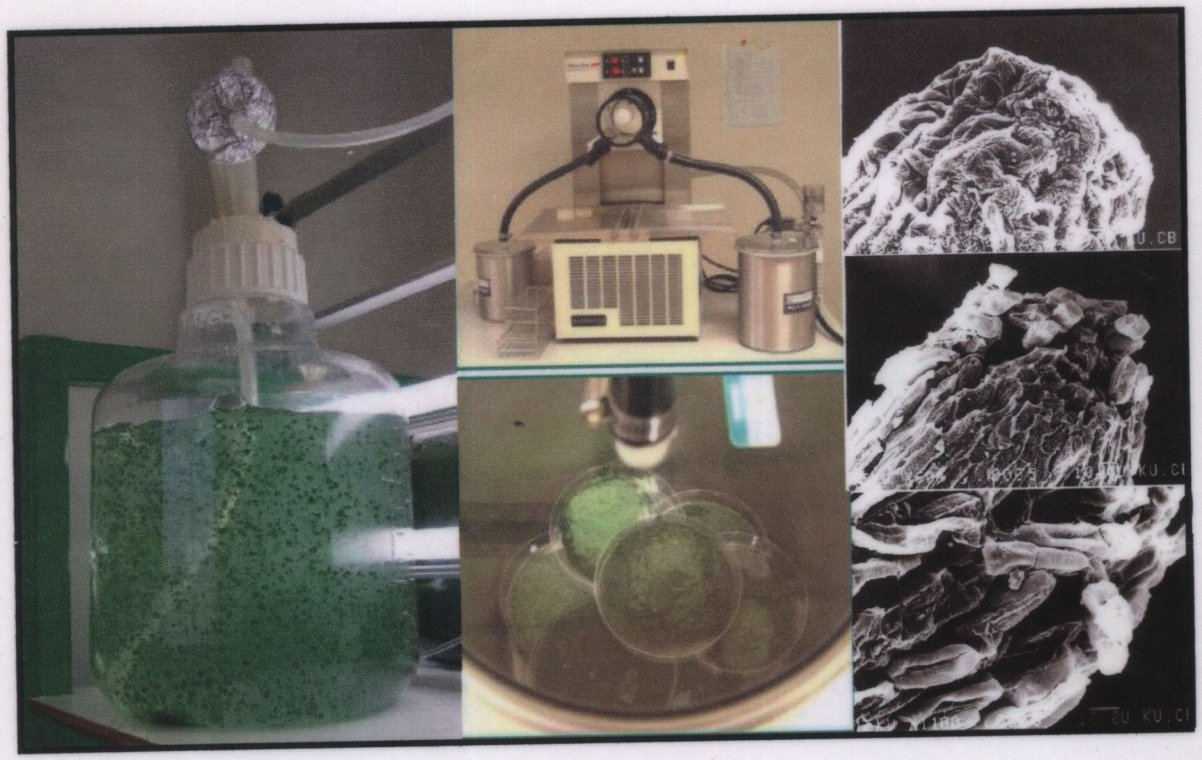
วว.

รายงานฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารควบคุมวัชพืช



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

รายงานฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารควบคุมวัชพืช

จัดทำโดย

อาร์ม อันอาตม์งาม

สุพรรษา ขันธโสภา

วัชรี กัลยาลัง

อาภารัตน์ มหาขันธ์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญรูป	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
3. วิธีการศึกษา	5
4. ผลการศึกษา	16
5. สรุปผลการทดลอง	41
6. ข้อเสนอแนะ	42
7. เอกสารอ้างอิง	43

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สาหร่าย 30 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ 6

ตารางที่ 2 สายพันธุ์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 17

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายต่อความยาวยอดของต้นกล้าข้าวภายหลังให้สารสกัดหยาบ 5 วัน 20

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายต่อความยาวรากของต้นกล้าข้าวภายหลังให้สารสกัดหยาบ 5 วัน 20

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของสาหร่ายในสารสกัดหยาบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าว 50% (EC_{50}) ภายหลังให้สารสกัดหยาบ 5 วัน 24

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่อายุแตกต่างกันต่อความยาวรากของต้นกล้าข้าวภายหลังให้สารสกัดหยาบ 5 วัน 28

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์กำจัดวัชพืชผลิตโดย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 37

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์สาหร่ายโดยใช้ถังเพาะเลี้ยง (carboy) ขนาด 10 ลิตร 8

รูปที่ 2 การทำให้เซลล์สาหร่ายแห้งโดยเครื่องทำให้เซลล์แห้งโดยการระเหิด (freeze-dryer, Kinetics รุ่น Flexi-Dry) (ก) และเซลล์สาหร่ายระหว่างการทำแห้งโดยการระเหิด (ข) 8

รูปที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวโดยใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย 11

รูปที่ 4 ลักษณะสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Anabaena* sp. TISTR 8077 (ก), *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (ข) และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (ค) ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว 19

รูปที่ 5 ความยาวยอด (ก) และราก (ข) ของต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Anabaena* sp. TISTR 8077 (□), *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (▲) และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (■) เป็นเวลา 5 วัน 23

รูปที่ 6 ต้นกล้าข้าวหลังได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Anabaena* sp. TISTR 8077 (ก), *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (ข) และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (ค) เป็นเวลา 5 วัน 25

รูปที่ 7 ช่วงเวลาการเจริญเติบโต (■) และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าว (▲) ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 27

รูปที่ 8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 เทียบกับชุดควบคุมโดยใช้อาซีโตไนไตรล์ 80% (CH_3CN 80%) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) และ 40 องศาเซลเซียส (ข) ในที่มีแสง (△) และไม่มีแสง (▲); ความยาวรากของชุดควบคุม 5.2±0.50 เซนติเมตร (n = 6) 30

รูปที่ 9 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 เทียบกับชุดควบคุมโดยใช้เมทานอล 80% (MeOH 80%) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) และ 40 องศาเซลเซียส (ข) ในที่มีแสง (□) และไม่มีแสง (■); ความยาวรากของชุดควบคุม 5.2±0.50 เซนติเมตร (n = 6) 31

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 10 ภาพถ่ายปลายรากข้าวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM); ปลายรากข้าวของชุดควบคุม (ก) และปลายรากข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (ข, ค) 33

รูปที่ 11 ภาพถ่ายเซลล์ปลายรากข้าวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM); ปลายรากข้าวของชุดควบคุม (ก) และปลายรากข้าวที่ได้สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (ข, ค) 34

รูปที่ 12 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ 39

รูปที่ 13 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ 40

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) (สกว.-ศช.) ในการสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในความอนุเคราะห์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการในการดำเนินงานวิจัยมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้จัดทำ

SCREENING OF HERBICIDE-PRODUCING MICROALGAL STRAINS

Arm Unartngam, Suphansa Khantasopa, Watcharee Kunyalung and Aparat Mahakhant

ABSTRACT

The objectives of this project are: to screen potent herbicide producing microalgal strains, to study the optimal time course of growth and herbicide production of selected strain as well as to study the efficiency and physico-chemical properties of herbicide produced by selected strain. From primary screening of herbicide producing strains using *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 as test organism, three algal strains were selected. The strains of which were *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, and *Oscilltoria* sp. TISTR 8245. The crude extracts of these strains were tested on their growth inhibition effects toward Pathum Thani 1 Rice variety (as the representative of grass used in this study). All these extracts expressed better inhibition on the germination of root than shoot. *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 showed the highest inhibition efficiency. The EC_{50} on root and shoot were 0.26 and 1.72 % (dried algal weight in 80% methanol), respectively. The optimal time course of growth and herbicide production of *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 at 7, 14 and 21 day of cultivation were investigated. The highest growth and herbicide production could obtain at day 21 of cultivation. The algal extracted by 80% methanol at 40°C in dark room expressed the highest inhibition efficiency on rice. An investigation on mode of action of crude extract on rice growth inhibition was conducted using both scanning and tranmission electron microscopes. It was found that the cuticle of root tip was destroyed and cells at the tip were deformed and loosen-off. Beside, the precipitation of protein in cells was also detected. Stability of crude extract was investigated and the result showed that the extract is stable at pH 5-7 and at 50°C for more than 120 minutes. The crude extract showed the negative results toward the tests of Ninhydrin, Biuret, Molisch's, Anthrone, unsturation including protease inhibition. These results indicated that the active compounds are possibly large or complicate molecules e.g. cyclic peptides which have generally been found to produce by algae, especially blue-green algae.

การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารควบคุมวัชพืช

อาร์ม อันอาตม์งาม, สุพรรษา ขันธโสภา, วัชรี กัลยาลัง และ อาภารัตน์ มหาขันธ์

บทคัดย่อ

โครงการนี้วัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารควบคุมวัชพืช ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารกำจัดวัชพืช รวมศึกษาถึงประสิทธิภาพและคุณสมบัติบางประการของสารควบคุมวัชพืชจากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก ผลการคัดเลือกเบื้องต้นโดยใช้สาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เป็นตัวทดสอบ พบว่า มีสาหร่ายที่มีศักยภาพสูง 3 สายพันธุ์ คือ *Anabaena* sp. TISTR 8077 *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 เมื่อนำสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของพืชตระกูลหญ้า พบว่า สาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการงอกของรากมากกว่ายอด *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีประสิทธิภาพสูงสุดโดย EC_{50} ในการยับยั้งการเจริญของรากและยอดข้าว เท่ากับ 0.26 และ 1.72 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% เมทานอล) ตามลำดับ การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารกำจัดวัชพืชใน 3 ระยะ คือ วันที่ 7, 14 และ 21 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 จะมีการเจริญเติบโตและผลิตสารกำจัดวัชพืชได้สูงสุดในวันที่ 21 การสกัดสารควบคุมวัชพืชโดยใช้เมทานอล 80% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีแสง จะได้สารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าวดีที่สุด การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 จะทำลายผิวของปลายรากข้าว ทำให้เซลล์ปลายรากผิดปกติและหลุดออก รวมทั้งก่อให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนภายในเซลล์ การศึกษาความคงตัวของสารสกัดหยาบของสาหร่าย พบว่า มีความคงตัวที่ความเป็นกรด-ด่าง 5-7 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลากว่า 120 นาที สารสกัดหยาบให้ผลลบกับปฏิกิริยานินไฮดริน, ปฏิกิริยาไบยูเรต, การทดสอบโมลิสช์, การทดสอบแอนโทรน, การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน รวมทั้งการทดสอบการยับยั้งด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จึงคาดว่าสารกำจัดวัชพืชที่สาหร่ายผลิตขึ้นอาจเป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลใหญ่หรือซับซ้อน เช่น วงแหวนเปปไทด์ ซึ่งมักพบว่าเป็นสารออกฤทธิ์ที่ผลิตโดยสาหร่ายโดยเฉพาะกลุ่มสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

1. บทนำ

ในแต่ละปีการควบคุมศัตรูพืชในระบบการเกษตรของประเทศไทยมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเป็นปริมาณมาก โดยส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้สูญเสียเงินตราเป็นจำนวนมาก ข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตร (http://www.doa.go.th) พบว่าในปี พ.ศ. 2549 ประเทศไทยนำเข้าสารควบคุม/กำจัดศัตรูพืชจากต่างประเทศปริมาณเกือบ 100,000 ตัน มีมูลค่าไม่น้อยกว่า 12,800 ล้านบาท ในจำนวนนี้ เป็นการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชกว่า 62,000 ตัน มีมูลค่ากว่า 6,800 ล้านบาท คิดเป็นปริมาณและมูลค่ามากกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาณนำเข้าสารควบคุม/กำจัดศัตรูพืชทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าสารกำจัดวัชพืชที่นำเข้าส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ยากจึงเกิดการสะสมในระบบนิเวศ และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงสุขอนามัยของเกษตรกรผู้ใช้และผู้ที่อาศัยในบริเวณใกล้เคียง อีกทั้งสารกำจัดวัชพืชบางชนิดยังมีผลตกค้างในพืชและผลผลิตอีกด้วย ในปัจจุบันการปลูกพืชโดยลดการใช้หรือไม่ใช้สารเคมีโดยเฉพาะสารกำจัดวัชพืชทำได้ยาก เนื่องจากการควบคุมวัชพืชโดยไม่ใช้สารเคมีเป็นการสิ้นเปลืองแรงงานและเวลามาก การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อควบคุมวัชพืชจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ภาครัฐควรสนับสนุนและให้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ซึ่งจะช่วยให้การควบคุมวัชพืชมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ ต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังช่วยลดการสูญเสียเงินตรา รวมถึงการพึ่งพาการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชจากต่างประเทศ อีกทั้งยังสนับสนุนระบบเกษตรปลอดสารพิษและเกษตรอินทรีย์อย่างยั่งยืนอีกด้วย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารกำจัดวัชพืชจากสาหร่ายยังมีการศึกษาไม่มากนัก ที่ผ่านมามีการศึกษาในด้านต่างๆ ดังนี้ Mason และคณะ (1982) ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางการเกษตรที่มีผลต่อการควบคุมวัชพืชที่สกัดได้จากสาหร่าย พบว่า สาหร่าย *Scytonema hofmanni* สามารถผลิต cyanobacterin ที่มีองค์ประกอบของคลอรีน (chlorine) และ γ-ylidene-γ-butyrolactone (Gleason *et al.* 1986) โดยที่ความเข้มข้น 5 μM สามารถยับยั้งการถ่ายทอดอิเลคตรอนใน Hill reaction ของ photosystem II ได้เช่นเดียวกับการศึกษาใน *Oscillatoria* sp. (Kirk *et al.* 1979; Schmid and Lehmann-Kirk 1977) สาหร่ายบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารที่มีผลต่อองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน และ DNA (Pflugmacher *et al.* 2006) อีกทั้งยังใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าสารยับยั้ง photosystem II ที่ชื่อ DCMU [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] (Gleason and Case 1986) ยังมีการศึกษาพบว่าสาหร่ายสกุล *Hapalosiphon* sp. สามารถผลิตสาร hapalindoles ซึ่งเป็นสาร indole alkaloid มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนของหญ้าข้าวนก (Barnyard grasses, *Echinochloa crus-galli*) และผักโขม (Slender amaranthus, *Amaranthus viridis*) ผักกาดขาวและถั่วผี (ณัฏฐา และคณะ 2544)

