บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยและอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

(1) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophtometer) รุ่น SP-300 ของบริษัท Optima, Japan.

(2) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker)

(3) กระดาษกรอง (Millipore membrane) รุ่น GF/A pore size 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatmam International Ltd., England.

(4) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH meter) รุ่น BA-350 ของบริษัทEDT direct ION Ltd.

(5) เครื่องถ่ายเชื้อแบบ Laminar flow ของบริษัท Asian Chemical & Engineering, Thailand.

(6) กระดาษกรอง Whatmam NO.40 ของบริษัท Whatmam International Ltd., England.

(7) หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

(8) กล้องจุลทรรศน์

(9) สไลด์และกระจกปิดสไลด์

(10) เครื่องชั่ง รุ่น BP-211D ของบริษัท Sarterius, U.S.A.

(11) เครื่อง Hightperformance Liquite Chromatography (HPLC)

(12) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

(13) ปั๊มดูดสุญญากาศ (Vacuum Pump)

(14) ขวดแก้ว (Vial) ที่มีฝาเกลียวปิด

(15) ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์

(16) ออโตปิเปต (Autopipette) ขนาด 2-1,000 ไมโครลิตร

(17) Parafilm

(18) จานเพาะเชื้อ

(19) หลอดทดลอง

(20) ลูบและเข็มเขี่ยเชื้อ

(21) ตะเกียงแอลกอฮอล์

(22) แท่งแก้วรูปตัววี

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

(1) Potato Dextrose Agar (PDA)

(2) Malt Extract Agar (MEA)

(3) Synthetic Medium (Nishimura และคณะ, 2002)

3.3 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

(1) 3.25% โซเดียมไฮโปคลอไรด์

(2) 70%, 95% เอทานอล

(3) แอมโมเนียมไนเตรท (Ammonium nitrate, NH_4NO_3) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(4) แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride, $CaCl_2$) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(5) คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(6) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate, K_2PHO_4) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(7) เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(8) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Hydrochloric acid, HCl) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(9) เฟอริกคลอไรด์ (Feric (III) chloride, $FeCl_3$) ของบริษัท Fluka Chemical, Switzerland.

(10) แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate, $MgSO_4$) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(11) เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(12) อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient broth) ของบริษัท Himedia, India.

(13) อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A

(14) โพแทสเวียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosephate, KH2PO4) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(15) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(16) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(17) โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate anhydrous, Na_2SO_4) ของบริษัท E.Merck, Germany.

