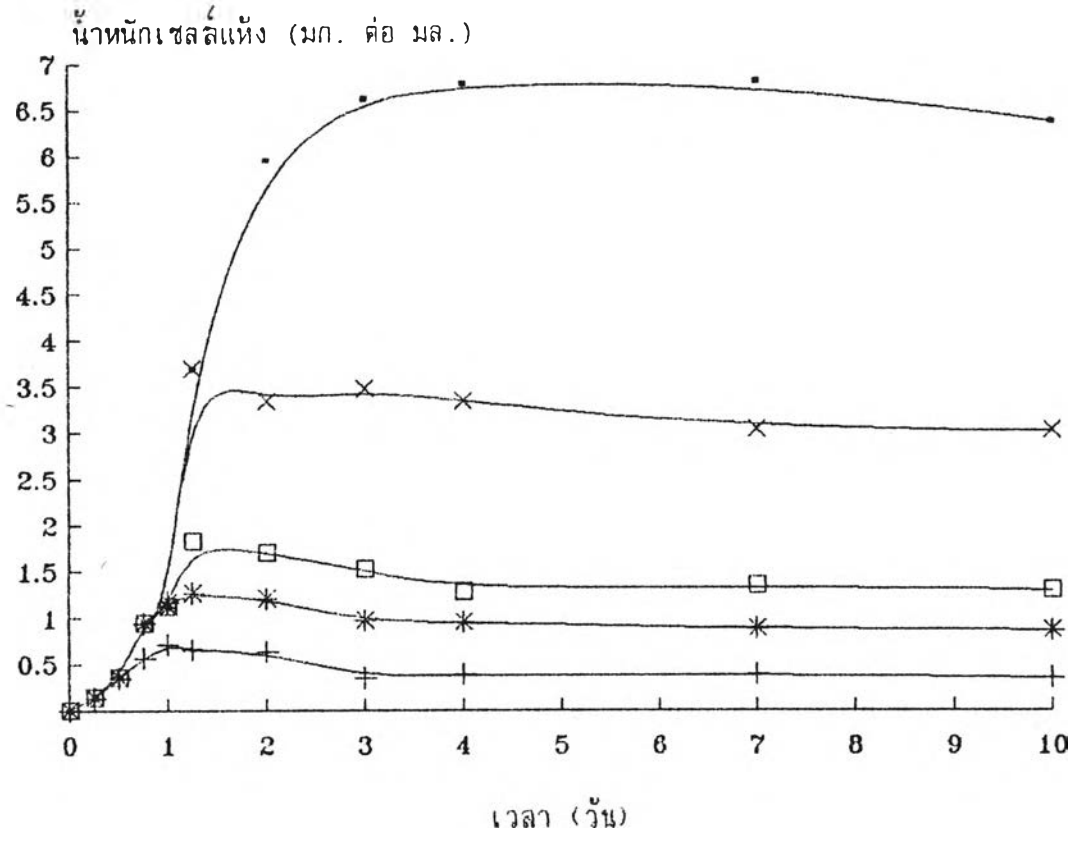
รูปที่ 38 ผลของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 15 ppm ต่อการเจริญของ Syncephalustrum sp. YA_7 เมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PDB ที่เวลา 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

- หมายถึง ระบบควบคุม
- หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 12 ชั่วโมง
- หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 18 ชั่วโมง
- หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง
- หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 30 ชั่วโมง