และสารสกัดหยาบจากสาหร่ายบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของรากต้นอ่อน Alfalfa (*Medicago sativa*) ได้ (Pflugmacher *et al.* 2006) โดยมีผลต่อการแบ่งเซลล์ของปลายราก

ในปัจจุบันการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสาหร่ายที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางการเกษตรโดยศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มีความก้าวหน้าไปมาก เนื่องจากเป็นหน่วยงานกลางของประเทศที่มีหน้าที่รวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์จุลสาหร่าย (microalgae) จากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศเพื่อการให้บริการและใช้ประโยชน์ทางการเกษตร อุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งค้นคว้าวิจัยและพัฒนาถึงแนวทางการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายอย่างยั่งยืน ปัจจุบันคลังเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายของ ศจล. มีการรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายจากแหล่งธรรมชาติตลอดเวลา และเก็บรักษาอยู่ทั้งสิ้นกว่า 1,000 สายพันธุ์ ซึ่งกว่า 200 สายพันธุ์ได้มาจากการดำเนินโครงการสำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ ซึ่งสนับสนุนโดยโครงการ BRT ในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมา ศจล. ได้วิจัยถึงการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย ผลการวิจัยเบื้องต้นเกี่ยวกับสารสกัดจากสาหร่ายที่ควบคุมสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (allelopathic chemical) พบว่า สาหร่ายบางสกุล เช่น *Anabaena* และ *Hapalosiphon* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายหลายสายพันธุ์ เช่น *Anabaena siamensis, Microcystis aeruginosa* และ *Scenedesmus* spp. ฯลฯ ได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากสาหร่ายดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นสารควบคุมวัชพืชซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าการใช้ประโยชน์จากสาหร่าย รวมทั้งเป็นทางเลือกใหม่ที่จะทำให้การควบคุมวัชพืชในระบบการเกษตรของประเทศไทยมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น และเป็นไปตามกระแสความต้องการของผู้บริโภคทั่วโลกในขณะนี้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารควบคุมวัชพืชในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารกำจัดวัชพืชของสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือกในห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพและคุณสมบัติบางประการของสารควบคุมวัชพืชจากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือกในห้องปฏิบัติการ

3. วิธีการศึกษา

3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารกำจัดวัชพืชเบื้องต้นโดยทดสอบกับสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารกำจัดวัชพืชในเบื้องต้น โดยศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ก่อนทำการทดสอบกับพืช ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1.1. เตรียมทำ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 บน ultra-low-gelling-temperature agarose (Watanabe *et al.* 1998)

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ในอาหารเหลว MA (Ichimura 1978) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน เติมสารแขวนลอยของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่มีค่าความหนาแน่นของเซลล์เป็น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 1,000 นาโนเมตร (OD_{1000nm}, spectrophotometer, Hewlett Packard 8453) ลงไปให้ได้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรของสารแขวนลอยของสาหร่ายต่อปริมาตรอาหาร ผสมให้เข้ากันกับอาหารวุ้น MA กึ่งแข็ง เตรียมโดยใช้อากาโรส (ultra-low-gelling-temperature agarose) ความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ ที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave, Tomy Seiko รุ่น SS-325) เทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว แล้วพันด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส โดยวางไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสงที่ให้ความสว่างต่อมืด 12:12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

3.1.2. เตรียมทำ algal lawn ของสาหร่าย 30 สายพันธุ์ เพื่อใช้ทดสอบศักยภาพในการผลิตสารกำจัดวัชพืช

เพาะเลี้ยงสาหร่าย (ตารางที่ 1) ในอาหารสูตร BGA ดัดแปลง (Antarikanonda 1980) โดยการเติม $NaNO_3$ 1.5 กรัมต่อลิตร (BGA+N) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน เติมสารแขวนลอยของสาหร่าย 30 สายพันธุ์ ที่บดเซลล์ให้ละเอียดผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยที่บดเนื้อเยื่อ (tissue grinder) มีค่าความหนาแน่นของเซลล์เป็น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 1,000 นาโนเมตร เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสารแขวนลอยของสาหร่ายต่อปริมาตรอาหาร ผสมให้เข้ากันกับอาหารวุ้น (agar) เตรียมโดยใช้วุ้นความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ พันด้วยพาราฟิล์มแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29±1 องศา

เซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 1 สาหร่าย 30 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ

TISTR No.	ชื่อวิทยาศาสตร์
8077	*Anabaena* sp.
8075	*Anabaena spiroides*
8014	*Anabaena tarulosa*
8404	*Anabaena variabilis*
8110	*Calothrix* sp.
8216	*Cylindrospermum* sp.
8215	*Fischerella muscicola*
8220	*Fischerella* sp.
8221	*Fischerella* sp.
8239	*Fischerella* sp.
8224	*Hapalosiphon delicatulus*
8225	*Hapalosiphon fontinalis*
8227	*Hapalosiphon intricatus*
8229	*Hapalosiphon* sp.
8231	*Hapalosiphon* sp.
8232	*Hapalosiphon* sp.
8233	*Hapalosiphon* sp.
8172	*Nostoc microscopicum*
8886	*Nostoc microscopicum*
8164	*Nostoc muscorum*
8890	*Nostoc paludosum*
8891	*Nostoc paludosum*
8892	*Nostoc paludosum*
8893	*Nostoc paludosum*
8889	*Nostoc punctiforme*
8179	*Nostoc* sp.
8169	*Nostoc spongiaeforme*
8245	*Oscillatoria* sp.
8254	*Stigonema* sp.
8255	*Stigonema* sp.

3.1.3. การทดสอบประสิทธิภาพของสาหร่าย 30 สายพันธุ์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

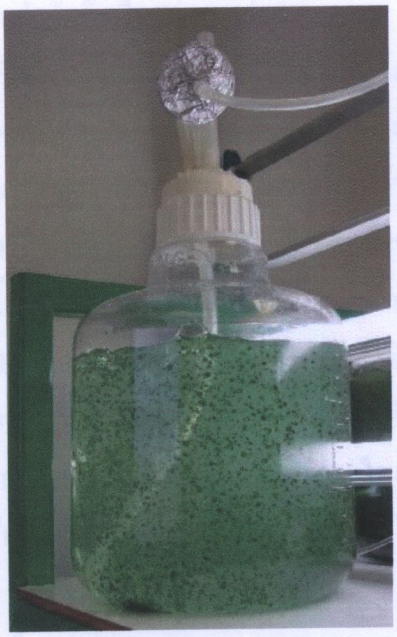
นำ algal lawn ของสาหร่าย 30 สายพันธุ์ มาเจาะด้วย cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำชั้นสาหร่ายมาวางบน algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวาง 4 ตำแหน่ง ห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยงเชื้อด้านละ 14 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 10 วัน วัดขนาดโซนยับยั้งหรือโซนใส (inhibition zone, clear zone) ที่เกิดขึ้นบน algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ และบันทึกผล

- คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยสังเกตจากขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นเป็นบริเวณกว้าง 3 อันดับแรก เพื่อนำมาใช้ในการทดลองกับวัชพืชในขั้นต่อไป

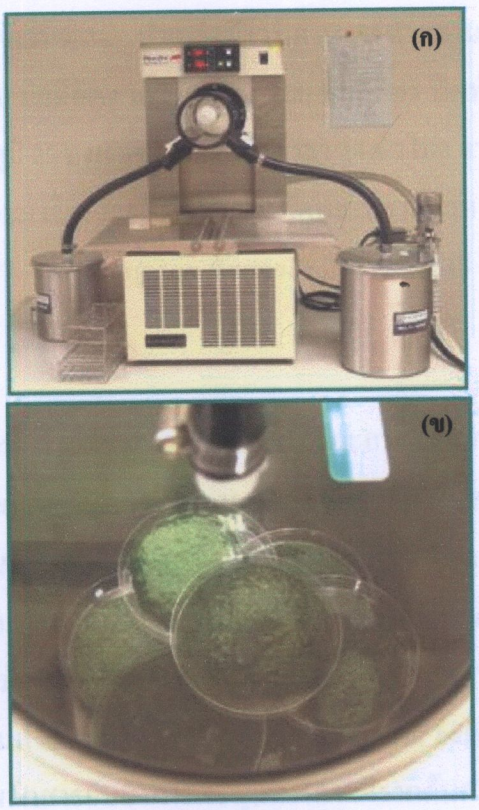
3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารกำจัดวัชพืชโดยการทดสอบกับข้าว

3.2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก

นำสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือกที่พบว่า มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ได้สูงจากการทดสอบเบื้องต้น จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Anabaena* sp. TISTR 8077 *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 มาเพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยง (carboy, Nalgene) ขนาด 12 ลิตร (รูปที่ 1) โดยใช้อาหารสูตร BGA+N ปริมาตร 10 ลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ (cool-white fluorescence) ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน สำหรับ *Anabaena* sp. TISTR 8077 และ 21 วัน สำหรับ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยกรองด้วยตาข่ายกรองแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาด 8 ไมครอน ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ไปทำให้แห้งแบบการระเหิด (freeze-dried) ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze-dryer, Kinetics รุ่น Flexi-Dry) จากนั้นนำเซลล์ที่แห้งแล้วไปสกัดต่อไป (รูปที่ 2)



รูปที่ 1. การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์สาหร่ายโดยใช้ถังเพาะเลี้ยง (carboy) ขนาด 10 ลิตร



รูปที่ 2. การทำให้เซลล์สาหร่ายแห้งโดยเครื่องทำให้เซลล์แห้งโดยการระเหิด (freeze-dryer, Kinetics รุ่น Flexi-Dry) (ก) และเซลล์สาหร่ายระหว่างการทำแห้งโดยการระเหิด (ข)

3.2.2 การสกัดสารชีวภาพกำจัดวัชพืชจากสาหร่าย

ทำการสกัดสารชีวภาพจากสาหร่าย (อินทิรา และคณะ 2550) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ใช้เป็นตัวแทนของพืชทดสอบในตระกูลหญ้า โดยนำเซลล์แห้งของสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือกมาสกัดด้วยสารละลายเมทานอล 80% ที่ความเข้มข้นของสาหร่ายเท่ากับ 0.15, 0.3, 0.6 และ 1.2 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้งใน 80% MeOH) แล้วนำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Ultra Turray รุ่น T25B) ที่ 11,000 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้สารผสมเนื้อเดียว จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman) ได้สารละลายใสสำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวต่อไป

3.2.3 การเตรียมทดสอบพืชทดสอบ

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 จากสถานีวิจัยข้าวปทุมธานี อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เป็นตัวแทนพืชตระกูลหญ้า เนื่องจากข้าวพันธุ์นี้สามารถตอบสนองต่อสารเคมีได้ดีและมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง (มากกว่า 98%) นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น 100 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปิดทับด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์แล้วนำไปวางไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเทน้ำออกนำเมล็ดที่เริ่มงอกไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารสกัดหยาบจากสาหร่าย (ตามวิธีการในข้อ 3.2.2) *Anabaena* sp. TISTR 8077 *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 ต่อไป