(18) น้ำกลั่น

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ

3.4.1.1 ราเอนโดไฟต์

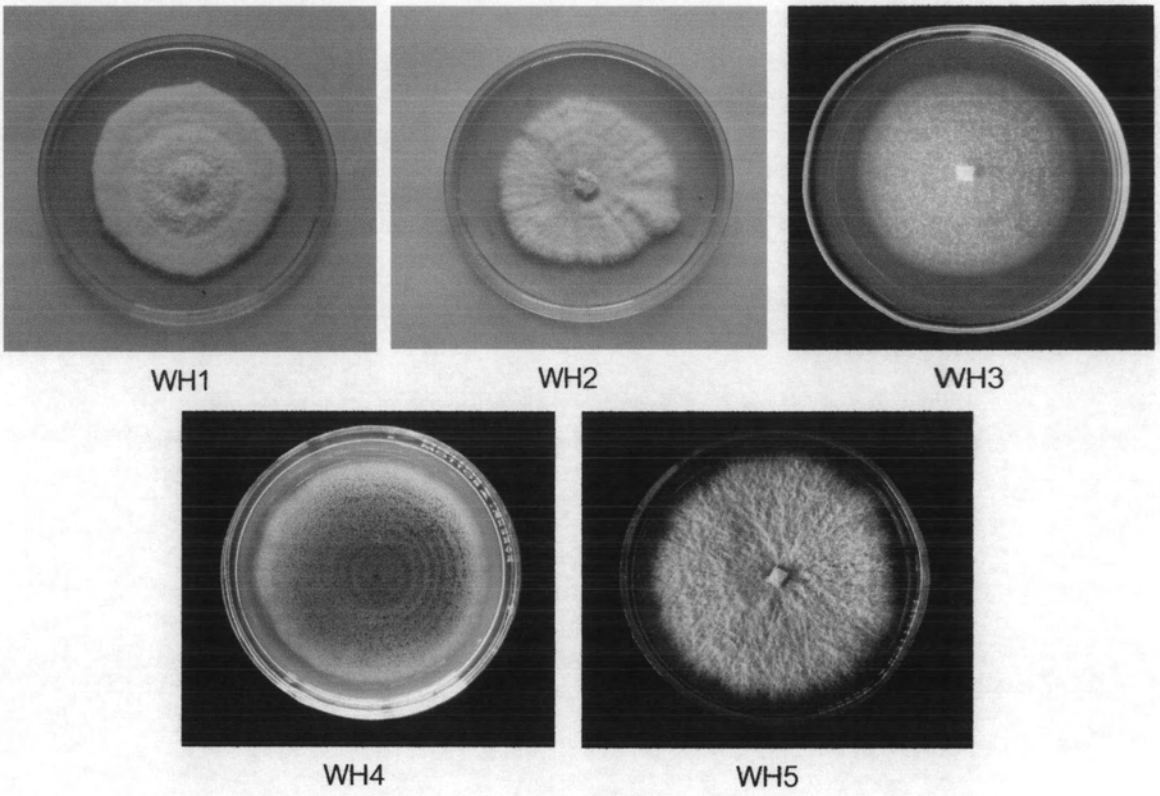
เก็บตัวอย่างใบและรากพืชจากพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารกำจัดวัชพืชแอทราซิน ได้แก่ ใบอ้อยและใบมันสำปะหลัง จากอำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา ใบข้าวและรากข้าว จากพื้นที่นาข้าว จังหวัดปทุมธานี ใบพลวงและใบรัง จากป่าธรรมชาติ ที่อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก โดยเก็บตัวอย่างใบพืชใส่ถุงพลาสติก แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการคัดแยกราเอนโดไฟต์และทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3.4.1.2 ราดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารกำจัดวัชพืชแอทราซิน อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา ใส่ถุงพลาสติก แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการคัดแยกราดินให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3.4.1.3 ราที่ขึ้นบนซากพืช

ได้รับความอนุเคราะห์ราที่ขึ้นบนซากพืชได้แก่ ราไวต์รอต จากนางสาวจุฑามาศ กิจจานุลักษ์ จำนวน 4 ไอโซเลต คือ รา WH1 WH2 WH3 WH4 และ รา WH5 จากนางสาวณัฐยา สมจิตร ลักษณะโคโลนีของราทั้ง 5 ไอโซเลตแสดงรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของราไวต์รอตที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

3.4.2 การแยกราจากตัวอย่างและทำให้บริสุทธิ์

3.4.2.1 ราเอนโดไฟต์

นำตัวอย่างพืชจากข้อ 3.3.1.1 มาทำการแยกรา โดยวิธีของ Schulz และคณะ (1993) โดยทำความสะอาดใบและรากพืชตัวอย่างด้วยน้ำสะอาดเช็ดให้แห้ง หลังจากนั้นตัดใบพืชตัวอย่างให้มีขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร ในส่วนของรากทำการตัดรากพืชตัวอย่างเป็นชิ้นโดยให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้ปากคีบหยิบชิ้นส่วนตัวอย่างของพืชที่ได้ทำการตัดไว้แล้ว แช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1นาที แล้วนำไปแช่ใน 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮโป-คลอไรด์ เป็นเวลา 30 วินาที และแช่ตัวพืชในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ อีก 30 วินาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อีก 10 วินาที ใช้ปากคีบหยิบชิ้นตัวอย่างพืชมาวางบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซับชิ้นตัวอย่างให้พอหมาดๆ ก่อนที่จะนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt Extract Agar (MEA) (ภาคผนวก1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้จะทำ