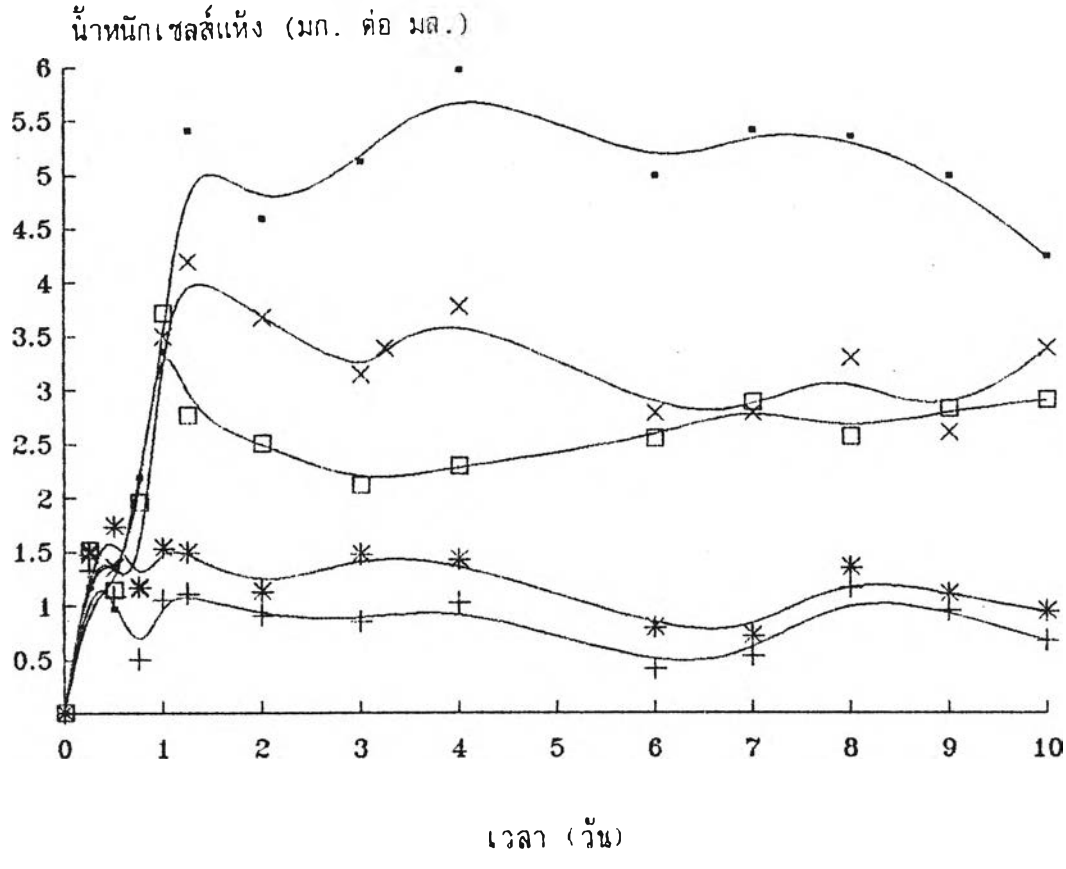
รูปที่ 39 ผลของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 15 ppm ต่อการเจริญของ Aspergillus sp. CX$_2$ เมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PDB ที่เวลา 12 , 18 , 24 และ 30 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

หมายถึง ระบบควบคุม
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 12 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 18 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 30 ชั่วโมง