3.3 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวของสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ในอาหารเหลว BGA+N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการบ่มและเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายตามวิธีการในข้อ 3.2.1 เก็บเกี่ยวสาหร่ายทุกวันในเวลาเดียวกันเป็นเวลา 24 วัน นำไปอบแห้งด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance, Sartorius รุ่น LA 230S) การศึกษาช่วงเวลาในการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวโดยเก็บเกี่ยวสาหร่ายที่อายุ 7, 14 และ 21 วัน นำมาสกัดตามวิธีการในข้อ 3.2.2 แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวต่อไป

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

3.4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการสกัดสารชีวภาพจากสาหร่ายต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชตระกูลหญ้า

สกัดสารชีวภาพจากสาหร่ายความเข้มข้นตามความเข้มข้นในข้อ 3.2.2 จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 และ 40 องศาเซลเซียส (ณัฏฐา และคณะ 2006) ในที่มีแสงและที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman) ได้สารละลายใสสำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวต่อไป

3.4.2 การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสารชีวภาพต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชตระกูลหญ้า

นำเซลล์ของสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มาทำให้แห้งแบบการระเหิดที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 สกัดตามวิธีในข้อ 3.2.2 (อินทิรา และคณะ 2550) หรืออาซีโตไนไตรล์ (CH_3CN 80%) (Kuet and Seng 2004) 1 ลิตร แล้วนำไปปั่นละเอียดให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยวิธีในข้อ 3.2.1 จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงและไม่มีแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman) ได้สารละลายใสสำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวต่อไป

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

นำสารละลายใส (ที่ได้จากข้อ 3.3 และ 3.4.1-3.4.2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman) ที่วางบนจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) พลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร นำไประเหยแห้งในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรอง วางเมล็ดข้าวที่ผ่านการแช่น้ำกลั่นบนกระดาษกรองจานละ 10 เมล็ด ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ นำจานเลี้ยงเชื้อวางในถาดสแตนเลส ปิดด้วยพลาสติกใสเพื่อควบคุมความชื้นภายใน แล้วปิดทับอีกครั้งด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง เก็บไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (รูปที่ 3) ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลโดยการวัดความยาวรากและยอดของต้นกล้าข้าว

รูปที่ 3. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวโดยใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองในข้อ 3.2 – 3.4 วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ตาราง ANOVA และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test (DMRT)

3.6 การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของปลายรากข้าว สารสกัดจากสาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ดำเนินการโดยฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.7 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical) บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

3.7.1 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าวโดยใช้เป็นตัวทดสอบ ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (thin layer chromatography, TLC)

1) การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

นำสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที หยดสารสกัดที่เข้มข้นลงบนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel $60F_{254}$) ที่มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร กว้าง 2 เซนติเมตร และยาว 7 เซนติเมตร นำไปจุ่มในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมซึ่งมีอัตราส่วนผสมดังนี้

คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำ	อัตราส่วน 6 ต่อ 4 ต่อ 1
คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำ	อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1
คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำ	อัตราส่วน 10 ต่อ 3 ต่อ 1

นำแผ่นซิลิกาเจลที่สารละลายผสมซึมผ่านขึ้นมาถึงระยะที่กำหนดมาทำให้แห้ง และนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งของสารต่างๆ ที่แยกออกมา โดยนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คำนวณหาค่า R_f ของแต่ละสารที่แยกออกมา จากนั้นนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธีออโตไบโอกราฟ (autobiograph) (Poon *et al.* 1987; Al-Lay *et al.* 1988) โดยใช้สาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เป็นตัวทดสอบ นำสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ผสมลงในอากาโรส (agarose) 1.6 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมในอาหาร MA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เทลงบนแผ่นซิลิกาเจลที่อยู่ในจานเพาะเชื้อจนอาหารท่วมทั้งแผ่น จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที พันด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส วางไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสงที่ให้ความสว่างต่อมืด 12:12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ตรวจหาตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ที่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ออกจากส่วนอื่นๆ ที่ปะปนได้อย่างชัดเจน ทำให้ทราบค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2) การใช้ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ออกจากสิ่งเจือปนเพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)

หยดสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลจากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือกที่ทำให้เข้มข้นลงบนแผ่นซิลิกาเจลที่มีความหนา 2.0 มิลลิเมตร กว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร วิธีการหยดจะหยดต่อกันไปเป็นเส้นตรงตลอดความยาวของแผ่นซิลิกาเจล โดยตำแหน่งที่หยดสารสกัดให้ห่างจากขอบล่าง 1.5 เซนติเมตร นำไปจุ่มในภาชนะอิ่มตัวด้วยสารละลายที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลอง คือ คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 7 : 3 : 1 เมื่อสารละลายผสมซึมผ่านขึ้นมาถึงระยะที่กำหนด นำแผ่นซิลิกาเจลออกจากภาชนะมาผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ตรวจสอบหาตำแหน่งของสารต่างๆ ที่แยกออกมาได้ ใช้ดินสอทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของสารในแต่ละแถบที่ออกฤทธิ์ (active band) ขูดซิลิกาเจลจากบริเวณตำแหน่งสารที่ออกฤทธิ์แต่ละตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ บดให้ละเอียดและนำไปละลายในเมทานอลในปริมาณมากพอที่จะละลายสารที่แยกได้ออกมา กรองแยกส่วนที่เป็นซิลิกาเจลออกจากสารละลาย นำเอาส่วนใสที่กรองได้ไประเหย เอาตัวทำละลาย (เมทานอล) ออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดันจนแห้ง นำสารที่ได้ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย/ข้าว ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี

3.7.2 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารสกัดจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

1) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีบางประการของสารสกัดจากสาหร่ายที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีมาศึกษาคุณสมบัติทางเคมีบางประการดังนี้

1.1) ปฏิกิริยานินไฮดริน (ninhydrin reaction)

ปฏิกิริยานินไฮดริน เป็นปฏิกิริยาการทดสอบกรดอะมิโนอิสระ และกรดอะมิโนเปปไทด์หรือโปรตีน โดยปิเปตต์สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.0 ลงในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยานินไฮดริน นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินถึงม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก ซึ่งแสดงว่าสารละลายตัวอย่างประกอบด้วยกรดอะมิโน หรือกรดอะมิโนในเพปไทด์หรือโปรตีน

1.2) ปฏิกิริยาไบยูเรต (biuret reaction)

ปฏิกิริยาไบยูเรต เป็นปฏิกิริยาการทดสอบสารที่ประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ตั้งแต่ 2 แห่งขึ้นไป ทดสอบโดยปิเปตต์สารละลายตัวอย่างใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย

คอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี ถ้าสีชมพูเกิดขึ้นให้บันทึกผล เป็นบวก ซึ่งแสดงว่าสารตัวอย่างประกอบด้วยพันธะเปปไทด์

1.3) ปฏิกิริยาการทดสอบโมลิสช์ (Molisch, s test)

การทดสอบโมลิสช์ เป็นวิธีการทดสอบน้ำตาล โดยใช้กรดเข้มข้นดึงน้ำออกจากน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซส ในกรณีของเฮกโซส จะกลายเป็นเฟอฟีวรัล และไฮดรอกซีเมทิล-เฟอฟีวรัลเฮกโซส ถ้าเป็นอัลโดเฮกโซส จะได้อนุพันธ์เฟอฟีวรัลประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ และถ้าเป็นคีโตเฮกโซส จะได้อนุพันธ์เฟอฟีวรัล 20-25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการทดสอบน้ำตาลทำได้โดยใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำยาโมลิสช์ ลงไปหลอดละ 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ค่อยๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงข้างๆหลอดทดลอง ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย ถ้าปรากฏเป็นสีชมพูถึงม่วงให้บันทึกผลเป็นบวก ซึ่งแสดงว่าสารตัวอย่างประกอบด้วยน้ำตาล

1.4) ปฏิกิริยาการทดสอบแอนโทรน (Anthrone test)

การทดสอบแอนโทรนเป็นวิธีการทดสอบน้ำตาล โดยใช้กรดกำมะถันดึงน้ำออกจากน้ำตาล กลายเป็นเฟอฟีวรัล หรือ อนุพันธ์ของเฟอฟีวรัล ซึ่งจะรวมกับแอนทรานอล (ในน้ำยาแอนโทรน) ได้สารละลายสีเขียวจนถึงน้ำเงิน ซึ่งการทดสอบน้ำตาลทำได้โดยใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำยาแอนโทรน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสี ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอมเขียวให้บันทึกผลเป็นบวก

1.5) การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน (unsaturation test)

โครงสร้างของไขมันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดอิ่มตัว ไม่มีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้าง และชนิดไม่อิ่มตัว มีพันธะคู่สามารถทำปฏิกิริยากับสารพวกฮาโลเจน โดยจะฟอกสีฮาโลเจน จึงใช้คุณสมบัติในข้อนี้ทดสอบว่าไขมันที่นำมาทดสอบมีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้างหรือไม่ ทดสอบโดยปิเปตต์คลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิเมตร เติมสารละลายตัวอย่าง 2 หยด ลงในหลอดทดลองดังกล่าว จากนั้นค่อยๆ หยดสารละลายโบรมีนลงไปทีละหยด ผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดทดลองดังกล่าวด้วยฝ่ามือ ถ้าสารละลายตัวอย่างมีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้าง จะฟอกสีโบรมีนได้ ให้บันทึกผลเป็นบวก

1.6) การทดสอบการยับยั้งโดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibition)

ใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่เอนไซม์โปรติเอสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทั้ง 2 หลอด จากนั้นนำไปย่อยใน mineral oil bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนที่เหลืออีกหนึ่งหลอดจะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารที่ได้ทั้ง 2 หลอด หยดบนแผ่นทดสอบนำไปวางบนผิวหน้าของ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน ตรวจวัดผลโดยสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น สารตัวอย่างซึ่งถูกย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ต้องเกิดโซนใส เนื่องจากเอนไซม์ถูกย่อยด้วยความร้อนทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ถูกทำลาย ส่วนหลอดที่ใส่เอนไซม์วางไว้ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ถ้าไม่เกิดโซนใสให้รายงานผลเป็นบวก ส่วนตัวควบคุมจะใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการทดสอบต้องเกิดโซนใส

2) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

2.1) การศึกษาความคงตัวของสารสกัดในสภาพความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ

นำสารสกัดหยาบมาปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มัล หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มัล ตามลำดับ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 7 ก่อนนำไปตรวจหาประสิทธิภาพของสารสกัดโดยวิธี paper disc plate และวิเคราะห์ผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์ (relative inhibition) กับชุดควบคุม คือ ปริมาณสารออกฤทธิ์จากสารสกัดที่ความเป็นกรดเป็นด่าง เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนี้

2.2) การศึกษาความคงตัวของสารสกัดที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

นำสารสกัดมาปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 7 ปิเปตต์สารสกัดใส่หลอดแก้วขนาดเล็กปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งในโถระเหยแห้งสุญญากาศ ชั่งหาน้ำหนักสารสกัด นำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 50 70 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างสารสกัดทุกๆ 15 นาที นำมาทดสอบประสิทธิภาพโดยวิธี paper disc plate และวิเคราะห์ผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์

4. ผลการศึกษา

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารกำจัดวัชพืชเบื้องต้น โดยการทดสอบกับสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

เมื่อนำตัวอย่างสายพันธุ์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจำนวน 30 สายพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมไว้ในศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยใช้ ultra-low-gelling-temperature agarose 1.6 เปอร์เซ็นต์ ทำ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 พบว่า เกิดโซนยับยั้ง 17 สายพันธุ์ (ดังตารางที่ 2) คิดเป็นร้อยละ 51.72 ของสายพันธุ์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ใช้ในการคัดเลือกสาหร่ายทั้ง 17 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Anabaena spiroides* TISTR 8075, *Anabaena variabilis* TISTR 8404, *Fischerella muscicola* TISTR 8215, *Fischerella* sp. TISTR 8239, *Hapalosiphon delicatulus* TISTR 8224, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8229, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8231, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8232, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8233, *Nostoc microscopicum* TISTR 8172, *Nostoc microscopicum* TISTR 8886, *Nostoc muscorum* TISTR 8164, *Nostoc punctiforme* TISTR 8165, *Nostoc* sp. TISTR 8179 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245

จากผลการศึกษาเบื้องต้นจึงคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 ซึ่งสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ได้ดีที่สุด 3 ลำดับแรกโดยมีโซนยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเรียงตามลำดับจากมากไปน้อย 22.38, 21.49 และ 21.32 มิลลิเมตร มาใช้ในการทดสอบศักยภาพในการผลิตสารกำจัดวัชพืชโดยการทดสอบกับข้าวในขั้นต่อไป