การตรวจสอบการปนเปื้อนของราที่เจริญอยู่ที่ผิวภายนอกของชิ้นตัวอย่าง โดยการนำส่วนตัวอย่างของพืชที่ผ่านการทำตามวิธีข้างต้นแล้วไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเอาตัวอย่างออกแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของราที่ปนเปื้อน ซึ่งจะบอกถึงประสิทธิภาพของวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิวของตัวอย่าง หลังจากนั้นทำการสังเกตการเจริญของราเอนโดไฟต์จากตัวอย่าง เมื่อพบว่ามีการเจริญของเส้นใยราให้ใช้มีดผ่าตัดตัดชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณปลายเส้นใย และนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEAใหม่ เมื่อได้ราเอนโดไฟต์ที่บริสุทธิ์แล้ว ศึกษาลักษณะภายนอก ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย และสีของโคโลนี ทำการเก็บรักษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)ผิวหน้าเอียง ที่อุณหภูมิห้องไว้ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.4.2.2 ราดิน

นำตัวอย่างดินจากข้อ 3.4.1.2 มาทำการคัดแยกราโดยนำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงใน ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) (ภาคผนวก ก) ตามวิธีของ Nishimura และคณะ (2002) ปริมาตร 150 มิลลิลิตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการเติมแอทราซินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทำ 3 ซ้ำ ต่อดินหนึ่งตัวอย่าง) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเชิงกล ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการดูดสารละลายดินมา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมที่เตรียมใหม่ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่เติมแอทราซินทความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปตั้งเขย่าที่สภาวะเดิม เป็นเวลาอีก 5 วัน ทั้งนี้จะทำการเลี้ยงในอาหารชนิดเดิมที่เตรียมใหม่และเขย่าที่สภาวะเดิมจำนวน 3 ครั้ง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการดูดสารละลายดินจากการเขย่าครั้งสุดท้ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า ที่ทำการปลอดเชื้อแล้ว เติมสารละลายแอทราซินที่ความเข้มข้น10 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ synthetic Medium (Nishimura และคณะ, 2002) ที่เตรียมใหม่ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หมุนวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของรา เมื่อพบว่ามีการเจริญของเส้นใยราให้ใช้มีดผ่าตัด ตัดชิ้นวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่มีการเจริญ โดยเลือกตัดบริเวณปลายเส้นใย มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เตรียมใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเปรียบเทียบดูลักษณะโคโลนี ทำเช่นนี้จนกระทั่งได้ราดินที่บริสุทธิ์ เมื่อได้ราดินที่บริสุทธิ์แล้ว สังเกตชนิดและจำนวนราที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน ให้ทำการถ่ายเชื้อโดยนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผิวหน้าเอียง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.4.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินโดยราที่แยกได้ขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test)

1) เตรียมหัวเชื้อสำหรับใช้ทดสอบ โดยทำการเพาะเลี้ยงราแต่ละ ไอโซเลตที่ได้รับมาในข้อ 3.4.1.3 และที่แยกได้ในข้อ 3.4.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำ โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

- ชุดที่ 1: อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่ใส่สาร แอทราซินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดที่ 2: อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่ใส่ชิ้นวุ้นของเส้นใยราที่ต้องการทดสอบ 5 ชิ้น และใส่แอทราซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดที่ 3 : อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่ใส่สารแอทราซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและเส้นใยราที่ตายแล้วจากการเตรียมโดยใส่ชิ้นวุ้นเส้นใยราจำนวน 5 ชิ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Potato Dextrose Broth (PDB)(ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 20 นาที เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน (Juhasz และคณะ, 2002) แล้วนำมากรองเอาเส้นใยราที่ตายแล้วมาใช้ในการทดลองชุดดังกล่าวนี้

3) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน เมื่อครบกำหนด ทำการตรวจสอบสภาพความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อจากชุดการทดลองทุกชุด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเก็บไว้ในขวดแก้วที่มีฝาปิด (vial) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำเอาเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อของการทดลองชุดที่ 2 มาทำการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 20 นาที จากนั้นกรองเส้นใยของการทดลองชุดที่ 2 และเส้นใยที่ตายแล้วในชุดการทดลองที่ 3 ไปสกัดแยกสารแอทราซิน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารแอทราซินที่เหลือด้วยวิธี spectrophotometry ซึ่งมีวิธีการดังนี้

วิธีการสกัดแอทราซินออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใย

นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นดูดสารละลาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนติฟิวส์แบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ ที่เติมสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยเครื่องไมโครเซนติฟิวส์แบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายส่วนบนที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณของสารแอทราซินที่เหลือ

การสกัดแยกส่วนของเส้นใยทำโดยนำเอาเส้นใยในชุดการทดลองที่ 2 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและส่วนของเส้นใยในชุดการทดลองที่ 3 มาสกัดด้วยเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ไมโครเซนติฟิวส์แบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายส่วนบนมาวิเคราะห์หาปริมาณแอทราซินที่ติดอยู่กับเส้นใย

การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอทราซินด้วยวิธี spectrophotometry

นำสารละลายที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดจากเส้นใยมาวิเคราะห์หาปริมาณแอทราซินที่เหลือโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 223 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของสาร แอทราซิน (ภาคผนวก ข) คัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารแอทราซินได้ดีที่สุด เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายในขั้นทุติยภูมิต่อไป

3.4.4.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test)

1) เตรียมหัวเชื้อสำหรับใช้ทดสอบ โดยการเพาะเลี้ยงราที่คัดเลือกจากขั้นปฐมภูมิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

- ชุดที่ 1: อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium และชิ้นวุ้นของเส้นใยราที่ต้องการทดสอบ 10 ชิ้น

- ชุดที่ 2: อาหารเลี้ยงเชื้อSynthetic Medium ที่ใส่สารละลายแอทราซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ชุดที่ 3 : อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่ใส่ชิ้นวุ้นของเส้นใยราที่ต้องการทดสอบ 10 ชิ้น และใส่สารแอทราซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ชุดที่4 : อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่ใส่สารแอทราซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและเส้นใยราที่ตายแล้วจากการเตรียมชิ้นวุ้นเส้นใยราที่ต้องการทดสอบ 10 ชิ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 20 นาที เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน แล้วนำมากรองเอาเส้นใยราที่ตายแล้วมาใช้ในการทดลองชุดดังกล่าวนี้

3) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน เก็บผลการทดลองโดยการดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อจากชุดการทดลองที่ 2 3 และ 4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 6 วัน มาเก็บไว้ในขวดแก้วที่มีฝาปิด (vial) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และสำหรับชุดการทดลองที่3 จะทำการกรองแยกส่วนเส้นใยรามาทำการสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแอทราซินที่ถูกดูดซับโดยเส้นใย วิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปของแอทราซินโดยใช้เทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตรวจสอบความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชุดการทดลอง และศึกษาอัตราการเจริญของราที่ใช้ทดสอบในชุดการทดลองที่ 1 และ 3 โดยชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน เช่นกัน

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอทราซินด้วยวิธี Height Performance Liquid Chromatography (HPLC)</u> (California Dept. Of Food & Agriculture, 1998)

โดยนำสารละลายที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำการสกัดแยกสารแอทราซินในอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราตามด้วยเมทานอลดังวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นำเอาสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแอทราซินด้วยเครื่อง Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 223 นาโนเมตร ใช้คอล์ลัม C18 โมบายเฟส เป็น อะซิโตรไนไตร 70 เปอร์เซ็นต์ น้ำอัลตราเพียว 25.5 เปอร์เซ็นต์ และฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของสารแอทราซิน (ภาคผนวก ข)