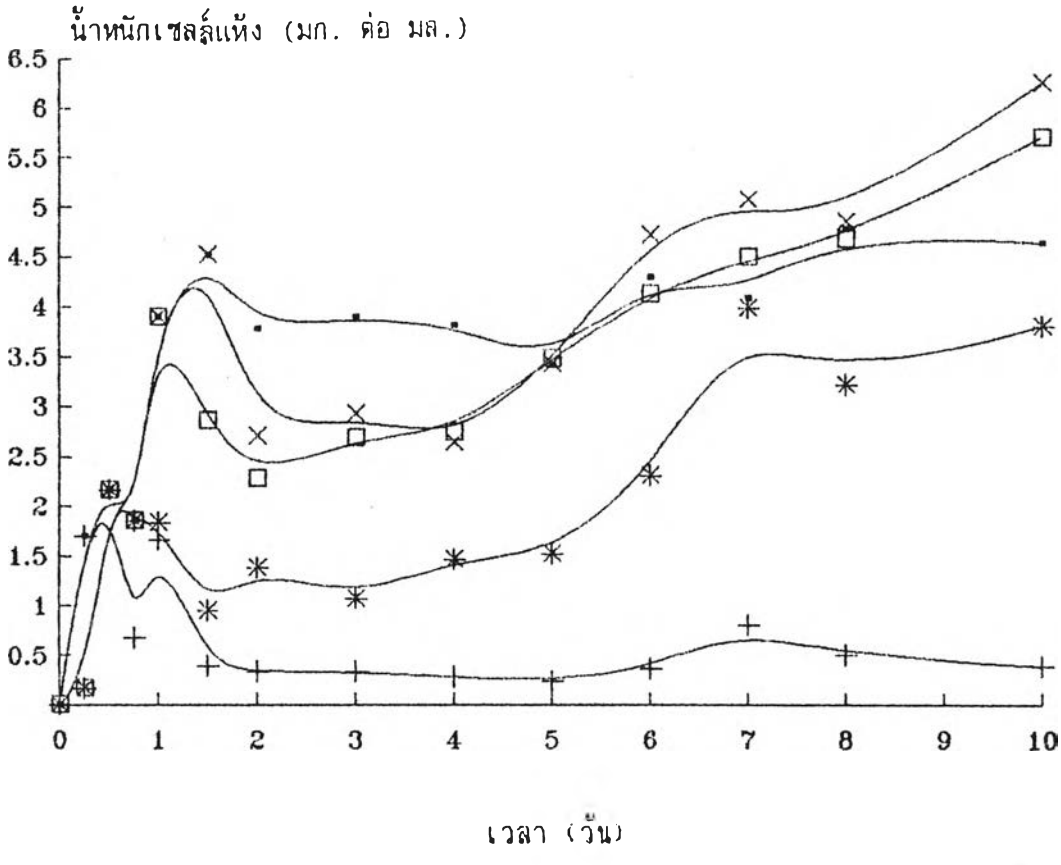
รูปที่ 40 ผลของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 15 ppm ต่อการเจริญของ Penicillium sp. YA_6 เมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PDB ที่เวลา 12 , 18 , 24 และ 30 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

หมายถึง ระบบควบคุม
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 12 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 18 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 30 ชั่วโมง



รูปที่ 41 ผลของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 10 ppm ต่อการเจริญของ Trichoderma sp. Pol, เมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PDB ที่เวลา 12 , 18 , 24 และ 30 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

หมายถึง ระบบควบคุม
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 12 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 18 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 30 ชั่วโมง



รูปที่ 42 ผลของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) เข้มข้น 5 ppm ต่อการเจริญของ Trichoderma sp. Pol, เมื่อเติมในระบบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PDB ที่เวลา 12 , 18 , 24 และ 30 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

หมายถึง ระบบควบคุม
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 12 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 18 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง
หมายถึง เติม T.B.T.O. เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 30 ชั่วโมง

ตารางที่ 22 ปริมาณต่ำสุดของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.) ในระบบการเจริญของสายใยราที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของสายใยระยะ mid logแบบกึ่งฆ่า (Sublethal effect)

ราสายพันธุ์	ปริมาณ T.B.T.O.(ppm)ในระบบการเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่า
Syncephalustrum sp.YA7	60 (1)
Aspergillus sp. CX2	50 (1)
Penicilluim sp. YA6	45 (1)
Trichoderma sp. Poli	40 (4)

ตัวเลขใน () แสดงจำนวนวันที่บ่มเชื้อในระบบการเลี้ยงเชื้อภายหลังเติม T.B.T.O. เข้มข้นดังกล่าวแล้วตรวจพบผลการยับยั้งการเจริญของสายใยแบบกึ่งฆ่า

7. การหาข้อมูลเบื้องต้นของการยับยั้งการเจริญของสายใยตัวแทนราที่คัดเลือกโดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)

7.1 ผลของสารกลุ่มดีเทอร์เจนท์ต่อสายใยราที่ถูกยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่า (Sub lethal effect) โดย บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.)

ทดลองใช้สารดีเทอร์เจนท์กลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ Nonionic detergent โดยใช้ Tween 80 Triton x-100 กลุ่ม Catianic detergent ได้แก่ Cetylpyridinium chloride กลุ่ม Anionic detergent ได้แก่ SDS เติมในระบบหารยับยั้งการเจริญของสายใยที่เจริญในระยะ mid log แบบกึ่งฆ่า โดยแปรผันให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 พบว่า Tween 80 ที่ความเข้มข้น 1%-2% สามารถทำให้สายใยของราทุกตัวที่ทดสอบ ซึ่งถูกยับยั้งการเจริญโดย T.B.T.O. กลับมาเจริญได้ในขณะที่ Triton x-100 ที่ความเข้มข้น 1% สามารถช่วยให้ Aspergillus sp.CX2 กลับมาเจริญได้เพียงตัวเดียวเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ปริมาณต่ำสุดของดีเทอร์เจนท์ที่ทำให้เกิดการเจริญของสายใยที่ถูกยับยั้งการเจริญแบบกึ่งฆ่า (sub lethal effect) โดยบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O)

ราสายพันธุ์	ปริมาณต่ำสุดของสารดีเทอร์เจนท์ที่ทำให้เกิดการเจริญของสายใย(%)			
	สารดีเทอร์เจนท์			
	TWEEN 80	TRITONX-100	CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE	SDS
Syncephalustrum sp.YA$_7$	1.0 (4)	-	-	-
Aspergillus sp. CX$_2$	1.0 (6)	1.0 (5)	-	-
Penicillium sp. YA$_6$	2.0 (10)	-	-	-
Trichoderma sp.Pol$_1$	1.0 (7)	-	-	-

ตัวเลขใน ( ) แสดงจำนวนวันภายหลังเติมสารดีเทอร์เจนท์ในระบบการยับยั้งการเจริญของสายใย ที่ตรวจพบการเจริญของสายใย (detergent-incubationtime)

เครื่องหมาย - แสดงไม่พบการเจริญของสายใย ภายหลังเติมดีเทอร์เจนท์เข้มข้น 0.1-3.0 % ตลอดระยะเวลา 10 วัน ที่บ่มเชื้อในระบบที่มีดีเทอร์เจนท์

7.2 ระยะเวลาต่ำสุดที่บ่มสายใย Trichoderma sp.Pol, กับสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)เข้มข้น 40 ppm. แล้วให้ผลการฆ่าสายใยราแบบCidal effect

จากผลการทดลองที่ 6.1 พบว่าเมื่อบ่มสายใย Trichoderma sp.pol, ที่เจริญในระยะ mid log ในระบบที่มี T.B.T.O. เข้มข้น 40 ppm. นาน 4 วัน จะพบการยับยั้งการเจริญของสายใยแบบกึ่งฆ่า และพบว่าสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ ของเชื้อด้วย ซึ่งชี้ให้เห็นว่า น่าจะมีการนำ T.B.T.O. เข้าในเซลและจากผลการทดลองที่ 5.2.7. พบว่าระยะเวลาที่บ่มสปอร์ใน T.B.T.O. มีผลต่อการฆ่าสปอร์ จึงทำการทดลองเพิ่มระยะเวลาบ่มสายใยราในระบบการยับยั้งการเจริญที่มี T.B.T.O. เข้มข้น 40 ppm.เพื่อติดตามผลการฆ่าสายใย (Cidal effect)

จากวิธีการทดลองที่ 6.2 พบว่าหากบ่มสายใย Trichoderma sp.Pol, นานเป็น 15 วัน แล้วการยับยั้งการเจริญจะเป็นแบบ Cidal effect

7.3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบดีบุกอินทรีย์บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) ที่ให้ผลฆ่าสายใยแบบ cidal effect

เมื่อทดลองตามวิธี 6.3 พบว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของ T.B.T.O. ที่เติมลงในสายใยของ Trichoderma sp. Pol, ที่เจริญในระยะ mid log จาก 40ppm.เป็น 70 ppm. แล้วการยับยั้งการเจริญของสายใย จะเปลี่ยนจากแบบ sub lethal เป็น cidal effect ได้