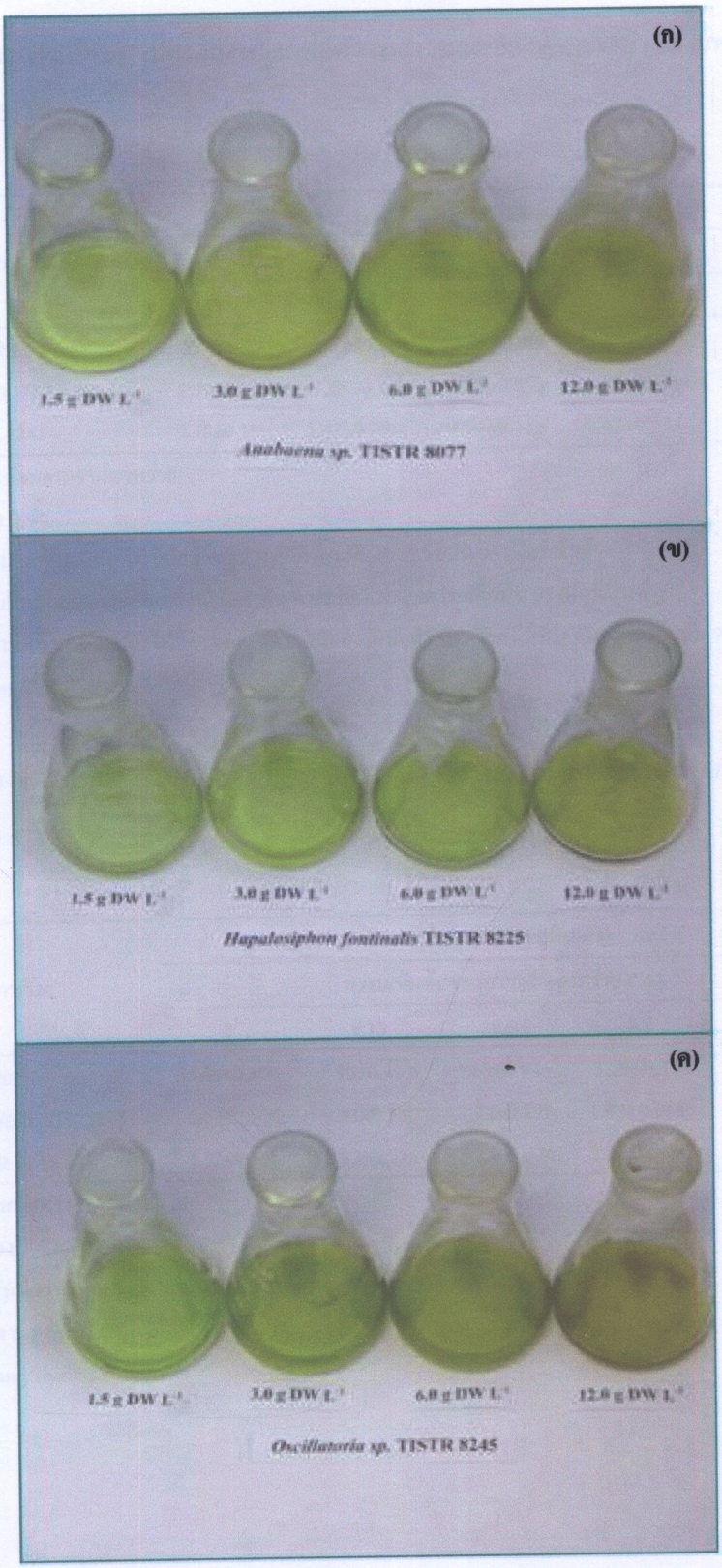
ตารางที่ 2 สายพันธุ์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

สายพันธุ์สาหร่าย	โซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ±SD
Anabaena sp. TISTR 8077	22.38±0.32
Anabaena spiroides TISTR 8075	14.82±0.25
Anabaena tarulosa TISTR 8014	-
Anabaena variabilis TISTR 8404	20.89±0.20
Calothrix sp. TISTR 8110	-
Cylindrospermum sp. TISTR 8216	-
Fischerella muscicola TISTR 8215	11.92±0.15
Fischerella sp. TISTR 8220	-
Fischerella sp. TISTR 8221	-
Fischerella sp. TISTR 8239	13.28±0.18
Hapalosiphon delicatulus TISTR 8224	21.49±0.29
Hapalosiphon fontinalis TISTR 8225	17.11±0.14
Hapalosiphon intricatus TISTR 8227	-
Hapalosiphon sp. TISTR 8229	17.25±0.20
Hapalosiphon sp. TISTR 8231	15.20±0.25
Hapalosiphon sp. TISTR 8232	10.57±0.13
Hapalosiphon sp. TISTR 8233	15.78±0.22
Nostoc microscopicum TISTR 8172	9.45±0.15
Nostoc microscopicum TISTR 8886	15.84±0.21
Nostoc muscorum TISTR 8164	17.21±0.16
Nostoc paludosum TISTR 8890	-
Nostoc paludosum TISTR 8891	-
Nostoc paludosum TISTR 8892	-
Nostoc paludosum TISTR 8893	-
Nostoc punctiforme TISTR 8889	14.52±0.21
Nostoc sp. TISTR 8179	16.88±0.25
Nostoc spongiaeforme TISTR 8169	-
Oscillatoria sp. TISTR 8245	21.32±0.28
Stigonema sp. TISTR 8254	-
Stigonema sp. TISTR 8255	-

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารกำจัดวัชพืชโดยการทดสอบกับข้าว

นำสารสกัดหยาบของสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์ได้แก่ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (รูปที่ 4) มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชตระกูลหญ้า โดยใช้ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นพืชทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าวได้ดี (ตารางที่ 3) โดยที่สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าว ตามมาด้วยสารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 ส่วนสารสกัดหยาบจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแม้ว่าความยาวของยอดต้นกล้าข้าวลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบก็ตาม ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าว พบว่า มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) และลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบลดลง ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดหยาบของ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์มีผลต่อการเจริญเติบโตของยอดไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดมากที่สุด

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดหยาบจากทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากได้ดี (ตารางที่ 4) โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ และแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพต่อรากต้นกล้าข้าวแตกต่างกัน โดยที่สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 1.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากได้ดีที่สุดและประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบลดลง รองลงมาได้แก่ สารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 และ *Anabaena* sp. TISTR 8077 ตามลำดับ ซึ่งประสิทธิภาพของแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวได้ดีกว่ายอด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sanevas *et al.* 2006 ที่ศึกษาในสาหร่ายสกุล *Hapalosiphon* เช่นเดียวกัน การยับยั้งที่พบเป็นผลเนื่องมาจากในระยะแรกของการงอก พืชดูดน้ำและสารสกัดผ่านทางรากเป็นหลักทำให้การเจริญเติบโตของปลายรากอาจจะถูกยับยั้งโดยขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมและ/หรือการทำลายออร์แกเนลล์ในเซลล์ (Bogatek *et al.* 2005)



รูปที่ 4. ลักษณะสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Anabaena* sp. TISTR 8077 (ก), *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (ข) และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (ค) ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายต่อความยาวยอดของต้นกล้าข้าวภายหลังให้สารสกัดหยาบ 5 วัน

สายพันธุ์สาหร่าย	ความยาวยอด (เซนติเมตร) ความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย (%)					ค่าทางสถิติ
	0[1]	0.15	0.3	0.6	1.2	P≤0.05
Anabaena sp. TISTR 8077	2.18±0.19	1.78±0.12[2]	1.53±0.40	1.73±0.06	1.53±0.12	NS[3]
Hapalosiphon fontinalis TISTR 8225	2.18±0.19b	1.66±0.19a	1.33±0.28a	1.59±0.41a	1.41±0.26a	*[4]
Oscillatoria sp. TISTR 8245	2.18±0.19b	1.47±0.29ab[5]	1.76±0.16b	1.43±0.34a	1.73±0.21b	*

[1]ชุดควบคุม ไม่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย

[2]ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[3]NS Non significant (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

[4]ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

[5]ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายต่อความยาวรากของต้นกล้าข้าวภายหลังให้สารสกัดหยาบ 5 วัน

สายพันธุ์สาหร่าย	ความยาวราก (เซนติเมตร) ความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย (%)					ค่าทางสถิติ
	0[1]	0.15	0.3	0.6	1.2	P≤0.05
Anabaena sp. TISTR 8077	5.52±0.50b	3.92±0.42[2]a	3.68±0.94a[3]	3.29±0.15a	3.11±0.07a	*[4]
Hapalosiphon fontinalis TISTR 8225	5.52±0.50d	2.41±0.13c	1.72±0.27b	1.42±0.06ab	0.99±0.14a	*
Oscillatoria sp. TISTR 8245	5.52±0.50b	2.93±0.53a	3.23±0.57b	2.96±0.85ab	3.05±0.22b	*

[1]ชุดควบคุม ไม่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย

[2]ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[3]ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

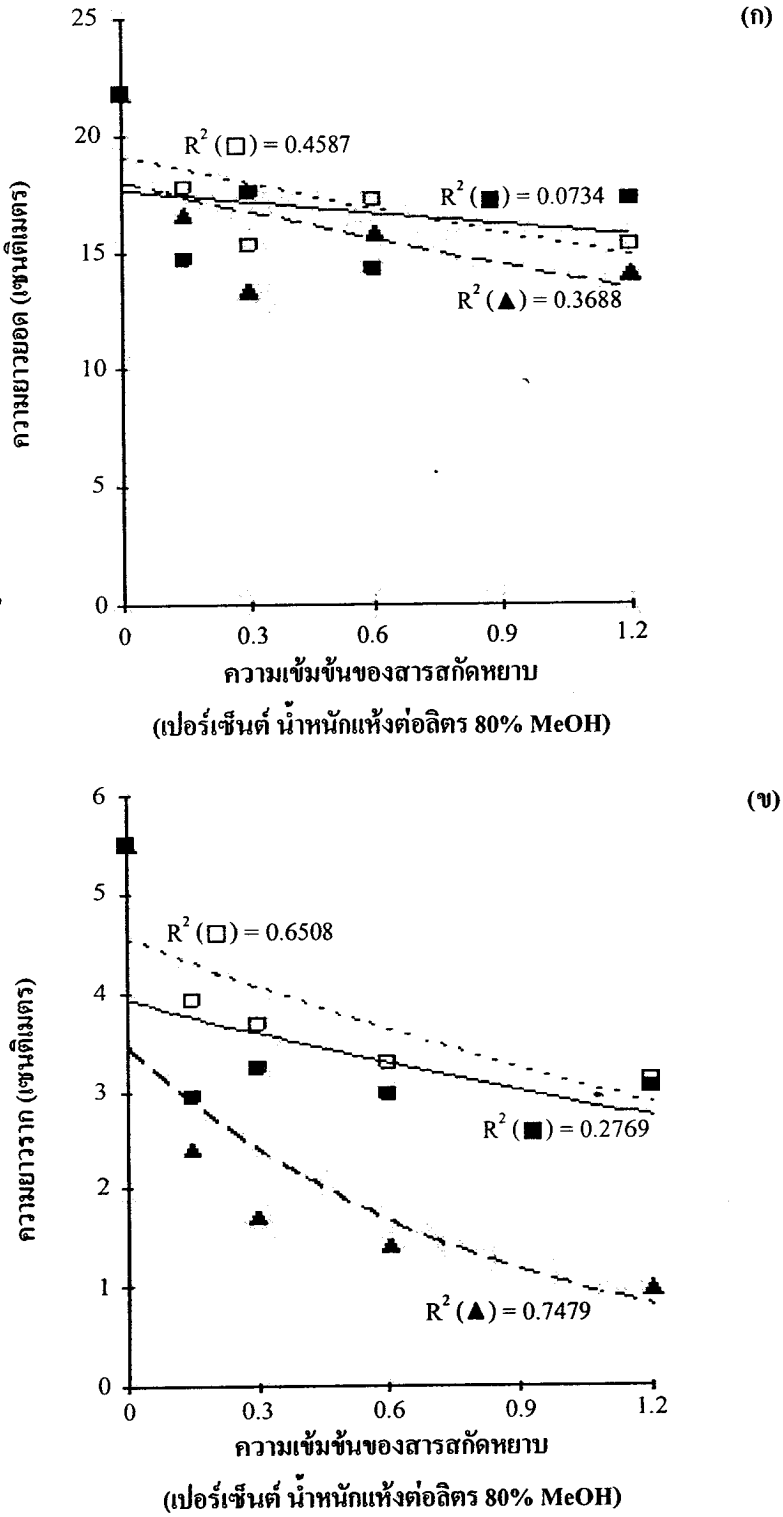
[4]ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test

รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์กับความยาวของยอด (รูปที่ 5 ก) และราก (รูปที่ 5 ข) ของต้นกล้าข้าวที่วัดได้หลังจากได้รับสารสกัดหยาบ 5 วัน พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมีความสัมพันธ์ต่อความยาวของยอดต้นกล้าข้าวแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (รูปที่ 5 ก) โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีความสัมพันธ์กับความยาวยอดมากที่สุด (R^2= 0.3688) รองลงมา คือ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (R^2= 0.0734) ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 (R^2= 0.4587) ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวยอดของต้นกล้าข้าว จากข้อมูลแสดงว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดข้าวต่ำ สำหรับความสัมพันธ์ของความยาวรากกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (รูปที่ 5 ข) พบว่า เป็นไปในแนวทางเดียวกับความยาวยอด โดยที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากข้าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบแต่สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากได้ดีกว่ายอดต้นกล้าข้าว ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีความสัมพันธ์กับความยาวรากมากที่สุด (R^2= 0.7479) และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากจะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น รองลงมาได้แก่ สารสกัดหยาบของ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (R^2= 0.2769) และ *Anabaena* sp. TISTR 8077 (R^2= 0.6508) ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดหยาบของสาหร่ายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากของต้นกล้าข้าวมากกว่ายอดซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sanevas และคณะ (2006) ที่พบว่า สารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของปลายรากของต้นอ่อนพืชได้ดีกว่าปลายยอดโดยไปมีผลต่อการแบ่งเซลล์ของปลายรากพืช

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นของสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์ในสารสกัดหยาบที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดและรากต้นกล้าข้าว 50% (EC_{50}; 50% Effective Concentration) พบว่า ค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าวมีค่ามากกว่า 1.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) ($P \geq 0.05$) โดยที่ค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 มีค่า 3.63 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) รองลงมาได้แก่ *Anabaena* sp. TISTR 8077 มีค่า EC_{50} 2.19 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) และ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีค่า EC_{50} ในยอดน้อยที่สุด คือ 1.72 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) ในขณะที่ค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวมีค่าแตกต่างกัน

($P<0.001$) โดยค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 มีค่ามากกว่า 1.19 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) รองลงมาได้แก่ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 มีค่า EC_{50} 1.15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) และ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีค่า EC_{50} ในรากต่ำที่สุด คือ 0.26 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) แสดงว่าสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวได้ดีกว่ายอด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sanevas และคณะ (2006) ที่พบว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. ในยอดมีค่าสูงกว่ารากประมาณ 5-11 เท่า เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ความยาวยอดและความยาวรากโดยเฉลี่ยของพืชทดสอบลดลง (ณัฏฐา และคณะ 2544) อาจเนื่องมาจากสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งความงอกของเมล็ดและการเจริญของพืชส่วนมากจะมีกลไกในการยับยั้งการแบ่งและการยืดตัวของเซลล์ (Rice 1974) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ที่อยู่บริเวณปลายราก ซึ่งจัดเป็นเนื้อเยื่อเจริญและเป็นส่วนที่โผล่พ้นออกมาจากเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นส่วนแรก ทำให้บริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่ไวต่อสาร (ณัฏฐา และคณะ 2544)

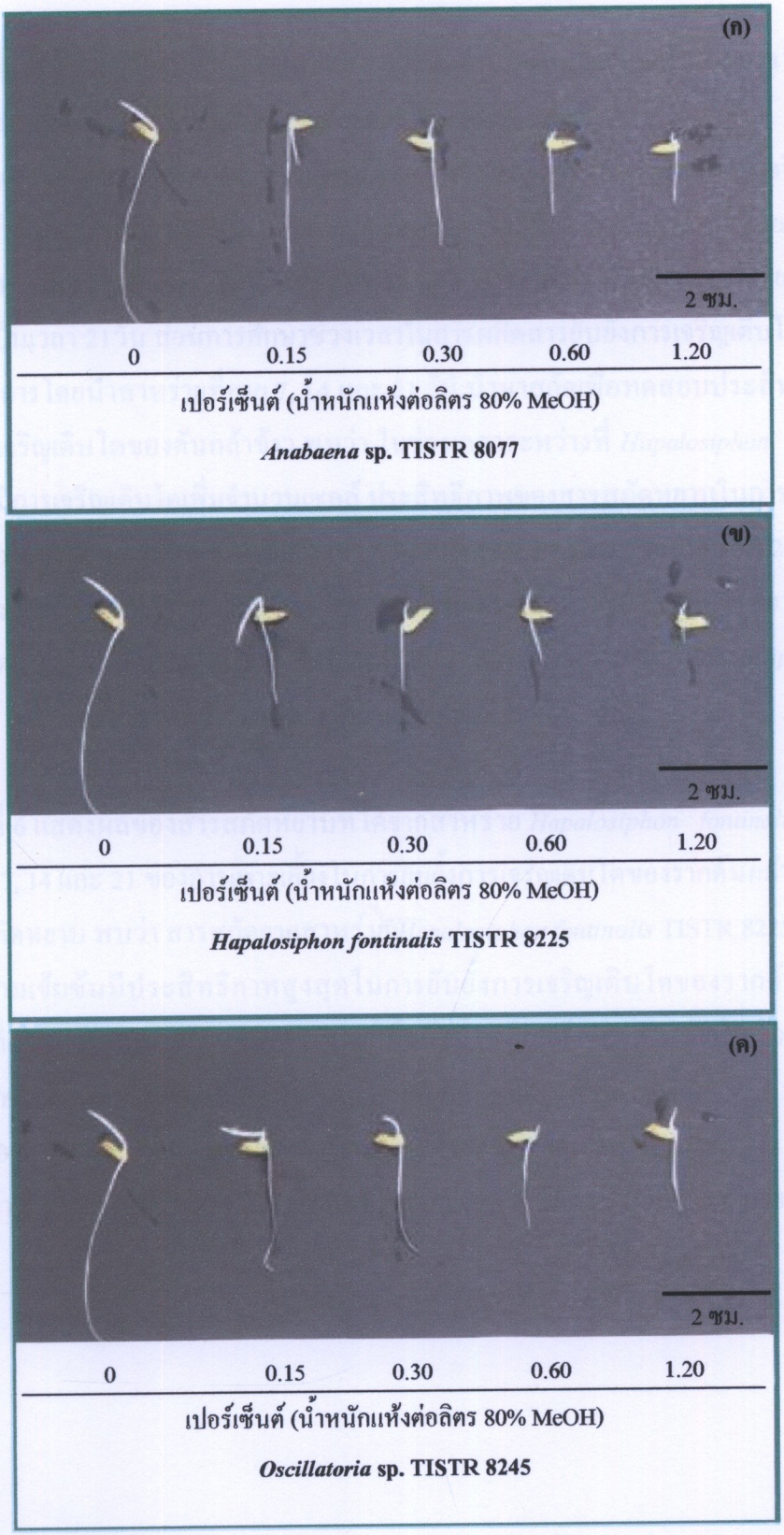
รูปที่ 6 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและยอดของต้นกล้าข้าว พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดและรากต้นกล้าข้าวได้ดี และประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบของ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (รูปที่ 6 ข) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวได้ดีที่สุด ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบของ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) ทำให้รากต้นกล้าข้าวสั้นกว่าต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 ในรูปที่ 6 ก, ค จากข้อมูลเบื้องต้นแสดงว่าสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวสูงกว่ายอด และมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดหยาบจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 ตามลำดับ จึงทำการทดสอบเพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตและการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าว รวมทั้งกระบวนการที่เหมาะสมในการสกัด *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ อุณหภูมิ และแสงในสภาวะที่แตกต่างกันในการสกัดในขั้นต่อไป



รูปที่ 5. ความยาวยอด (ก) และราก (ข) ของต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Anabaena* sp. TISTR 8077 (□), *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (▲) และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (■) เป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของสาหร่ายในสารสกัดหยาบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าว 50% (EC_{50}) ภายหลังให้สารสกัดหยาบ 5 วัน

สายพันธุ์สาหร่าย	EC_{50} (เปอร์เซ็นต์)			
	ยอด	R^2	ราก	R^2
Anabaena sp. TISTR 8077	2.19	0.4587	1.19	0.6506
Hapalosiphon fontinalis TISTR 8225	1.72	0.3688	0.26	0.7478
Oscillatoria sp. TISTR 8245	3.63	0.0734	1.15	0.2769

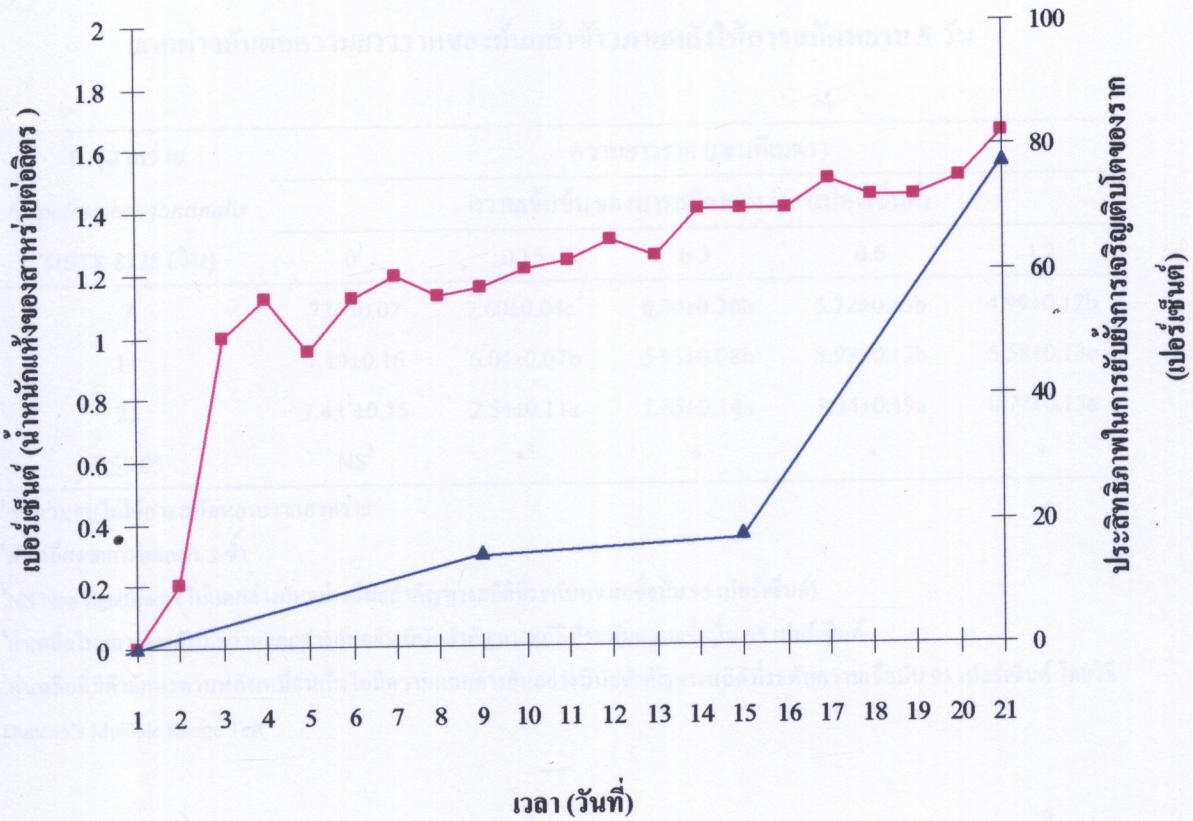


รูปที่ 6. ต้นกล้าข้าวหลังได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Anabaena* sp. TISTR 8077 (ก), *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (ข) และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 (ค) เป็นเวลา 5 วัน

4.3 ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวของสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวของสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (รูปที่ 7) โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลว BGA+N ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เก็บเกี่ยวสาหร่ายทุกวันในเวลาเดียวกันเป็นเวลา 21วัน ส่วนการศึกษาช่วงเวลาในการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นข้าวดำเนินการโดยนำสาหร่ายที่อายุ 7, 14 และ 21 วัน นำมาสกัดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว พบว่า ในช่วงเวลาระหว่างที่ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าก็เพิ่มขึ้นด้วยอย่างช้าๆ ในวันที่ 7 และ 14 จนเมื่อเข้าสู่วันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ณัฏฐา และคณะ (2544) พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ที่อายุ 4 สัปดาห์ สามารถยับยั้งการงอกของผักกาดขาวปลีและถั่วผีได้ดี

ตารางที่ 6 แสดงผลของสารสกัดหยาบที่ได้จากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ในวันที่ 7, 14 และ 21 ของการเพาะเลี้ยงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าว 5 วันหลังให้สารสกัดหยาบ พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่อายุ 21 วัน ในทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าว โดยสารสกัดที่ความเข้มข้นของสาหร่าย 1.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวมากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.6, 0.3 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน 80% MeOH) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดจากสาหร่ายอายุ 7 และ 14 วัน ในทุกความเข้มข้น



(■) น้ำหนักแห้งของสาหร่าย (กรัมต่อลิตร)

(▲) ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าว (เปอร์เซ็นต์)

รูปที่ 7. ช่วงเวลาการเจริญเติบโต (■) และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าว (▲) ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่อายุแตกต่างกันต่อความยาวรากของต้นกล้าข้าวภายหลังให้สารสกัดหยาบ 5 วัน

อายุสาหร่าย	ความยาวราก (เซนติเมตร)				
Hapalosiphon fontinalis	ความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย (เปอร์เซ็นต์)				
TISTR 8225 (วัน)	0[1]	0.15	0.3	0.6	1.2
7	724±0.07	7.60±0.04c[5]	6.30±0.30b	5.72±0.13b	4.99±0.12b
14	7.19±0.16	6.04±0.07b	5.93±0.08b	5.98±0.12b	5.58±0.13c
21	7.43[2]±0.15	2.54±0.11a	1.85±0.14a	1.34±0.19a	0.77±0.15a
P≤0.05	NS[3]	*[4]	*	*	*

[1]ชุดควบคุมไม่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย

[2]ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[3]NS Non significant (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

[4]ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

[5]ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

4.4 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

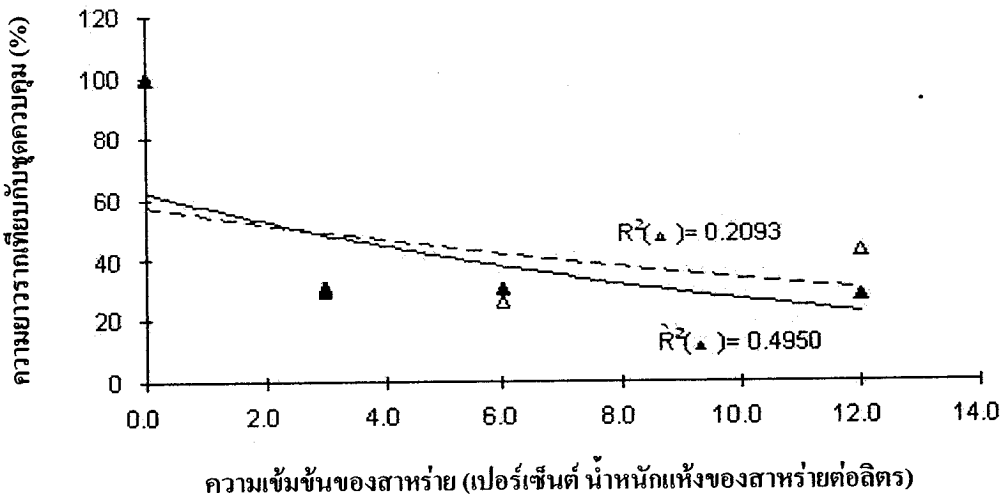
4.4.1 ผลของอุณหภูมิในการสกัดสารชีวภาพจากสาหร่ายต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าว

รูปที่ 8 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่สกัดโดยใช้เมทานอล 80% (80% MeOH) เทียบกับชุดควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและ 40 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงและไม่มีแสง พบว่า การสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวไม่แตกต่างมากนักโดยที่การสกัดโดยไม่ใช้แสงจะทำให้การยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวมีประสิทธิภาพและความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสาหร่ายสูงสุด (R^2= 0.9004) จะได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวสูงสุดและสูงกว่าการสกัดในที่มีแสง (R^2= 0.3424) จากผลการทดลองแสดงว่าการสกัดสารจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 โดยใช้เมทานอล 80% (80% MeOH) ควรใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และสกัดในที่มืด จะได้สารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวดีที่สุด

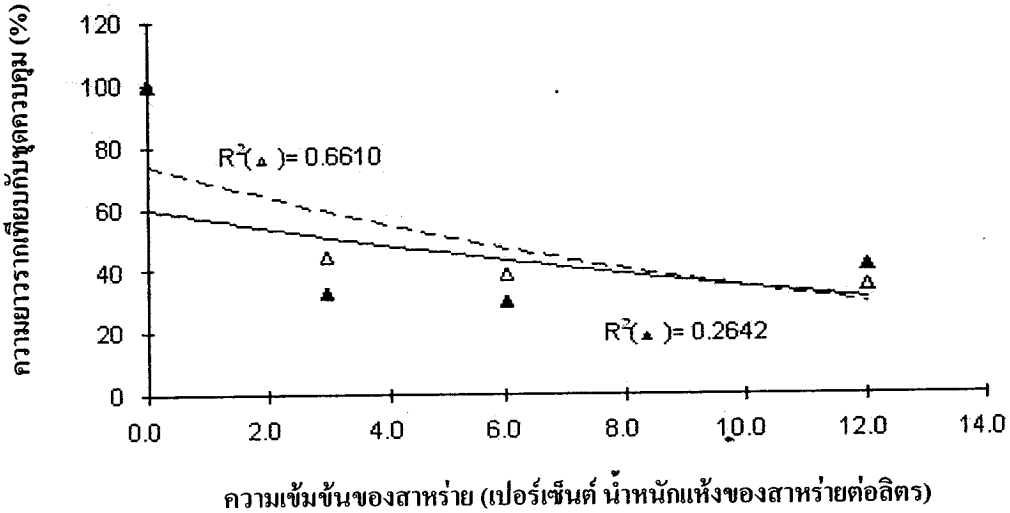
4.4.2 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสารชีวภาพต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าว

รูปที่ 9 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 เทียบกับชุดควบคุมโดยใช้อาซีโตไนไตรล์ 80% (80% CH_3CN) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงและไม่มีแสง พบว่า มีความสัมพันธ์ไม่มากนักระหว่างความยาวรากต้นกล้าข้าวเทียบกับชุดควบคุมกับความเข้มข้นของสาหร่ายโดยที่เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีแสงจะให้ประสิทธิภาพสูงสุด (รูปที่ 9 ข) (R^2= 0.6610) รองลงมาได้แก่ การสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่ไม่มีแสงและมีแสง (รูปที่ 9 ก) (R^2= 0.4950, R^2= 0.2039) และไม่แตกต่างกับการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในที่มีแสง (รูปที่ 9 ข) (R^2= 0.2642) ตามลำดับ

(ก)

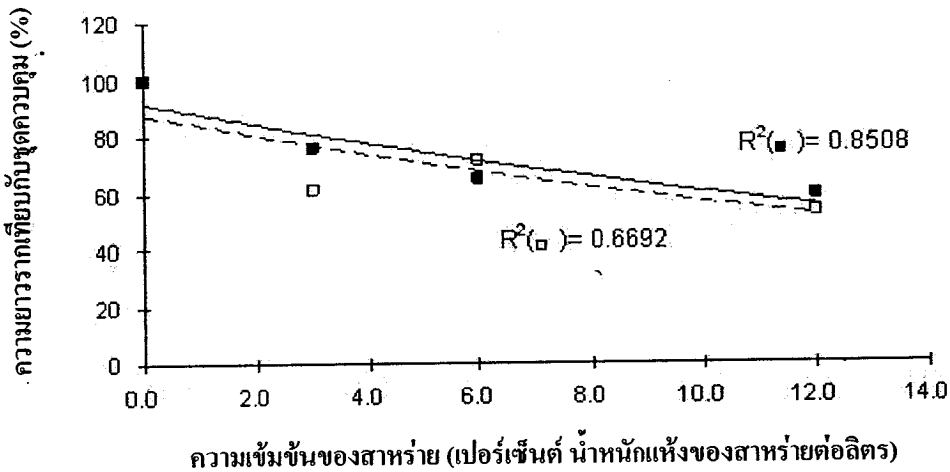


(ข)

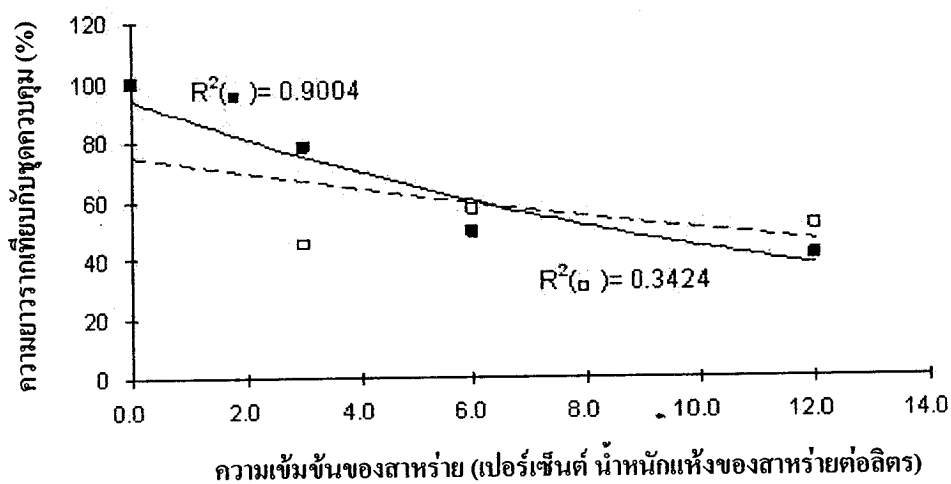


รูปที่ 8. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 เทียบกับชุดควบคุมโดยใช้อาซีโตไนไตรล์ 80% (CH_3CN 80%) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) และ 40 องศาเซลเซียส (ข) ในที่มีแสง (△) และไม่มีแสง (▲); ความยาวรากของชุดควบคุม 5.2±0.50 เซนติเมตร (n = 6)

(ก)



(ข)

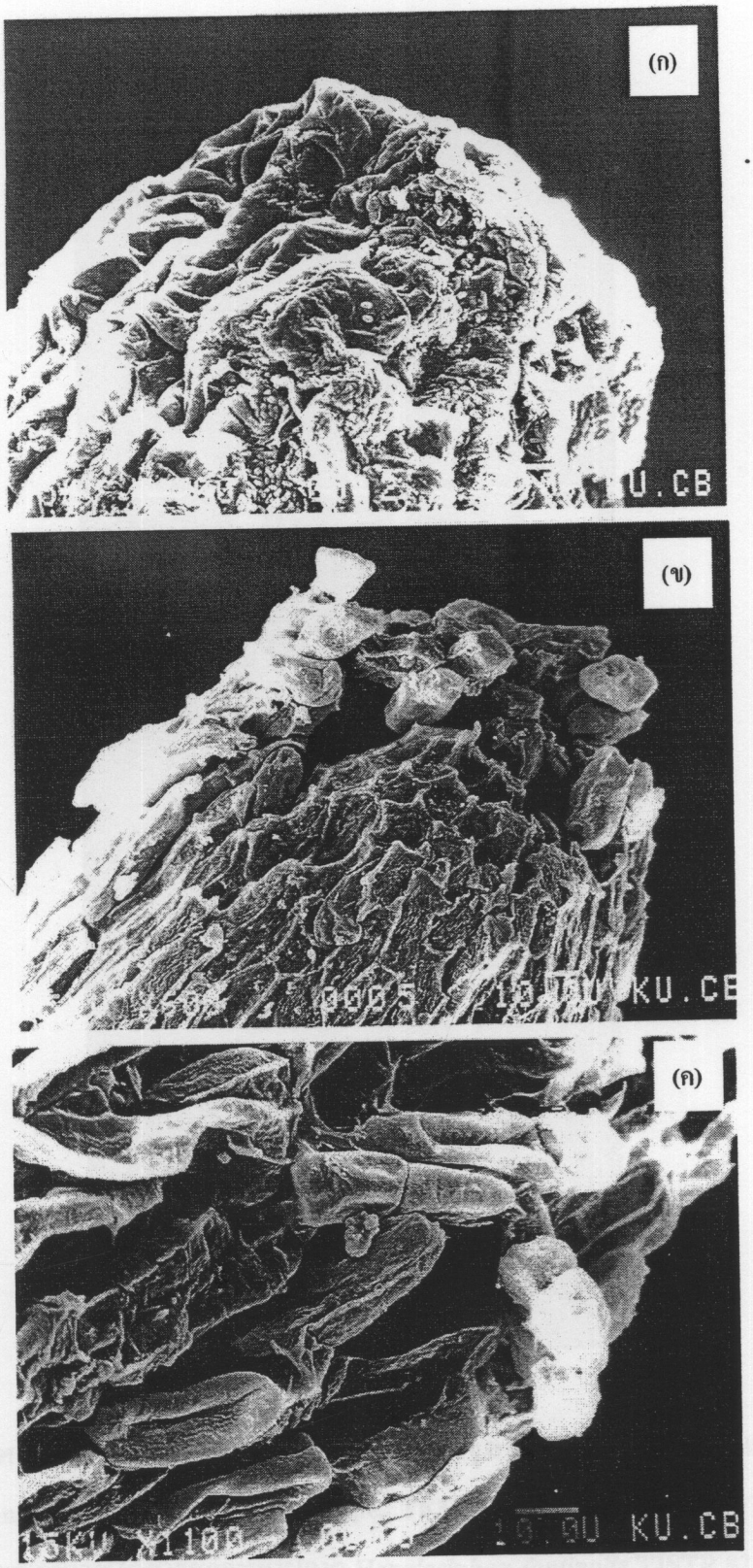


รูปที่ 9. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 เทียบกับชุดควบคุมโดยใช้เมทานอล 80% (MeOH 80%) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) และ 40 องศาเซลเซียส (ข) ในที่มีแสง (□) และไม่มีแสง (■); ความยาวรากของชุดควบคุม 5.2±0.50 เซนติเมตร (n = 6)

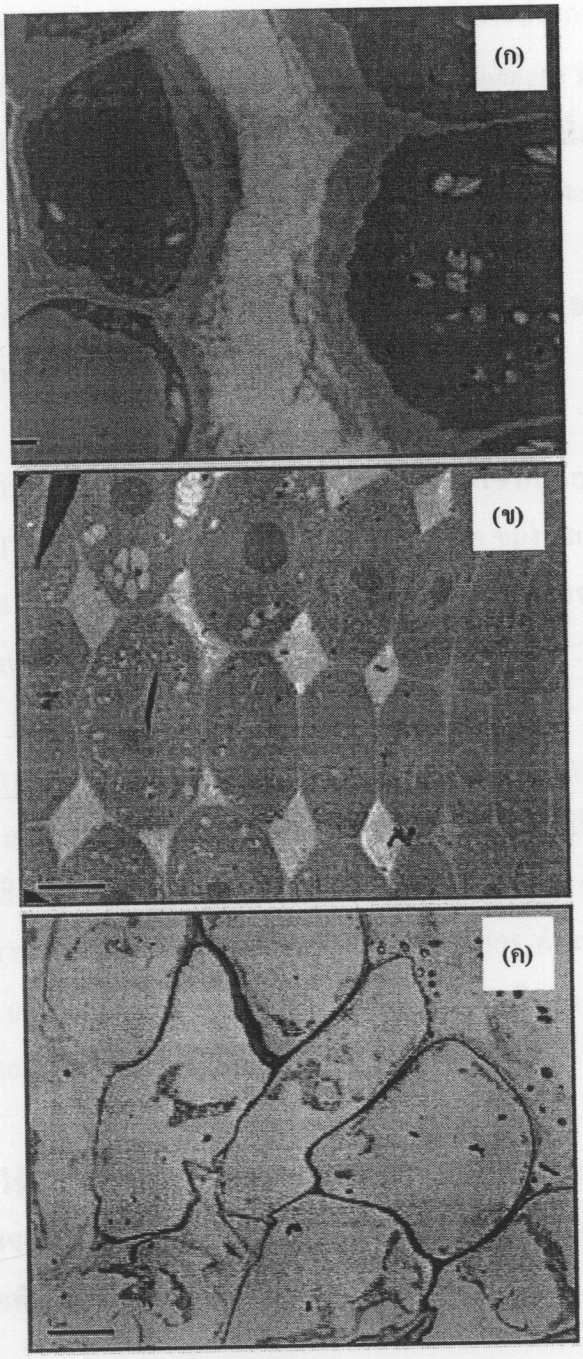
4.5 กลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของปลายรากข้าว โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ถ่ายที่ปลายรากต้นกล้าข้าวของชุดควบคุมและที่ได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 พบว่า ปลายรากของชุดควบคุม (รูปที่ 10 ก) ไม่มีอาการผิดปกติของผิวรากที่ปกคลุมอยู่ภายนอก ซึ่งแตกต่างจากปลายรากที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (รูปที่ 10 ข, ค) โดยที่ผิวของปลายรากที่เป็นสารประกอบของไขมัน เช่น แวกซ์ (wax) และคิวทิน (cutin) ถูกทำลายและหลุดออกไป ส่วนเซลล์ของปลายรากเกิดความผิดปกติขึ้น ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์มีรูปร่างบิดเบี้ยว อาจจะเกิดจากสารสกัดหยาบจากสาหร่ายมีผลกระทบต่อเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ปลายรากข้าว โดยที่สารสกัดหยาบอาจจะไปขัดขวางกระบวนการแบ่งเซลล์ (Sanevas *et al.* 2006) ทำให้ปลายรากต้นกล้าข้าวไม่เจริญเติบโตหรืออาจจะไปยับยั้งปฏิกิริยาในเซลล์ เช่น กระบวนการย่อยสลายและสร้างพลังงาน (Bogatek *et al.* 2005) อีกทั้งยับยั้งกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในระบบแสงสอง (photosystem II) (ณรงค์ และคณะ 2547)

รูปที่ 11 แสดงภาพถ่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ถ่ายปลายรากต้นกล้าข้าวของชุดควบคุม และที่ได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 พบว่า เมื่อเทียบกับปลายรากต้นกล้าข้าวของชุดควบคุม (รูปที่ 11 ก กำลังขยาย 2,500 เท่า) ปลายรากต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบเซลล์ของปลายรากแสดงอาการเหี่ยว อีกทั้งเกิดการตกตะกอนของโปรตีนภายในเซลล์เป็นสีดำ เกิดจากปลายรากที่มีลักษณะกุดสั้น มีสีคล้ำหรือสีน้ำตาล (ณัฏฐา และคณะ 2544) (รูปที่ 11 ข กำลังขยาย 2,500 เท่า) และผนังเซลล์แยกออกจากกันเนื่องจากสารประกอบไขมันของผนังเซลล์ถูกทำลาย ซึ่งอาจเกิดจากการยับยั้งปฏิกิริยาบางอย่างในเซลล์ (Bogatek *et al.* 2005) (รูปที่ 11 ค กำลังขยาย 6,000 เท่า)



รูปที่ 10. ภาพถ่ายปลายรากข้าวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM); ปลายรากข้าวของชุดควบคุม (ก) และปลายรากข้าวที่ได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (ข, ค)



รูปที่ 11. ภาพถ่ายเซลล์ปลายรากข้าวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM); ปลายรากข้าวของชุดควบคุม (ก) และปลายรากข้าวที่ได้สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 (ข, ค)

4.6 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

4.6.1 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารออกฤทธิ์กำจัดวัชพืชที่ผลิตจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (thin layer chromatography, TLC)

1) การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี

จากการแยกสารสกัดออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (preparative silicagel TLC) ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ ของ คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1 โดยจะใช้ระบบตัวทำละลาย สามารถตรวจพบแถบเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตจำนวน 2 แถบ คือ R_f= 0.50 และ R_f= 0.63

จากการตรวจหาตำแหน่งของสารโดยวิธีออโตไบโอกราฟ โดยใช้สารละลายผสมของ คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1 ซึ่งเป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสิ่งเจือปนและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบตำแหน่งของสารที่มีผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ตำแหน่งที่ค่า R_f = 0.50, R_f = 0.63 โดยที่ค่า R_f = 0.63 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ดีกว่าที่ค่า R_f= 0.50

2) การใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี ในการแยกสารออกฤทธิ์กำจัดวัชพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* ที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ออกจากสิ่งเจือปนเพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อนำสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี และ ระบบตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1) ในแต่ละแถบที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ มาทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี paper disc plate พบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อเปรียบเทียบกับ standard gentamicin พบว่าที่ค่า R_f= 0.63 เกิดโซนยับยั้ง 15.50 มิลลิเมตรมีปริมาณสาร 5.39 ไมโครกรัม (เทียบเท่า gentamicin) ต่อแผ่น ส่วนที่ค่า R_f = 0.50 เกิดโซนยับยั้ง 11.21 มิลลิเมตรมีปริมาณสาร 2.34 ไมโครกรัม (เทียบเท่า gentamicin) ต่อแผ่น ทั้งนี้

เนื่องจากที่ค่า $R_f = 0.63$ องค์ประกอบหลักของสารเป็นโครงสร้างหลักของสารออฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนที่ค่า $R_f = 0.50$ เป็นอนุพันธ์ของโครงสร้างหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงพบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่า

4.6.2 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

1) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีบางประการของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

1.1) การทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพภายหลังการแยกออกจากสิ่งเจือปน ด้วยวิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี

จากการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี ทั้ง 2 แถบ (band) มาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ ปฏิกิริยานินไฮดริน, ปฏิกิริยาไบยูเรต, การทดสอบโมลิสช์, การทดสอบแอนโทรน, การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน, การทดสอบการยับยั้งด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ทั้ง 2 แถบ ให้ผลการทดสอบเป็นลบกับ ปฏิกิริยานินไฮดรินซึ่งไม่พบกรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโนเปปไทด์หรือโปรตีน ดังนั้นเพื่อการเป็นการยืนยันว่าสรออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มีส่วนประกอบของโปรตีน จึงทำการทดสอบปฏิกิริยาไบยูเรต ผลการทดสอบให้ผลเป็นลบเช่นกัน ส่วนการทดสอบโมลิสช์ และการทดสอบแอนโทรน เป็นการทดสอบน้ำตาลทั่วๆไป ให้ผลเป็นลบ ในการทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน เพื่อหากรดไขมันชนิดอิ่มตัว และชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ก็ให้ผลเป็นลบเช่นกัน

ส่วนการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองปฏิกิริยานินไฮดริน ผลการทดลองให้ผลเป็นลบ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์โปรตีเอส แสดงว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ไม่มีโครงสร้างที่เป็นเปปไทด์สั้นๆ จึงไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรตีเอส

การทดสอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้ผลเป็นลบทั้งหมดอาจ เนื่องจากส่วนใหญ่แล้ว สาหร่ายผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพวกวงแหวนเปปไทด์ (cyclic peptide) ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ การทดสอบทางเคมีต่าง ดังกล่าวข้างต้นไม่สามารถตัดพันธะได้ จึงไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาบวก

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์กำจัดวัชพืชผลิตโดย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
ปฏิกิริยานินไฮดริน	ผลลบ
ปฏิกิริยาไบยูเรต	ผลลบ
การทดสอบโมลิสช์	ผลลบ
การทดสอบแอนโทรน	ผลลบ
การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน	ผลลบ
การทดสอบการยับยั้งด้วยเอนไซม์โปรตีเอส	ผลลบ

2) การศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (physicochemical) บางประการของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

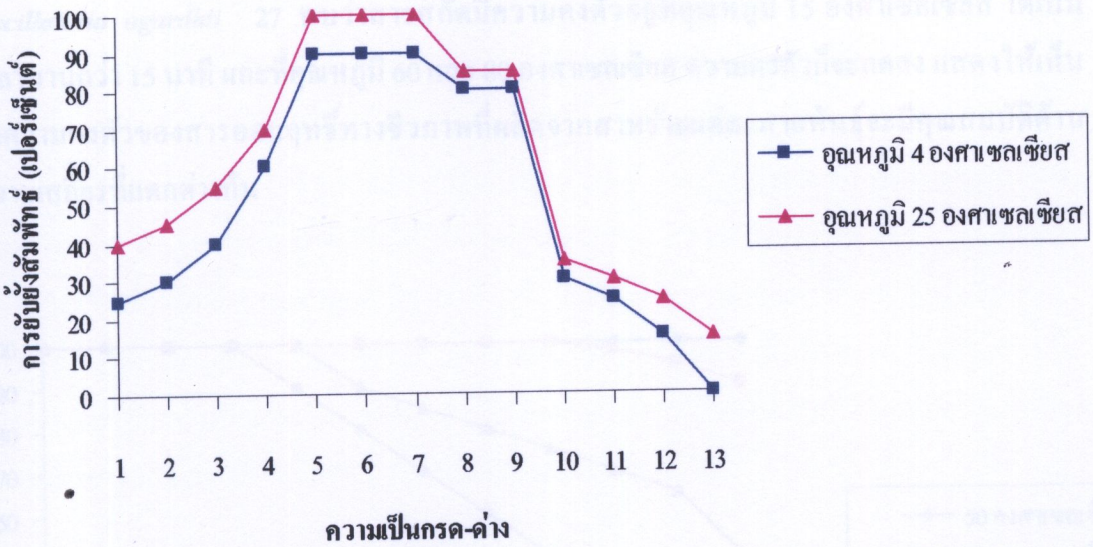
2.1) ความคงตัวของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

เมื่อนำสารสกัดหยาบมาละลายในเมทานอลแล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดมีค่าประมาณ 7 และเมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ให้เท่ากับ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 ด้วยกรดไฮโรคลอริก 2 นอร์มัล หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มัล นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งกับสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี paper disc plate

ผลการทดลอง พบว่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 7 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสัมพัทธ์เท่ากับ 100 และในช่วง 8 ถึง 9 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์คงเหลือ 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเป็นกรดตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 ลงไป และ เพิ่มความเป็นด่างตั้งแต่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9 ขึ้นไป ความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์จะลดลงโดยที่ความเป็นกรด-ด่าง 13 ความคงตัวของสารสกัดลดลงและมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์คงเหลือเพียงแค่ 15 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์คงเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 ถึง 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์คงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเป็นกรดตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 และเพิ่มความเป็นด่างตั้งแต่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9 ความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์จะลดลงทั้งคู่ โดยที่ความเป็นด่างสูงๆ คือที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์เท่ากับ 0 จะเห็นได้ว่าสารที่ผลิตได้ไม่คงตัวอย่างมากในสภาพความเป็นกรด-ด่างสูงๆ และพบว่าที่ความเป็นกรด-ด่าง 5 และ 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดจะมีความคงตัวโดยมีความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 สามารถคงตัวอยู่ได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง ที่แคบ 2 ช่วง คือ 5-7 และช่วง 8-9 โดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสความสามารถในการยับยั้งลดลงทั้ง 2 ช่วง คือเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและการที่สารสกัดมีความคงตัวในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่แคบและมี 2 ช่วง เนื่องมาจากสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่สกัดได้อาจมีสารออกฤทธิ์อยู่มากกว่า 1 ชนิด (ผลจาการแยกสารให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีการทำ TLC แล้วนำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบแถบเรืองแสง 2 แถบแสดงให้เห็นว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างน้อย 2 ชนิด) การแสดงออกของการยับยั้งกับสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เป็นผลรวมของสารออกฤทธิ์ทั้งหมดที่มี และสารออกฤทธิ์ทั้งหมดมีความเสถียรที่ความเป็นกรด-ด่าง ช่วง 5-7 และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง เพิ่มขึ้นช่วง 8-9 สารออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งเริ่มถูกทำลาย ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 5 และมากกว่า 9 สารออกฤทธิ์ทั้งหมดถูกทำลายอย่างรวดเร็ว จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน ผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่างที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูงอีกด้วย (รูปที่ 12)

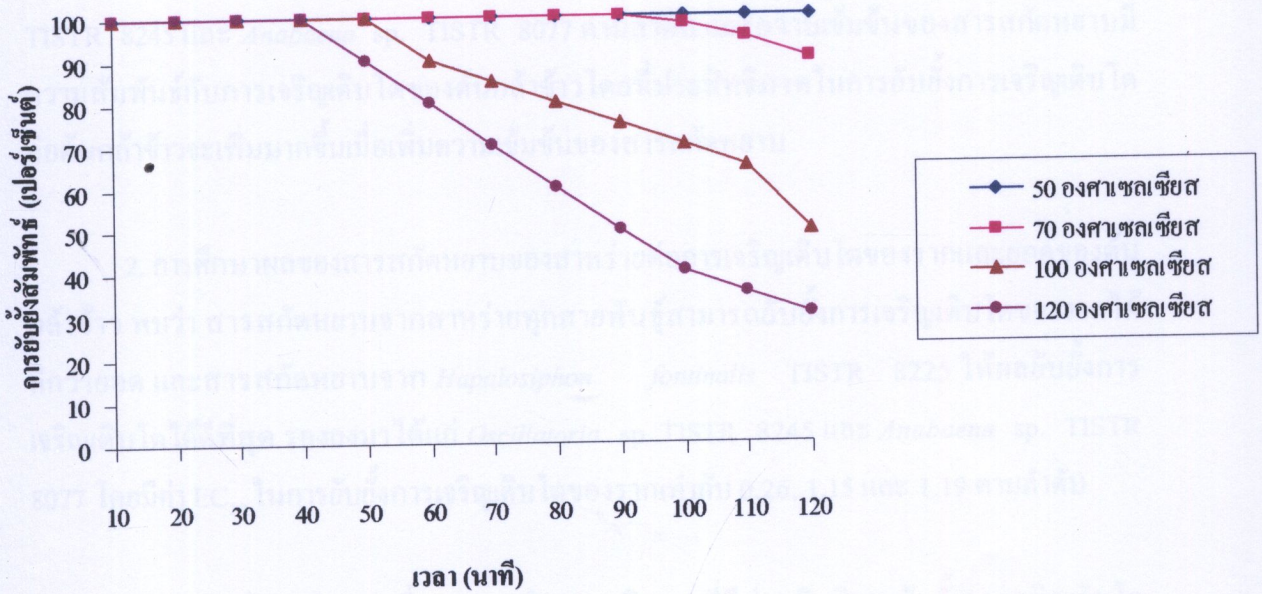


รูปที่ 12. ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ

2.2) ความคงตัวของสารสกัดที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

จากการศึกษาความคงตัวของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่อุณหภูมิ 50 70 100 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 13 พบว่าสารสกัดมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 120 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความคงตัวเป็นเวลานาน 90 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นความคงตัวของสารสกัดจะค่อยๆ ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยความคงตัวจะลดลงเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 120 นาที ส่วนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีความคงตัวเป็นเวลานานประมาณ 50 นาที จากนั้นความคงตัวจะลดลงเรื่อยๆจนเวลาผ่านไป 120 นาที ความคงตัวลดลงเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส สามารถคงตัวอยู่ได้ที่อุณหภูมินี้ 40 นาที และความคงตัวลดลงเหลือเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที

Kiviranta และ Abdel-Hameed (1994) ได้ศึกษาความคงตัวของสารสกัดจาก *Oscillatoria agardhii* 27 พบว่าสารสกัดมีความคงตัวอยู่ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลานานกว่า 15 นาที และที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส ความคงตัวก็จะลดลง แสดงให้เห็นว่าความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จะมีคุณสมบัติด้านความเสถียรที่แตกต่างกัน



รูปที่ 13. ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

5. สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวโดยใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Oscillatoria* sp.TISTR 8245 พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวได้ดี โดยที่ สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 และ *Anabaena* sp. TISTR 8077 ตามลำดับ และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวโดยที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อต้นกล้าข้าวจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ

2. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบของสาหร่ายต่อการเจริญเติบโตของรากและยอดของต้นกล้าข้าว พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากได้ดีกว่ายอด และสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ *Oscillatoria* sp. TISTR 8245 และ *Anabaena* sp. TISTR 8077 โดยมีค่า EC_{50} ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากเท่ากับ 0.26, 1.15 และ 1.19 ตามลำดับ

3. ผลการศึกษาช่วงอายุที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าว พบว่า สารสกัดหยาบของสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่อายุ 21 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าข้าวสูงที่สุด และกระบวนการที่เหมาะสมในการสกัดสารจากสาหร่าย โดยใช้เมทานอล 80 % สกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีแสง จะได้สารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวดีที่สุด

4. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) และแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) พบว่า ผิวของปลายรากข้าวถูกทำลายและเซลของปลายรากมีลักษณะผิดปกติและหลุดออกจากกันและเกิดการตกตะกอนของโปรตีนภายในเซลล์ เมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวได้ดี

5. การศึกษาความคงตัวของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 120 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความคงตัวเป็นเวลานาน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีความคงตัวเป็นเวลานานประมาณ 30 นาที และมีความคงตัวที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 7 ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. เมื่อนำสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 มาแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโตกราฟฟี เพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ระบบตัวทำลายที่เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือ คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1 และตำแหน่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวอยู่ที่ R_f= 0.50 และ R_f= 0.63 เมื่อนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกออกจากสิ่งเจือปน แล้วไปทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี ให้ผลลบกับปฏิกิริยานินไฮดริน, ปฏิกิริยาไบยูเรต, การทดสอบโมลิสช์, การทดสอบแอนโทรน, การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน รวมทั้งการทดสอบการยับยั้งด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จึงคาดว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวที่ผลิตขึ้นจะมีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่หรือมีความซับซ้อน

6. ข้อเสนอแนะ

เมื่อนำผลการวิจัยในครั้งนี้ไปสู่แนวทางการใช้ประโยชน์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกำจัดวัชพืชจากสาหร่าย *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ในห้องปฏิบัติการ ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. กระบวนการผลิตและสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกำจัดวัชพืชที่เหมาะสม
2. สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์
3. สูตรการผลิตผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช (product formulation) จากสารสกัดหยาบ
4. ประเมินความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ของการผลิตในเชิงพาณิชย์

7. เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐา เสนีวาส, ศรีสม สุรวัฒนานนท์, กมลพรรณ นามวงศ์พรหม และ วิไล สันติโสภาศรี. 2544. ผลของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Scytonema* sp. และ *Hapalosiphon* sp. ที่มีต่อการงอกของพืชบางชนิด*ใน*เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: 152-159.

อินทิรา ขุดแก้ว, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ ลิลลี่ กาวีตั๊ะ. 2550. ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันกระบวนการแอมโมเนียเอสซิมิเลชัน และรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของไมยราบยักษ์ (*Mimosa pigra* L.) *ใน* เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 : 53-60.

Al-Lay, J.K., Poon and G.A. Codd. 1988. Isolation and purification of peptide and alkaloid toxin from *Anabaena flos-aquae* using high performance thin-layer chromatography. *J. Microbiol.* Methods. 7 : 251-258

Antarikanonda P., Berndt.H. and Mayer F. 1980. Hydrogen a new inhibitor of photosynthesis in the blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena* sp. TA. 1. *J .Arch. Microbiol.* 145:1-10.

Kuet A.C.L. and Seng l. 2004. Solid phase extraction cleanup for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Malaysian Journal of Chemistry.* 6(1) : 39-47.

Bogatek R., Gniazdowska A., Stepien J. and Kupidlowaka E. 2005. Sunflower allelochelochemicals mode of action in germinating Mustard seeds. Proceeings and selecwed paper of the fourth world congress on allelpathy. NSW, Australia. 365-369.

Gleason F.K. and Case D.E. 1986. Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on angiosperms. *Pl. Physiol.* 80:834-847.

Gleason F.K., Porwoll J., Flippen- Anderson J.L. and George C. 1986. X-ray structure determination of the naturally occurring isomer of cyanobacterin. *J. Org. Chem.* 51:1615-1616.

Haig T., Pratley J., An M. and Hildebrand S. 2005. Using allelopathy to search for new natural herbicides from plants. Proceeding of the 4th World Congress on Allelopathy, Australia. 565-568.

Ichimura, T. 1978. Media for blue- green algae. Toxic *Microcystis* CRC Press, Boca Raton. 12-28.

Lehmann-Kirk U., Bader K.P., Schmid G.H. and Radunz A. 1979. Inhibition ofphotosynthetic electron transport in tobacco chloroplasts and thylakoids of the blue green alga *Oscillatoria chalybea* by an antiserum to synthetic zeaxanthin. *PubMed.* 34(12):1218-1221.

Mason C.P., Edwards K.R., Carlson R.E., Pignatello J., Gleason F.K. and Wood J.M. 1982. Isolation of chlorine-containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni. Science* 215:400-402.

Pfiugmacher S., Jung K., Lundvall L., Neumann S. and Peuthert A.. 2006. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (Medicago sativa) and induction of oxidation stress. *Environ Tixicol Chem.* 25(9):2381-2387.

Poon, G.K, I.M. Priestley, S.M. Hunt, J.K. Farwell and G.A. Codd. 1987. Purification procedure For peptide toxin from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* involving hight – performance thin layer chromatography. *J. Chroma.* 387 : 551-558.

Rice, E. L. 1974. Allelopathy. Academic Press, Inc., New York.353p.

Sanevas N., Sunohara Y. and Matsumoto H. 2006. Crude extract of the cyanobcterium, *Hapalosiphon* sp., causes a cessation of root elongation and cell divition in several plant spiecies.*Weed Biology and Management* 6:25-29.

Schmid G.H. and Lehmann-Kirk U. 1977. Photooxidation reaction of diphenylcarbazide and their DCMU-sensitivity in thylakoids of the blue-green alga *Oscillatoria chalybea. Achives of Microbiology* 15 (3): 265-269.

Watanabe, M.F and Nakagawa M. 1998. Purification of freshwater picoplanktonic cyanobacteria by pour-plating in ultra-low – gelling-temperature agarose. *Phycol. Res.* 46 : 71-78.