3.4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแอทราซินของราที่ใช้ทดสอบ

3.3.4.1 การกำหนดสภาวะต่าง ๆในการทดสอบการย่อยสลาย

3.3.4.1.1 ปริมาณแหล่งคาร์บอน

ศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่เหมาะสมการย่อยสลายแอทราซินของราที่คัดเลือกได้ ได้แก่ กลูโคส ความเข้มข้น 10 และ20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.4.1.2 ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารแอทราซิน ได้แก่ pH 4 5 และ 6 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีความเข้มข้นของกูลโคสที่ให้ผลการย่อยสลายแอทราซินดีที่สุด

3.3.4.1.3 ความเข้มข้นของสารแอทราซิน

ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นที่ 10 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีความเข้มข้นของกูลโคส และความเป็นกรด-ด่างที่ให้ผลการย่อยสลายแอทราซินดีที่สุด

3.3.4.2 การทดสอบในสภาวะต่าง ๆที่กำหนด

1) เตรียมหัวเชื้อสำหรับใช้ทดสอบ โดยการเพาะเลี้ยงราที่คัดเลือกจากขั้นปฐมภูมิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสภาวะการทดสอบเปลี่ยนแปลงไปตามที่กำหนดในหัวข้อ 3.3.4.1 จำนวน 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

- ชุดที่ 1: อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium และชิ้นวุ้นของเส้นใยราที่ต้องการทดสอบ 10 ชิ้น
- ชุดที่ 2: อาหารเลี้ยงเชื้อSynthetic Medium ที่ใส่สารละลายแอทราซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ชุดที่ 3 : อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่ใส่ชิ้นวุ้นของเส้นใยราที่ต้องการทดสอบ 10 ชิ้น และใส่สารแอทราซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ชุดที่4 : อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่ใส่สารแอทราซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและเส้นใยราที่ตายแล้วจากการเตรียมชิ้นวุ้นเส้นใยราที่ต้องการทดสอบ 10 ชิ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 20 นาที เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน แล้วนำมากรองเอาเส้นใยราที่ตายแล้วมาใช้ในการทดลองชุดดังกล่าวนี้

3) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 35 วัน เก็บผลการทดลองโดยการดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อจากชุดการทดลองที่ 2 3 และ 4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 5 วัน มาเก็บไว้ในขวดแก้วที่มีฝาปิด (vial) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และสำหรับชุดการทดลองที่ 3 จะทำการกรองแยกส่วนเส้นใยรามาทำการสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแอทราซินที่ถูกดูดซับโดยเส้นใย วิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปของแอทราซินโดยใช้เทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามวิธีดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ตรวจสอบความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชุดการทดลอง และศึกษาอัตราการเจริญของราที่ใช้ทดสอบในชุดการทดลองที่ 1 และ 3 โดยชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 35 วัน เช่นกัน

3.4.5 การวิเคราะห์สารเมทาโบไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายสารแอทราซิน

นำสารละลายที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากชุดการทดลองที่สภาวะการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุด มาวิเคราะห์การเกิดสาร เมทาบอไลท์ของสารแอทราซินโดย Synthetic media ที่ใช้ในการศึกษาสารเมทาบอไลท์คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่ไม่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่ใส่แอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 0 และ35 และอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 0 และ 35 เช่นเดียวกัน ทำได้โดย ดูดสารละลาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนติฟิวส์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วดูดสารละลายส่วนบน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ ที่เติมเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ไมโครเซนติฟิวส์ ที่

ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสอีกครั้ง นำสารละลายข้างบนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย เทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ สารกลุ่มอะโรมาติก มีความสามารถในการดูดกลืนได้ดี แล้วทำการเก็บ fraction ของสารที่ปรากฏพีคขึ้นที่ Retention Time ต่างๆ ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวต์ หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมาได้ไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยการนำไปแช่ให้แข็ง ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายในหลอด ไมโครเซนติฟิวต์ มีการแข็งตัวแล้วนำมาทำการลดปริมาตรตัวทำละลายด้วยวิธี Freeze Dry เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์สารเมทาบอไลท์ต่อด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS)