สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดย *Penicillium* และ *Trichoderma*

นันท์นภัส สรรพกิจจานนท์

ลัลธริมา พรมมิ

วพ.
264177
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83987
วัน,เดือน,ปี.....23 ก.ย. 2551

b.....11983231.....
i.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงงานพิเศษ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Control of aflatoxin producing fungi by *Penicillium* and *Trichoderma*

Nannapat Sappakitjanon

Luntharima Prommi

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Biotechnology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษเรื่อง	การควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดย *Penicillium* และ *Trichoderma*	
นักศึกษา	นันท์นภัส สรรพกิจจานนท์	รหัส 47050134
	ลัลธริมา พรมมิ	รหัส 47050152
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์	

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ	รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์	
กรรมการ	รศ. นิพนธ์ วิสารทานนท์	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษเรื่อง การควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดย *Penicillium* และ *Trichoderma*

นักศึกษา นันท์นภัส สรรพกิจจานนท์ รหัส 47050134

ลัลธริมา พรมมิ รหัส 47050152

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา พ.ศ. 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Penicillium* 2 ไอโซเลท (480512 I08 (1), 480519 I06 (3)) และ *Trichoderma* 2 ไอโซเลท (KMC 5, SRS 4) เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ในการควบคุมการเจริญโดยชีววิธีต่อเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* IMI 102566 ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* จากการทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. Parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar พบว่า เชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ โดยที่ *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้สูงที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 70.32 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ทั้ง 4 ไอโซเลทในอาหารเหลว 3 ชนิด ได้แก่ malt extract broth, potato dextrose broth และ yeast extract sucrose broth ที่สภาวะนิ่งและเขย่า จากนั้นจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* พบว่า สภาวะ ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง และสายพันธุ์ของเชื้อรามีผลต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยที่ *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) เลี้ยงในอาหาร yeast extract sucrose broth ที่สภาวะนิ่ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Control of aflatoxin producing fungi by *Penicillium* and *Trichoderma*
Student	Miss Nannapat Sappakitjanon ID 47050134
	Miss Luntharima Prommi ID 47050152
Program	Biotechnology
Department	Applied Biology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat

ABSTRACT

Two isolates of *Penicillium* (480512 I08 (1) and 480519 I06 (3)) and two isolates of *Trichoderma* (KMC 5 and SRS 4) were antagonisms which were used as biocontrol agent for aflatoxin producing fungus, *Aspergillus parasiticus* IMI 102566. Antibiotic production by isolates of *Penicillium* and *Trichoderma* for the control of *A. parasiticus* were studied in potato dextrose agar (PDA). It was shown that four isolates of *Penicillium* and *Trichoderma* inhibited the growth of *A. parasiticus*. *Penicillium* 480519 I06 (3) showed the highest inhibition of 72.32%. The production of antibiotics by *Penicillium* and *Trichoderma* were further studied in three different media such as malt extract broth (MEB), potato dextrose broth (PDB) and yeast extract sucrose broth (YES broth), at static and shake flask conditions. Culture filtrates of these isolates were subsequently tested against *A. parasiticus*. The filtrates of all four isolates produced varying degrees of inhibition against *A. parasiticus*. However, *Penicillium* 480519 I06 (3) which was cultured in YES broth at static condition was the most effective against *A. parasiticus*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาของ รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ที่ได้สละเวลารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ ซึ่งได้ให้คำแนะนำถึงประเด็นต่างๆ ในงานวิจัย และชี้แนวทางในการแก้ปัญหา การค้นคว้าหาข้อมูลเพิ่มเติม อันเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย รวมทั้งการแก้ไขงานให้สมบูรณ์เป็นอย่างยิ่ง มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และ รศ. นิพนธ์ วิสารทานนท์ ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าเป็นกรรมการสอบโครงงานพิเศษ พร้อมทั้งให้คำแนะนำและแก้ไขงานให้สมบูรณ์เป็นอย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณ ผศ. สิทธิชัย เจริญเศรษศิลป์ ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ผลทางสถิติและแก้ไขงานให้สมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ดร. เยาวพา สุวัตถิ ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ของทางองค์การเภสัชกรรม เพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

สุดท้าย หากโครงงานพิเศษฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการศึกษาและเป็นแหล่งค้น-คว้าหาข้อมูลเพิ่มเติมต่อผู้สนใจในงานวิจัยนี้ นับเป็นความยินดีอย่างยิ่งที่ได้ทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ขึ้น และหากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้เขียนขออภัยไว้ ณ ที่นี้

นันท์นภัส สรรพกิจจานนท์

ลัลธริมา พรมมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 อะฟลาทอกซิน	4
2.1.1 ชนิดและคุณสมบัติทั่วไปของอะฟลาทอกซิน	4
2.1.2 การก่อโรคของอะฟลาทอกซิน	5
2.1.3 การป้องกันการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน	6
2.2 *Aspergillus*	6
2.2.1 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน	8
2.2.2 ประโยชน์และโทษของ *Aspergillus*	8
2.3 *Penicillium*	9
2.3.1 ชนิดของเชื้อรา *Penicillium*	9
2.3.2 ประโยชน์และโทษของ *Penicillium*	10
2.4 *Trichoderma*	11
2.5 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช	12
2.5.1 การแข่งขัน (competition)	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.2 การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)	13
2.5.3 การเป็นปรสิต (parasitism)	14
2.5.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance)	14
2.6 วิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	14
2.6.1 บริเวณผิวราก	14
2.6.2 บริเวณผิวพืชอยู่เหนือดิน	15
2.6.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการนำเชื้อปฏิปักษ์มาใช้ในทางการค้า	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	17
3.1 สายพันธุ์ของเชื้อรา	17
3.2 สารเคมี	17
3.3 อุปกรณ์	17
3.4 วิธีการทดลอง	18
3.4.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*	18
3.4.2 การเตรียม mycelial disc ของเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma*	18
3.4.3 การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*	18
3.4.4 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*	19
3.4.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	22
4.1 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*	22
4.2 ผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*	24
4.3 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*	27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	62
5.1 การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* 63

5.3 ข้อเสนอแนะ 65

เอกสารอ้างอิง 66

ภาคผนวก ก 70

ภาคผนวก ข 71

ภาคผนวก ค 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

2.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะฟลาทอกซิน B_1, B_2, G_1 และ G_2 5

2.2 conidiophore (phialophore) ของ *Aspergillus* 8

2.3 ลักษณะ penicillus ของ *Penicillium* 11

2.4 โครงสร้างของ *Trichoderma viride* 12

4.1 conidiophore ของ *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) 22

4.2 conidiophore ของ *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) 23

4.3 conidiophore ของ *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 23

4.4 conidiophore ของ *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 24

4.5 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งโดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* 25

4.6 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง 28

4.7 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง 29

4.8 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง 30

4.9 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า 31

4.10 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า 32

4.11 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า 33

4.12 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง 38

4.13 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง 39

4.14 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง 40

4.15 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า 41

4.16 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า 42

4.17 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.18 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง 44
4.19 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง 45
4.20 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า 46
4.21 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง 47
4.22 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง 48
4.23 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง 49
4.24 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง 50
4.25 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า 51
4.26 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า 52
4.27 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า 53
4.28 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า 54
4.29 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า 55
4.30 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.31 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง 57

4.32 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง 58

4.33 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า 59

4.34 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า 60

4.35 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

4.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* 26

4.2 ผลการสร้างสารยับยั้งของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ต่อการเจริญ *A. parasiticus* 26

4.3 การวิเคราะห์การแปรปรวนการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* 34

4.4 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดย *Penicillium* และ *Trichoderma* 35

ตารางผนวก ค. 1 72

ตารางผนวก ค. 2 73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นสารก่อมะเร็งในตับ ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพทั้งในคนและสัตว์ โดยสร้างขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* เชื้อราสายพันธุ์เหล่านี้เจริญได้ดีในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสมบัติเป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์และพืช อะฟลาทอกซินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทางชีวภาพหรือกระบวนการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของเชื้อรา ทำให้เชื้อราสร้างสารพิษตามธรรมชาติ สารพิษอะฟลาทอกซินที่พบได้แก่ B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2, $B2_a$, $G2_a$, P_1, B_3 และ Q_1 แต่ที่สำคัญมี 4 ชนิดคือ B_1, B_2, G_1 และ G_2 โดยอะฟลาทอกซินชนิด B_1 และอะฟลาทอกซินชนิด B_2 เรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่น 256 ถึง 365 นาโนเมตร และอะฟลาทอกซินชนิด G_1 และ G_2 ซึ่งเรืองแสงสีเขียวภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นช่วงเดียวกัน สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้อะฟลาทอกซินเกิดได้ดี คือ ภายใต้ความชื้นร้อยละ 18 – 30 อุณหภูมิ 43 – 63 องศาเซลเซียส และวัตถุดิบทางการเกษตรหรือเมล็ดพืชที่เสื่อมสภาพ แตกหัก หรือมีแผลเสียหายจากการทำลายของแมลง นก หรือหนู ซึ่งจัดเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ภูมิอากาศแบบร้อนชื้นทำให้เชื้อราเจริญและสามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี โดยสารพิษจะอยู่ภายในเมล็ดพืชหรือวัตถุดิบเหล่านั้น และไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ประเทศไทยอยู่ในภูมิอากาศดังกล่าวจึงมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดสารพิษอะฟลาทอกซินกับผลิตผลทางการเกษตรซึ่งเป็นอาหารของคนและสัตว์ด้วย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นอย่างมาก ซึ่งการวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งถึงการควบคุมและกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน (กัญญา และคณะ, 2547)

ปัจจุบันมีการการควบคุมเชื้อราก่อโรคโดยการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) ซึ่งเป็นการใช้สารชีวภาพหรือสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับพืช เพื่อลดปัญหาอันตรายจากการใช้สารเคมีทางการเกษตร เพราะการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี เป็นวิธีที่ยอมรับว่าใช้ได้ผลดีในหลายประเทศ ปัจจุบันได้มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์เป็น biocontrol agent ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (อภิษฐา, 2548) คือ

กลุ่มที่ 1 คือ Fungal Biocontrol Agent เช่น *Trichoderma* sp.และ *Chaetomium* sp.

กลุ่มที่ 2 คือ Bacterial Biocontrol Agent เช่น *Bacillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 คือ Herbal Biocontrol Agent เช่น สะเดา ตะไคร้หอม มะกรูด เป็นต้น

สำหรับเชื้อราที่นำมาใช้ในการควบคุมโดยชีววิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือเชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma* ซึ่งเป็นเชื้อราจำพวก saprophyte ที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน และเป็นราที่เจริญได้รวดเร็ว บาง isolate สามารถนำมาใช้ควบคุม ทำลายหรือยับยั้งเชื้อราในดิน ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชที่ก่อให้เกิดอาการโรครากเน่าโคนเน่าทั้งในพืชผัก พืชไร่ และไม้ผล เช่น *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp. และ *Fusarium* sp. เชื้อราในดินสาเหตุโรคพืชเหล่านี้เมื่อเข้าทำลายระบบรากพืชจะทำให้พืชแสดงอาการรากเน่าและโคนเน่า ส่วนต้นที่แสดงอาการรุนแรงจะเหี่ยวแห้งตายไปในที่สุด (จิระเดช, 2550)

นอกจากเชื้อรา *Trichoderma* ยังมีเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษ คือ *Penicillium* เป็นราที่พบได้ทั่วไปและจัดเป็นรา contaminant ในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากสปอร์สามารถแพร่กระจายในอากาศได้ดี จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนกับเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังสามารถทำลายเมล็ดพืชและผลไม้ต่างๆ หลังการเก็บเกี่ยว เช่น ส้ม แอปเปิ้ล โดยเฉพาะในวันที่มีอากาศร้อน และพบว่า *Penicillium* บางสายพันธุ์ เช่น *P. notatum* และ *P. chrysogenum* สร้างสารปฏิชีวนะเพนนิซิลินยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (กัญญา และคณะ, 2547)

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Penicillium* spp. และ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของการสร้างสารยับยั้งเชื้อราจากเชื้อ *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) และ 480519 I06 (3) และเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 และ SRS 4 ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในอาหาร PDA (potato dextrose agar)

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) และ 480519 I06 (3) และเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 และ SRS 4 ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

1.2.3 เพื่อศึกษาหาชนิดของอาหารและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

การศึกษาถึงการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการใช้เชื้อรา 2 ชนิด คือ *Penicillium* และ *Trichoderma* ทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในระดับห้องปฏิบัติการ จากนั้นจึงศึกษาหาชนิดของอาหารที่และสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

1.4.2 ได้จุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

1.4.3 ลดการใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อราที่สร้างพิษ

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.5.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*

1.5.2 การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

1.5.3 การศึกษาหาชนิดของอาหารและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 อะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซิน เป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. พบครั้งแรกในปี 1960 เนื่องจากไก่งวงในเมืองนอร์โฟล์ค (Norfolf) ประเทศอังกฤษ กว่า 100,000 ตัว ตายด้วยโรคตับในเวลาเพียงไม่กี่เดือน (Carlile และคณะ, 2001) นักวิทยาศาสตร์ตั้งชื่อโรคนี้ว่า Turkey X Disease จากการศึกษาพบว่า เกิดจากการปนเปื้อนของถั่วลิสงที่นำมาเป็นอาหารของไก่งวง (Moore-Landecker, 1996) เมื่อตรวจสอบถั่วลิสงที่มีการปนเปื้อนจึงพบเส้นใยรา และเมื่อนำมาทดสอบโดย Thin layer chromatography พบสารที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลายชนิด โดยเชื้อราชนิดนั้นคือ *A. flavus* (Smith และ Moss, 1985)

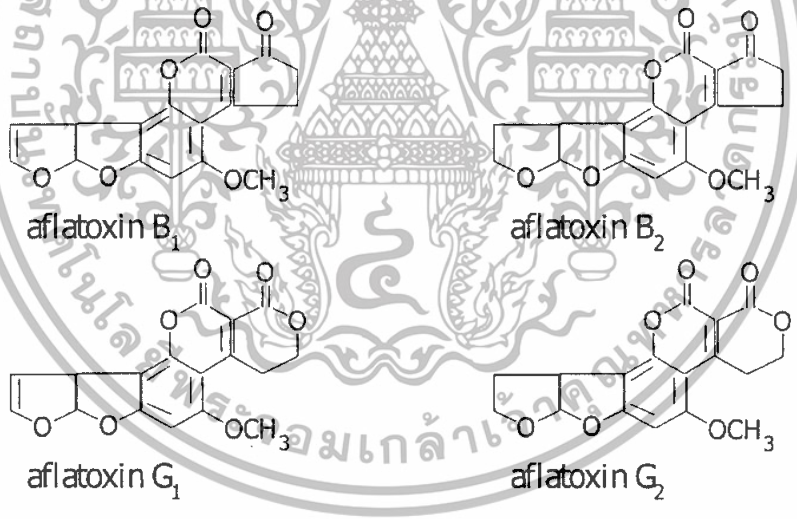
นอกจาก *A. flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 แล้ว ยังมีเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ *A. parasiticus* สร้างอะฟลาทอกซิน B_1, B_2, G_1 และ G_2 (Kurtzman และคณะ, 1987), *A. nomius* (แยกได้จากดินในประเทศไทย), *A. bombycis* และ *A. tamari* สร้างอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 (Wilson และ Payne, 1994) อะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นมีหลายชนิดได้แก่ ชนิด B_1, B_2, G_1 และ G_2 จากการศึกษาสมบัติความรุนแรงของสารพิษพบว่า ความรุนแรงเรียงลำดับจากมากไปน้อยเริ่มจาก B_1, G_1 และ B_2, G_2 ตามลำดับ ซึ่งสารพิษเหล่านี้ พบกระจายทั่วไปในประเทศแถบเขตร้อน และพบว่าถั่วลิสง ข้าวโพด และธัญพืช เป็นวัตถุดิบที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน รองลงมาได้แก่ ผลิตผลการเกษตรกลุ่มอื่นๆ เช่น พริก เครื่องเทศ เป็นต้น (วิเชียร, 2548)

2.1.1 ชนิดและคุณสมบัติทั่วไปของอะฟลาทอกซิน (กัญญา และคณะ, 2547)

อะฟลาทอกซินมีทั้งหมด 11 ชนิด คือ B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2, $B2_a$, $G2_a$, P_1, B_3 และ Q_1 ที่สำคัญมี 4 ชนิดคือ B_1, B_2, G_1 และ G_2 (รูปที่ 2.1) ทุกชนิดประกอบด้วย coumarin structure เป็นนิวเคลียสด้านหนึ่งต่อกับ bifuran ring อีกด้านจะต่อกับ pentanone ring (ถ้าเป็นอะฟลาทอกซิน B) หรือ 6 member lactone ring อะฟลาทอกซิน B_2 และ G_2 เป็น dihydroderivative ของอะฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 ตามลำดับ อะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นสีน้ำเงินช่วงความยาวคลื่น 256 ถึง 365 นาโนเมตร ส่วนอะฟลาทอกซิน G_1 และ G_2 เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นสีเขียว ในช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน อะฟลาทอก-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิน B_1 มีพิษรุนแรงที่สุด และพบได้ในปริมาณสูงกว่าชนิดอื่น ส่วนอะฟลาทอกซิน M_1 ซึ่งพบในน้ำนม และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนม เช่น โยเกิร์ตและเนยแข็ง เป็นต้น มีความเป็นพิษน้อยกว่าอะฟลาทอกซิน B_1 แต่มีรายงานว่า สามารถถ่ายทอดจากน้ำนมแม่สู่ลูกได้ (Moore-Landecker, 1996) อะฟลาทอกซินมีสมบัติละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซิน อะซีโตน เอทานอล และเมทานอล แต่ไม่ละลายใน เฮกเซน อีเทอร์ และปิโตรเลียมอีเทอร์ มีความทนทานต่อความร้อนสูงถึง 260 องศาเซลเซียส ดังนั้นอะฟลาทอกซินจึงไม่ถูกทำลายหรือเสื่อมสลายจากกรรมวิธีการหุงต้มทั่วๆ ไป เช่น ต้ม อบ หรือนึ่ง สารเคมีบางชนิดสามารถลดความเป็นพิษหรือทำลายพิษของอะฟลาทอกซินได้บ้าง เช่น แอมโมเนีย ด่างแก่ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะทำให้โครงสร้างของอะฟลาทอกซินเปลี่ยนแปลงไปในสภาวะด่าง แต่สามารถกลับสู่โครงสร้างเดิมได้ในสภาวะกรดหรือกลาง ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้สภาวะทางกายภาพหรือทางเคมีทำลายอะฟลาทอกซินให้หมดได้ แต่อะฟลาทอกซินจะเสื่อมสลายได้ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต แสงแดด และรังสีแกมมา



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะฟลาทอกซิน B_1, B_2, G_1 และ G_2 (กัญญา และคณะ, 2547)

2.1.2 การก่อโรคของอะฟลาทอกซิน

การก่อโรคของอะฟลาทอกซินในคนยังไม่มีการยืนยันแน่ชัด แต่จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง เช่น หนูขาว หนูตะเภา ในสัตว์เลี้ยง เช่น ลูกเป็ด กระต่าย หมู แพะ แกะ สุนัข วัว ควาย โดยให้สัตว์เหล่านี้กินอาหารที่ผสมอะฟลาทอกซินเป็นประจำ หลังจากเริ่มกินระยะหนึ่ง (อาจเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์หรือปี) สัตว์จะเกิดอาการต่างๆ เช่น เบื่ออาหาร ขาไม่มีกำลัง ปีกตก คอพับ น้ำหนักลด เจริญเติบโตช้า มีจำนวนลูกลดลง และหากสัตว์ได้รับสารพิษในปริมาณที่มากพอ จะทำให้เกิดสะสมขึ้นที่ตับ และล้มตายลง อาการดังกล่าวจะแตกต่างกันตามขนาดและชนิดของสัตว์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ได้รับและอายุของสัตว์อีกด้วย สัตว์ที่มีอายุน้อยจะมีความไวต่อสารพิษได้สูง (กัญญา และคณะ, 2547)

2.1.3 การป้องกันการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน

การป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินสามารถทำได้ทั้งการควบคุมทางกายภาพ ทางเคมี หรือการใช้จุลินทรีย์ หากเป็นพืชผลทางการเกษตร เช่น ถั่วลิสง อาจใช้การควบคุมทางกายภาพโดยการเก็บเกี่ยวต้องระมัดระวังอย่าให้ฝักแตก รีบตากให้แห้งหลังจากเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษาถั่วที่แห้งสนิทไว้ที่สะอาดมีอากาศถ่ายเทได้ดี ไม่มีความชื้น หรืออาจใช้สารเคมีเคลือบเมล็ดป้องกันเชื้อรา เช่น แก๊สแอมโมเนีย กรดซอร์บิก กรดเบนโซอิก เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการทำลายสารพิษได้ เช่น *Flavobacterium aurantiagum* จำนวน $2.0x10^{13}$ เซลล์ สามารถทำลายอะฟลาทอกซิน B_1 ปริมาณ 600-700 พีพีบี ในเวลา 3 ชั่วโมง โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะฟลาทอกซิน ทำให้พิษลดลง ในทำนองเดียวกัน *Bacillus acidophilus* และยีสต์ก็สามารถทำลายอะฟลาทอกซินได้เช่นเดียวกัน สำหรับการหลีกเลี่ยงทำได้โดยการไม่รับประทานอาหาร ที่สงสัยหรือเห็นว่ามีเชื้อรา หรือได้กลิ่นเชื้อรา หรืออาหารที่เก็บไว้นานเกินไป เลี่ยงถั่วลิสงป่นที่จำหน่ายในท้องตลาด ควรเลือกถั่วที่มีลักษณะอ้วน สะอาด ไม่มีจุดดำ มาคั่วป่นเองเพื่อรับประทานก็น่าจะปลอดภัยที่สุด (กัญญา และคณะ, 2547; อนงค์, 2546)

2.2 *Aspergillus* (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

เชื้อราสกุล *Aspergillus* จัดอยู่ใน

Division Eumycota

Subdivision Ascomycotina

Class Plectomycetes

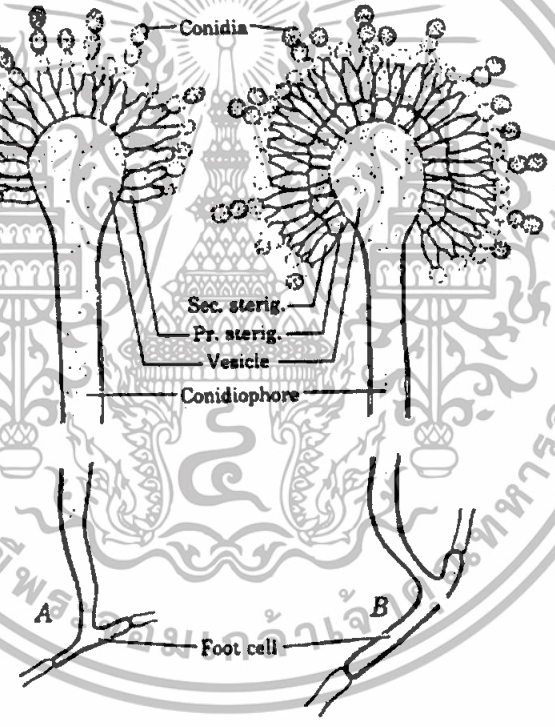
Oder Eurotiales

Family Eurotiaceae

Genus *Aspergillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus มีเส้นใย (hypha) ที่แตกแขนงและมีผนังกั้น แต่ละส่วนที่กั้นแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน conidiophore เกิดจาก foot cell และ conidiophore อาจมีผนังกั้น (septum) หรือไม่มีก็ได้ ที่ส่วนปลายของ conidiophore จะโป่งออกเป็น vesicle และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็น sterigma ซึ่งอาจมีชั้นเดียว หรือสองชั้นก็ได้ conidia สร้างขึ้นภายใน sterigma และ conidia ที่สร้างขึ้นภายหลังจะดัน conidia อันแรกๆ ออกมาและยังติดต่อกันอยู่จึงเกิดเป็นสายของ conidia นอกจากนี้ conidia ยังมีสีต่างๆ กัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิดส่วนใหญ่มีสีดำ น้ำตาล และเขียว สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง และ/หรือที่ 37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส ลักษณะของ *Aspergillus* แสดงให้เห็นดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 conidiophore (phialophore) ของ *Aspergillus*

(A) แบบที่บน vesicle ให้กำเนิด phialide (secondary sterigma) โดยไม่มี metula (primary sterigma) ; (B) แบบที่บน vesicle พบทั้ง metula และ phialide (ศิรประภา และคณะ, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

A. flavus เป็นเชื้อราชนิดแรกที่พบว่าสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ดังนั้นเชื้อของสารพิษชนิดนี้จึงได้มาจากชื่อย่อของเชื้อราชนิดนี้ ต่อมาจึงพบว่าเชื้อราชนิดอื่นก็สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้เช่นเดียวกัน เช่น *A. parasiticus* เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นราปนเปื้อนที่สามารถพบได้ทุกแห่งในธรรมชาติ เจริญได้เร็วบนสารอินทรีย์ โดยเฉพาะที่มีความชื้น เช่น ถั่วลิสงเม็ด หรือถั่วป่น ข้าว ข้าวโพด เม็ดละหุ่ง สาคู ถั่วเหลือง เป็นต้น เชื้อราสามารถเจริญภายใน 3-5 วัน โคโลนีมีสีเขียวอมเหลือง เมื่อแก่สีเขียวจะเข้มขึ้น เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเส้นใยสีขาว มี conidiophore ตรงปลายเป็น vesicle ต่อด้วยก้านที่เป็นแท่งรอบ sterigma ปลายยอดมีสปอร์รูปร่างกลมเรียงเป็นแถวยาวขึ้นไป เมื่อสปอร์แก่เต็มที่จะปลิวไปตามธรรมชาติ จึงยากแก่การป้องกันไม่ให้พืชผลหรืออาหารปนเปื้อนราดังกล่าว (กัญญา และคณะ, 2547)

2.2.2 ประโยชน์และโทษของ *Aspergillus*

เชื้อรา *Aspergillus* sp. มีบทบาทสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและการผลิตสารเคมี ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ *A. niger* หรือ *A. wetii* ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริกและกลูโคนิก นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนส (pectinase) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ เชื้อรา *A. oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์ไดเอสเตอร์เรส (diesterase) สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรัป เชื้อรา *A. niger* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส (protease) และเอนไซม์อะไมเลส (amylase) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เป็นต้น *Aspergillus* หลายชนิดทำให้อาหารเป็นพิษ โดยเฉพาะ *A. flavus* เมื่อเจริญในอาหารพวกถั่วต่างๆ จะสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งของคนและสัตว์ เชื้อรา *Aspergillus* หลายชนิดเป็น facultative parasite ของคนและสัตว์ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค aspergillosis ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรง มีอาการโรคใกล้เคียงกับวัณโรค เชื้อราที่เกี่ยวข้องได้แก่ *A. fumigatus* และ *A. flavus* เป็นต้น (ณัฐลดา และคณะ, 2548; ศิรประภา และคณะ, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 *Penicillium* (กัญญา และคณะ, 2547)

เชื้อรา *Penicillium* จัดอยู่ใน

Phylum Deuteromycota

Classs Eurotiomycetes

Order Moniliales

Family Moniliaceae

Genus *Penicillium*

Penicillium เป็นราที่พบได้ทั่วไป มีชื่อเรียกว่า green mold หรือ blue mold ตามสีของสปอร์ มีเส้นใยเส้นบางประมาณ 3 ไมโครเมตร conidiophore มีผนังกั้นตั้งตรงจากเส้นใย โดยมี penicillus (เป็นส่วนต่อจาก base of conidiophore ประกอบด้วย metula และ phialide รูปขวด) ที่แตกแขนงสร้าง secondary phialide เพื่อให้ conidia ลักษณะกลมเรียงต่อเป็นสาย โดย conidia แก่สุดจะอยู่ปลายสาย บางครั้งพบเชื้อสร้าง phialide ตั้งตรงจาก conidiophore ที่ไม่มีการแตกแขนง การแยกสายพันธุ์ต้องอาศัยรูปร่างการเรียงตัวของ conidiophores, phialide และ metula ที่แตกต่างกัน *Penicillium* เจริญเร็ว โคโลนีมีลักษณะคล้ายผงแป้งถึงกำมะหยี่ สีเขียวอมฟ้า ขอบสีขาว

2.3.1 ชนิดของเชื้อรา *Penicillium*

สามารถจำแนกออกเป็น 3 พวกใหญ่ๆ คือ

2.3.1.1 Monoverticillata

ราใน Monoverticillata section สร้างก้าน phialophore ซึ่งมี phialide เกิดเป็นกลุ่มอยู่ที่ปลาย โดยไม่มี metula และแขนงอื่นใด เรียกว่าเป็นแบบ simple (รูปที่ 2.3, A) เช่น *Penicillium frequentans* เป็นต้น

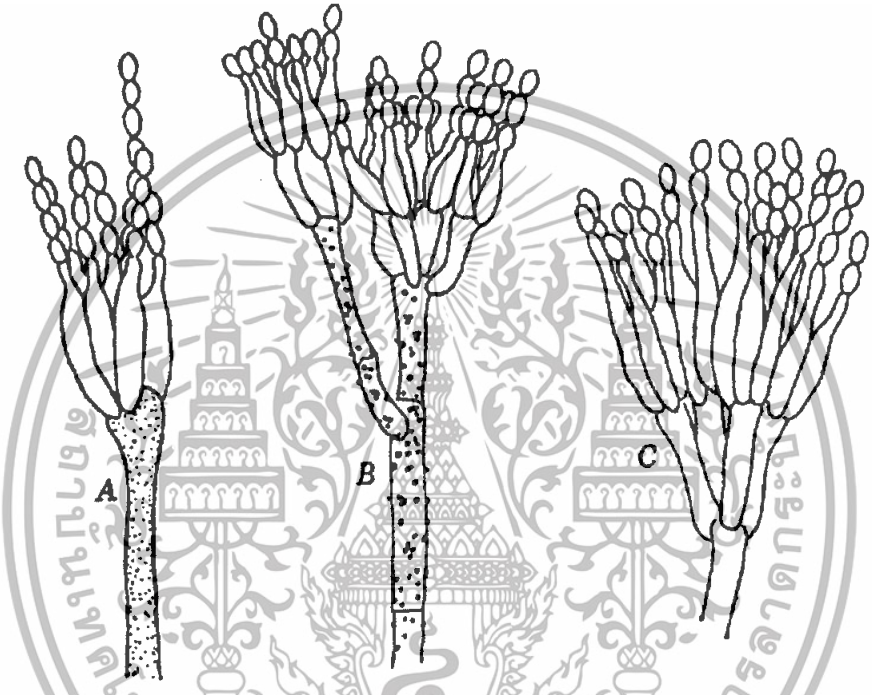
2.3.1.2 Asymmetrica

penicillus มีการแตกแขนง 1 หรือ 2 ครั้ง ในระดับต่ำจาก phialide ลงมา แขนงที่แตกมีลักษณะ asymmetrical ไม่สม่ำเสมอ หรือแตกออกข้างเดียว รูปร่างของ phialide มีส่วนปลายที่ไม่ยาวเรียวมีลักษณะเป็น needle-shaped (รูปที่ 2.3, B) เช่น *P. roqueforti* และ *P. digitatum* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.3 Biverticillata-Symmertrica (Lanceolata)

สร้าง penicillus ที่เป็น biverticillate และ symmertrical ประกอบด้วย metula และ phialide ในราบางชนิด (strain หรือ species) อาจแตกไม่สมบูรณ์นัก รูปร่างของ phialide มีส่วนปลายที่ค่อยๆ เรียวยาวเล็กลงเป็นรูปเข็ม (lanceolate หรือ acerose) (รูปที่ 2.3, C) เช่น *P. vermiculatum* และ *P. herqui* เป็นต้น



รูปที่ 2.3 ลักษณะ penicillus ของรา *Penicillium* : (A) monoverticillate type ; (B) asymmetrical type ; (C) biverticillate symmetrical type (กัญญา และคณะ, 2547)

2.3.2 ประโยชน์และโทษของ *Penicillium*

Penicillium จัดเป็นรา contaminant ในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากสปอร์สามารถแพร่กระจายในอากาศได้ดี จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนกับเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังสามารถทำลายเมล็ดพืชและผลไม้ต่างๆ หลังการเก็บเกี่ยว เช่น ส้ม แอปเปิ้ล โดยเฉพาะในวันที่มีอากาศร้อน *Penicillium* บางสายพันธุ์ เช่น *P. notatum* และ *P. chrysogenum* สร้างสารปฏิชีวนะเพนนิซิลินยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ *Penicillium* บางชนิดยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง ทำให้ได้เนยที่มีคุณภาพดีและราคาแพง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น *P. roqueforti* ใช้ผลิตเนยแข็งชนิด Roquefort cheese และ *P. camemberti* ใช้ผลิตเนยแข็งชนิด Camembert cheese เป็นต้น

2.4 *Trichoderma* (วิจัย, 2546 ; จิระเดช, 2550)

เชื้อรา *Trichoderma* จัดอยู่ใน

Division Ascomycota

Subdivision Pezizomycotina

Class Sordariomycetes

Order Hypocreales

Family *Hypocreaceae*

Genus *Trichoderma*

เป็นเชื้อราจำพวก saprophyte ที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช ซากสัตว์และแหล่งอินทรียวัตถุ เป็นแหล่งอาหาร พบได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีอินทรียวัตถุสูง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย (เจริญได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อราหลายชนิด) สร้างเส้นใยสีขาวและผลิต conidia หรือสปอร์รวมเป็นกลุ่มเห็นเป็นสีเขียว บางชนิดอาจมีสีขาวหรือสีเหลือง และเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม มีลักษณะแห้ง จัดเป็นพวก phialospore สร้าง phialide บนก้าน phialophore ที่แตกกิ่งก้าน (รูปที่ 2.4) เป็นราที่เจริญได้รวดเร็ว บางไอโซเลทสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราอื่นๆ เช่น *Candida albicans* และ *Rhizoctonia solani*

ประโยชน์และโทษของ *Trichoderma*

Trichoderma สามารถนำมาใช้ควบคุม ทำลายหรือยับยั้งเชื้อราในดินซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชที่ก่อให้เกิดอาการโรครากเน่าโคนเน่าทั้งในพืชผัก พืชไร่ และไม้ผล เช่น เชื้อราเมล็ดผักกาด *(Sclerotium rolfsii)*, รา *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp. และ *Fusarium* sp. เชื้อราในดินสาเหตุโรคพืชเหล่านี้เมื่อเข้าทำลายระบบรากพืชจะทำให้พืชแสดงอาการรากเน่าและโคนเน่า ในต้นที่แสดงอาการรุนแรงจะเหี่ยวแห้งตายไปในที่สุด การใช้ *Trichoderma* สามารถควบคุมเชื้อโรคพืชโดยการเป็นปรสิต โดยพันรัดแล้วแทงส่วนของเส้นใยเข้าไปในเส้นใยของเชื้อโรคพืช แล้วจึงสร้างเอนไซม์ เช่น chitinase, cellulase, beta-1, 3-glucanase ซึ่งมีคุณสมบัติในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยเชื้อโรคพืช ทำให้เส้นใยของเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคพืชตาย ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณของเชื้อโรคพืชลดลง (เยาวพา, 2550) ในขณะที่ *Trichoderma* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ หรือสารพิษ เพื่อหยุดยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่จะเจริญโดยสร้างเส้นใยและสปอร์ได้ค่อนข้างรวดเร็ว จึงมีความสามารถสูงในการแข่งขันกับเชื้อโรคพืชด้านการใช้อาหารและแร่ธาตุต่างๆ จากแหล่งอาหารในธรรมชาติ ตลอดจนการใช้สารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยได้เป็นอย่างดี มีประโยชน์ในการทดแทนการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ลดสารพิษตกค้างในพืชและสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ *Trichoderma* ยังสามารถใช้ทำปุ๋ยหมักได้ด้วย ใช้ในการรักษาโรคพืช ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยช่วยในการปรับปรุงปุ๋ยในดินในลักษณะของการย่อยสลาย สามารถใช้คลุกเมล็ดพันธุ์ เพื่อเป็นการป้องกันโรคราที่จะเกิดขึ้นกับเมล็ดได้

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ *Trichoderma viride* (Spillman, 2002)

2.5 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช (เยาวพา, 2550)

โรคพืชเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการเพาะปลูกพืช และยังจัดเป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่สามารถทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้ปลูก ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มเพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว การควบคุมโรคพืชมีหลายวิธี วิธีที่ง่ายและได้ผลเร็วก็คือการใช้สารเคมี แต่มักจะเกิดปัญหาตามมา คือ การดื้อต่อสารเคมีของเชื้อโรค การปนเปื้อนและตกค้างของสารเคมีในผลิตผลการเกษตรและในสิ่งแวดล้อม และยังมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภคด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาวิธีการควบคุมโรคพืชใหม่ๆ เพื่อลดปัญหาอันตรายจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้น โดยให้มีการใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) ซึ่งเป็นการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคต่างๆ โดยการนำสิ่งมีชีวิตหนึ่งชนิดหรือมากกว่ามาใช้ในการควบคุม อาจรวมถึงการใช้สารพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ด้วย แต่สิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะไม่รวมถึงมนุษย์ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับว่าใช้ได้ผลดี ได้มีการศึกษาถึงกลไกการควบคุมโรคและระบบการควบคุมโรคโดยวิธีต่างๆ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา มักเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคพืชโดยการแก่งแย่งอาหาร การยับยั้งทำลาย และการเป็นปรสิต งานวิจัยด้านการควบคุมโรคโดยวิธีชีวภาพ ส่วนใหญ่มักจะเน้นการศึกษาการควบคุมโรคที่ทำลายส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดิน มากกว่าเชื้อโรคที่เข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน ปัจจุบันวิธีนี้เป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคในระดับการค้า

ในธรรมชาติจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช เรียกว่า เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) โดยเชื้อนี้จะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้ 4 ลักษณะ คือ

2.5.1 การแข่งขัน (competition)

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เจริญและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว จนสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญหรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ การแข่งขันที่พบมากคือ การนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ ทำให้เชื้อโรคขาดสาร ไม่สามารถเจริญเข้าทำลายพืชได้ ตัวอย่างเช่น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* จะผลิตสาร siderophore ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis var. tritici* สาเหตุโรค Take-all ของข้าวสาลี ทำให้เชื้อรานี้ไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลี ช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ และให้ผลผลิตดีขึ้น

2.5.2 การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)

เชื้อปฏิปักษ์นี้มีความสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) พบว่ากลไกชนิดนี้เป็นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรกโดยเชื้อปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 จะผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* biotype 1 และ 2 ที่เป็นสาเหตุโรค crown gall ของพืชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 การเป็นปรสิต (parasitism)

เชื้อปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิตจะเข้าไปเจริญอาศัยและทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นๆ นั้นพบได้ไม่มากนัก การใช้เชื้อควบคุมโรคพืชนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนปฏิกิริยาแบบการทำลายชีวิต เช่น *Erwinia urediniolytica* จะเข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิมหรือเชื้อ *Pasteuria penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม

2.5.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance)

เชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้ว สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชพวกแตง ไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรงที่มีชีวิตอยู่สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้

2.6 วิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (จิระเดช, 2550)

การนำเชื้อปฏิปักษ์ไปใช้ในการควบคุมโรคพืช นิยมใช้กับโรคพืชที่เกิดบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดิน (phylloplane) ซึ่งการใช้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคจะมีกรรมวิธีการใช้แตกต่างกัน ดังนี้

2.6.1 บริเวณผิวราก

มีการใช้เชื้อปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคได้หลายแบบแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับความสะดวกในการปฏิบัติของผู้ใช้ แต่ละวิธีอาจให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณสมบัติของพืชเองและลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่มีหลายรูปแบบ

2.6.1.1 การคลุกเมล็ด นิยมใช้กับพืชที่ใช้เมล็ดในการเพาะปลูก โดยเมล็ดต้องมีขนาดไม่ใหญ่มาก ช่วยให้คลุกง่ายและไม่สิ้นเปลืองผงเชื้อ มักนิยมคลุกเมล็ดก่อนปลูก

2.6.1.2 การราดดิน เป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติกันมาก แต่ไม่ค่อยสะดวก หากจะนำไปใช้ในสภาพไร่เกษตรที่น้ำไม่เพียงพอ และถ้าปลูกพืชเป็นปริมาณมากก็จะยิ่งไม่สะดวกในการปฏิบัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.3 การคลุกดิน เป็นวิธีการนำเอาผงเชื้อหรือสารละลายเชื้อปฏิปักษ์ใส่ไปในดินและคลุกเคล้าผสมกันให้ทั่วก่อนปลูกพืช ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างสะดวก

2.6.1.4 การจุ่มรากเป็นวิธีที่นิยมใช้กับพืชที่ต้องเพาะเมล็ดแล้วย้ายกล้าไปปลูก เช่น พริก มะเขือเทศ หรือพืชที่มีเมล็ดพันธุ์ราคาแพง โดยจะต้องทำให้ดินบริเวณรากหลุดออกให้หมดก่อนนำไปจุ่มในสารละลายเชื้อที่เข้มข้น 10^8 CFU/ml แล้วจึงนำไปปลูกในแปลงต่อไป วิธีนี้จะทำให้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคได้ดี เพราะรากจะสัมผัสกับเชื้อได้หมดทุกส่วน ไม่ก่อให้เกิดช่องว่างให้เชื้อโรคเข้าทำลาย

2.6.2 บริเวณผิวพืชอยู่เหนือดิน มีวิธีใช้ที่นิยม 2 วิธีคือ

2.6.2.1 การทา เป็นวิธีที่นิยมใช้กับพืชยืนต้นที่ถูกทำลาย มีแผลปรากฏให้เห็นชัดเจนบนส่วนของต้นหรือกิ่ง บริเวณที่สามารถนำเอาเชื้อปฏิปักษ์ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นและเหนียวไปทา เพื่อให้ยึดติดกับ ผิวพืชได้คงทน

2.6.2.2 การพ่น เป็นวิธีที่นิยมใช้กับพืชที่ปลูกเป็นปริมาณมาก หรือมีลำต้นสูง ซึ่งใช้หลักการปฏิบัติเช่นเดียวกับการพ่นสารเคมีกำจัดโรคพืช

เชื้อปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบันมีทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งเชื้อราสายพันธุ์ที่ใช้และผลิตในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. เชื้อปฏิปักษ์ที่ได้ทำการคัดเลือกและทดสอบว่ามีความสามารถควบคุมโรคได้ดีในห้องปฏิบัติการ และในสภาพไร่แล้ว จำเป็นต้องมีการศึกษาพัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์ เพื่อนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในเชิงการค้าต่อไป

2.6.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการนำเชื้อปฏิปักษ์มาใช้ในทางการค้า

2.6.3.1. มีมาตรฐานที่เชื่อถือได้ เชื้อปฏิปักษ์ที่พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จะต้องมีปริมาณของเชื้อที่ใช้ใกล้เคียงได้มาตรฐานทุกครั้งที่ผลิต ไม่มีเชื้ออื่นปะปน และมีคุณภาพในการควบคุมโรคคงที่สม่ำเสมอ

2.6.3.2 มีอายุการเก็บรักษานาน ชีวผลิตภัณฑ์ที่ดีจะต้องสามารถเก็บรักษาในบรรยากาศที่ร้อนของประเทศไทย ทั้งในขณะที่จำหน่ายอยู่ในร้านค้า หรือที่เกษตรกรเก็บไว้ใช้

2.6.3.3 มีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม ชีวผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นจะต้องไม่เป็นโทษต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ และไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3.4 มีการใช้ร่วมกัน เช่น การนำชีวผลิตภัณฑ์ไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ ได้ และทำให้มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น ก็จะเป็นการลดต้นทุนและเพิ่มความสะดวกในการนำไปใช้

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาจุลินทรีย์เหล่านี้ให้อยู่ในรูปของผงและเม็ดที่สะดวกต่อการนำไปใช้และการเก็บรักษา ตลอดจนได้มีการศึกษาและพัฒนาถึงความคงตัวของจุลินทรีย์เพื่อให้เก็บไว้ได้นานที่สุด แต่ยังคงมีประสิทธิภาพควบคุมโรคได้สูง แต่การนำผลิตภัณฑ์ชีวภาพเหล่านี้มาใช้ จะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยด้วย เพราะจุลินทรีย์เหล่านี้ยังมีชีวิตอาจมีผลกระทบต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ดังนั้นจึงควรมีการกำหนดมาตรการที่เหมาะสม เพื่อควบคุมความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม ตลอดถึงควบคุมการผลิตและการใช้เทคโนโลยีอย่างถูกต้องต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สายพันธุ์ของเชื้อรา

3.1.1 *Aspergillus parasiticus* IMI 102566 จาก International Mycological Institute ประเทศอังกฤษ

3.1.2 *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 แยกได้จากดินแปลงปลูกข้าวโพด คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดย กานต์ และคณะ (2548)

3.1.3 *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 แยกได้จากดินแปลงปลูกสับปะรด จ. สุราษฎ์ธานี โดย กานต์ และคณะ (2548)

3.1.4 *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) และ 480519 I06 (3) เป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาจากสถาบันปรมาณู

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) (ภาคผนวก ก)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (Potato Dextrose Broth) (ภาคผนวก ก)

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ MEB (Malt Extract Broth) (ภาคผนวก ก)

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ YES (Yeast Extract Sucrose) Broth (ภาคผนวก ก)

3.2.5 Tween ความเข้มข้นร้อยละ 0.02

3.2.6 สีย้อม lactophenol (ภาคผนวก ข)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.3.2 เครื่องแก้วต่างๆ

3.3.3 ปิเปตต์และจุกยาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83987

3.3.4 กรวยกรองและกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

3.3.5 เข็มเขี่ยเชื้อและตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.6 กล้องจุลทรรศน์

3.3.7 Haemocytomerter

3.3.8 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

3.3.9 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.3.10 เครื่องเขย่า (shaker)

3.3.11 Vernier

3.3.12 Cork borer ขนาด 8 มิลลิเมตร

3.1.13 Auto syringe

3.1.14 Cylinder cup ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.1.15 กระดาษแก้ว cellophane

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ลงบนอาหาร PDA ในหลอดอาหารเอียง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ศึกษาการเจริญและลักษณะของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.2 การเตรียม mycelial disc ของเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma*

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma* ลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงใช้ cork borer ขนาด 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีที่มีการเจริญของเส้นใยเป็นสีขาว

3.4.3 การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

นำกระดาษแก้วที่ตัดเป็นชิ้นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปูทับผิวหน้า PDA ในจานเพาะเชื้อ โดยดัดแปลงวิธีมาจากเทคนิค Simon และคณะ (1988) ก่อนวาง mycelial disc ของเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma* สายพันธุ์ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.4.2 วางลงตรงกึ่งกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma* เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นลอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษแก้วพร้อมโคโลนีเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma* ที่เจริญออกแล้ว จากนั้นทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยวิธี Point incoculation (ภาคผนวก ข) มาแตะลงบนอาหาร PDA ในตำแหน่งกึ่งกลางของจานเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันที่เคยวาง mycelial disc ของเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma* บ่มเชื้อรา *A. parasiticus* ที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา (ทำการทดสอบ 5 ซ้ำ) เปรียบเทียบกับจานเพาะเชื้อควบคุม (control) ที่ใช้เชื้อรา *A. parasiticus* วางบนกระดาษแก้วแทนเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma* วัดขนาดโคโลนีของ *A. parasiticus* นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยการดัดแปลงจากสูตรของ Royce และ Ries (1978) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(D_1-D_2)/D_1] \times 100$$

เมื่อ D_1 = ขนาดของโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่อายุ 4 วัน ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคยมีเชื้อรา *A. parasiticus* เจริญอยู่ก่อน 36 ชั่วโมง (จานเพาะเชื้อควบคุม) ลบด้วยขนาดของโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่ใช้ในการทดลอง

D_2 = ขนาดของโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่อายุ 4 วัน ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคยมีเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma* เจริญอยู่ก่อน 36 ชั่วโมง ลบด้วยขนาดของโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่ใช้ในการทดลอง

3.4.4 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ลงในอาหารเหลว 3 ชนิด ได้แก่ MEB, PDB และ YES broth โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 14 วัน และสภาวะเขย่าเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.4.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา (spore suspension) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA slant ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน จากนั้นนำมาทำสารแขวนลอยสปอร์โดยการเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อที่มี Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ทำการกำจัดเส้นใยราออกโดยการกรองด้วยสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงทำการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วย Haemacytometer ให้ได้จำนวนสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และทำเช่นเดียวกันนี้กับเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* อาหารเหลวที่ใช้มีทั้งหมด 3 ชนิด คือ MEB, PDB และ YES broth (ภาคผนวก ก) แบ่งใส่ ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.4.3 การเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ที่ได้เตรียมไว้แล้ว มาเติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* หรือ *Trichoderma* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน และสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำการกรองน้ำเลี้ยงเชื้อราทั้งหมดด้วยสำลีที่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และกรองอีกครั้งหนึ่งเพื่อเอาสปอร์ของเชื้อราออกด้วย membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อให้ได้ส่วนของ culture filtrate และนำไปทดสอบต่อไป

3.4.4.4 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* (Lorian, 1986) โดยการดูดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงใน PDA ที่หลอมเหลวและทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อราให้เข้ากัน เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตรที่มีอาหาร PDA ปริมาตร 25 มิลลิลิตรเทไว้แล้วชั้นหนึ่ง ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง ทำการทดสอบโดยการนำ cylinder cup ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมไว้ แต่ละจานจะวาง cylinder cup จำนวน 6 ถ้วย (โดยให้มีระยะห่างกันพอประมาณ) cylinder cup จำนวน 5 ถ้วย จะทำการหยดสารละลาย culture filtrate ของเชื้อรา *Penicillium* ที่อยู่ในอาหารเหลว MEB ลงใน cylinder cup ให้เต็ม (ปริมาตร 300 ไมโครลิตร) ส่วน cylinder cup อีกถ้วยที่เหลือจะหยดอาหารเหลว MEB ที่ไม่มีเชื้อราเจริญอยู่ ส่วนจานควบคุมเป็นจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้วาง cylinder cup นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 - 4 วัน ดูการเปลี่ยนแปลงและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ cylinder cup ในแต่ละวัน และทำเช่นเดียวกันนี้กับสารละลาย culture filtrate ของเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารอีก 2 ชนิด (PDB และ YES broth)

3.4.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* บนอาหาร PDA ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทรีทเมนต์ (treatment) ละ 5 ซ้ำ จากนั้นจึงนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS for Windows (Statistical Package for the Social Sciences) เวอร์ชั่น 14.0 ส่วนในการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ทำการทดลองแบบแฟกทอเรียลขนาด 2x4x3 โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (2x4x3 Factorial Experiment in Randomized Complete Block Design) จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS for Windows เช่นเดียวกัน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนเพื่อหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ด้วยโปรแกรม MINITAB เวอร์ชั่น 13.0 (สิทธิชัย, 2546)

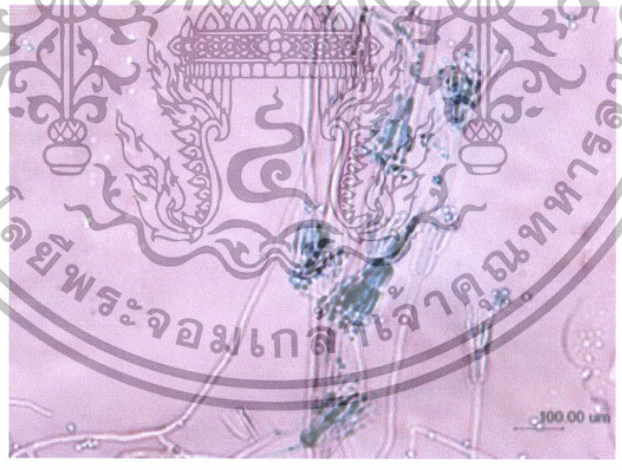
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงนำมาสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของเชื้อราดังนี้

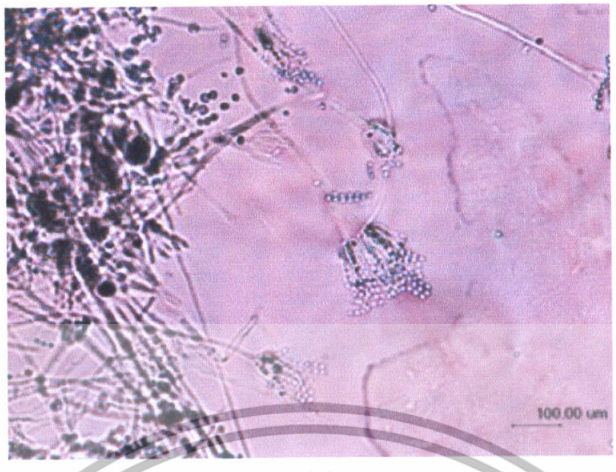
4.1.1 *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) มีการเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ โดยมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สีดำ ในช่วงแรกของการเจริญเส้นใยจะมีสีขาว มีการสร้างสี มีสีแดง ที่ผิวหน้าอาหาร โดยจะเริ่มสร้างตั้งแต่วันแรกๆ ของการเพาะเลี้ยง ส่วนสปอร์มีลักษณะกลม conidiophore ไม่แตกกิ่งก้าน แต่จะมี phialide ที่ปลายของ conidiophore ซึ่งมีลักษณะคล้ายแปรง มีการสร้าง conidia บน phialide โดย conidia จะเรียงต่อเป็นเส้นสาย ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 conidiophore ของ *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1)

4.1.2 *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) โคโลนีมีลักษณะกลม เล็ก กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สีเขียวขี้ม้า มีการเจริญค่อนข้างช้า สร้างสปอร์จำนวนน้อย โดยสปอร์มีลักษณะกลม conidiophore ไม่แตกกิ่งก้าน แต่จะมี phialide ที่ปลายของ conidiophore ซึ่งมีลักษณะคล้ายแปรง มีการสร้าง conidia บน phialide โดย conidia จะเรียงต่อเป็นเส้นสาย ดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



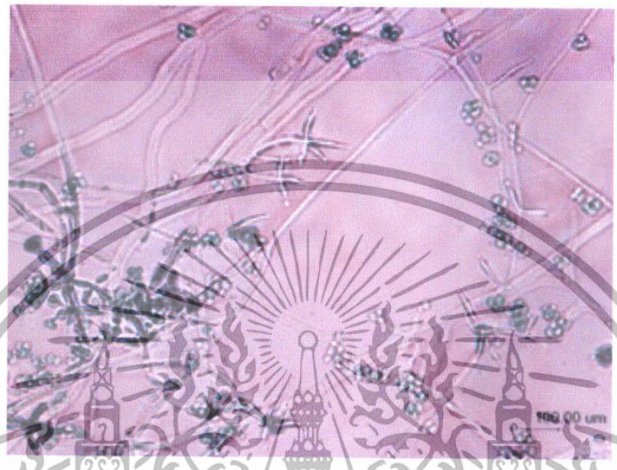
รูปที่ 4.2 conidiophore ของ *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3)

4.1.3 *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 เจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว โดยช่วงแรกของการเจริญเส้นใยจะมีสีขาว มีการแผ่กระจายปกคลุมบนผิวหน้าอาหารอย่างหนาแน่น โคโลนีมีสีเขียวเข้ม สปอร์มีลักษณะกลม conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน มีการสร้าง conidia บน phialide และ phialide มีการแตกตัวเป็นข่อประมาณ 1 – 3 ข่อ ปลายสุดของ conidiophore มักมี phialide เพียงอันเดียว ดังรูปที่ 4.3

รูปที่ 4.3 conidiophore ของ *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 มีลักษณะคล้ายกับไอโซเลท KMC 5 มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว โดยช่วงแรกของการเจริญเส้นใยจะมีสีขาว มีการแผ่กระจายปกคลุมบนผิวหน้าอาหารอย่างหนาแน่น โคโลนีมีสีเขียวเข้ม สปอร์มีลักษณะกลม conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน มีการสร้าง conidia เช่นเดียวกับ KMC 5 ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 conidiophore ของ *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4

4.2 ผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

จากการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยใช้เชื้อรา 4 ไอโซเลท คือ *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ไอโซเลท 480519 I06 (3) *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 และไอโซเลท SRS 4 (รูปที่ 4.5) ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทรีทเมนต์ละ 5 ซ้ำ และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน ได้ผลดังตารางที่ 4.1

จากตารางที่ 4.1 พบว่า สายพันธุ์ของเชื้อรามีผลต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในระดับที่แตกต่างกัน โดยเห็นได้จากค่า P - value ที่มีค่าน้อยกว่า 0.05 จึงแสดงว่าเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์มีอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple comparison) ต่อไป เพื่อหาสายพันธุ์ที่แตกต่างกันด้วยวิธีการของ Duncan (ตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราตามความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยที่เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดีที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งได้ 70.32 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 และ SRS 4 ที่สามารถยับยั้งได้ 35.38 และ 29.35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) สามารถยับยั้งการเจริญได้น้อยที่สุด คิดเป็น 8.00 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 4.5 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งโดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญอยู่บนสารยับยั้งของ *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญอยู่บนสารยับยั้งของ *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญอยู่บนสารยับยั้งของ *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1)

ง. เชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญอยู่บนสารยับยั้งของ *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3)

จ. เชื้อรา *A. parasiticus* ในจานควบคุม

เอกสารนี้เป็นการเผยแพร่ผลงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P - value
สายพันธุ์ของเชื้อราต่างๆ (treatment)	3	801.611	267.204	79.991	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	16	53.447	3.340		
รวม	19	855.058			

ตารางที่ 4.2 ผลการสร้างสารยับยั้งของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

เชื้อรา	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนี *A. parasiticus* (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* *
Penicillium ไอโซเลท 480519 I06 (3)	8.37 $\pm$ 1.75	70.32 [a]
Trichoderma ไอโซเลท KMC 5	18.25 $\pm$ 1.78	35.38 [b]
Trichoderma ไอโซเลท SRS 4	19.96 $\pm$ 2.64	29.35 [b]
Penicillium ไอโซเลท 480512 I08 (1)	25.99 $\pm$ 0.39	8.00 [c]

หมายเหตุ * เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 36 ชั่วโมงก่อนเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก *Penicillium* และ *Trichoderma* อาจสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* หรืออาจสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้เชื้อรา *A. parasiticus* ไม่สามารถเจริญต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

4.3.1 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว MEB, PDB และ YES

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) และไอโซเลท 480512 I08 (1) และ *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 และไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว MEB, PDB และ YES มีลักษณะการเจริญดังนี้ ในสภาวะนิ่งเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* จะสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นแผ่น (mycelial mat) เจริญอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนในสภาวะเขย่าเชื้อรา *Penicillium* จะสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นเม็ดเล็กๆ (pellet) กระจายอยู่ทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* พบว่าเส้นใยเกิดการแตกหักออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3.1.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 14 วัน

(1) ในอาหารเหลว MEB

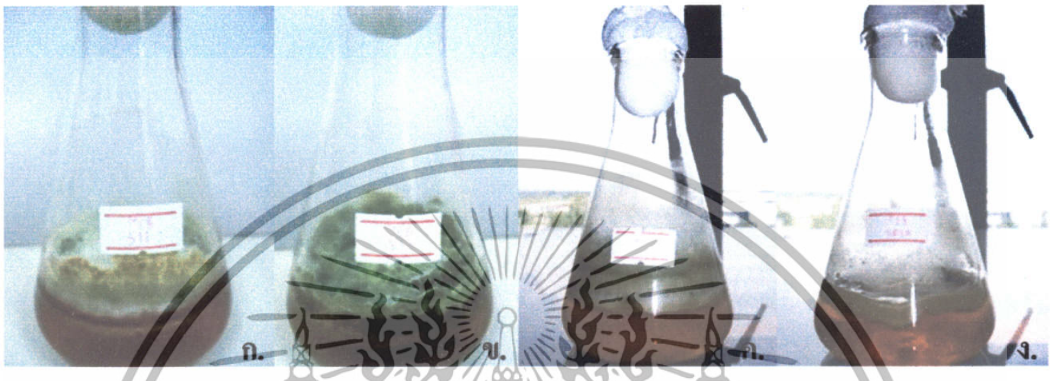
- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) สีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีแดง เนื่องจาก *Penicillium* ไอโซเลทนี้สามารถสร้างสีได้ สร้างเส้นใยสีขาวเกาะกันเป็นแผ่น ค่อนข้างหนา เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวแก่เล็กน้อยอยู่บนแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4.6 ก.)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) สีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีน้ำตาล มีการสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นแผ่นหนาเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มจำนวนมากอยู่บนแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4.6 ข.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 สีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีเหลืองเข้ม มีการสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นแผ่นบางๆ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มจำนวนมากอยู่บนแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4.6 ค.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 สีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีน้ำตาลเข้ม มีการสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นแผ่นค่อนข้างหนาเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มค่อนข้างมากอยู่บนแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4.6 ง.)



รูปที่ 4.6 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง
ก. *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1)
ข. *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3)
ค. *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5
ง. *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4

(2) ในอาหารเหลว PDB

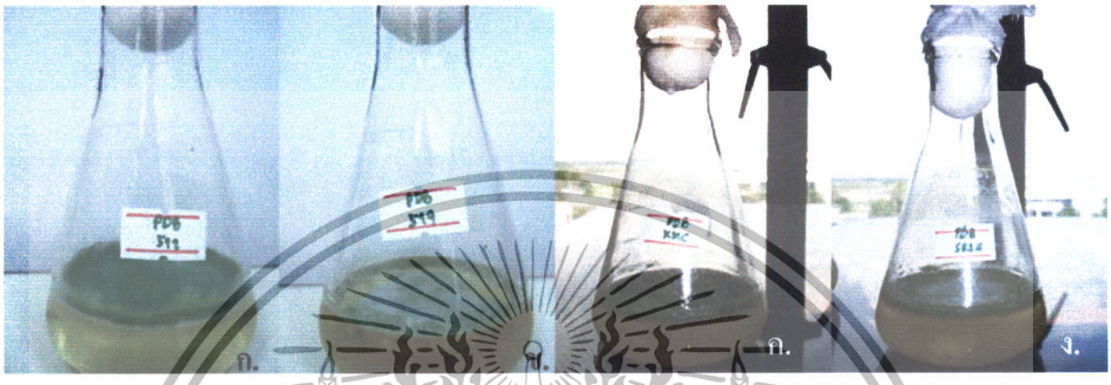
- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) อาหารมีสีเหลืองอ่อน มีการสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นแผ่นบางๆ เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวแก่จำนวนมากอยู่บนแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4.7 ก.)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) อาหารมีสีเหลืองเข้ม มีการสร้างเส้นใยเป็นแผ่นบางๆ เจริญอยู่บนของผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มอยู่บนแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4.7 ข.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 อาหารมีสีน้ำตาลขุ่น มีการสร้างเส้นใยเกาะกันปืนแผ่นบางเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มอยู่บนแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4.7 ค.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 อาหารมีสีเหลืองขุ่น มีการสร้างเส้นใยเกาะกันปื้นแผ่นเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารและมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มอยู่บนแผ่นเส้นใย (รูปที่ 4.7 ง.)



รูปที่ 4.7 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง
ก. *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1)
ข. *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3)
ค. *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5
ง. *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4

(3) ในอาหารเหลว YES

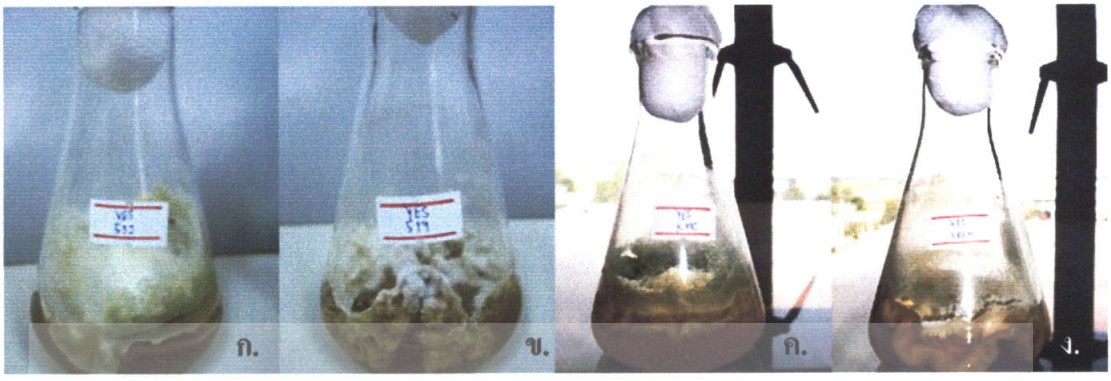
- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) อาหารมีสีเหลืองขุ่น มีการสร้างเส้นใยเป็นแผ่นสีขาว ค่อนข้างหนา เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร ไม่มีการสร้างสปอร์ (รูปที่ 4.8 ก.)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) อาหารมีสีเหลืองเข้ม และปริมาณของอาหารลดลงจากเดิมมาก มีการสร้างเส้นใยสีขาวขุ่นจำนวนมาก เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน และไม่มีการสร้างสปอร์ (รูปที่ 4.8 ข.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 อาหารมีสีเหลืองขุ่น มีการสร้างเส้นใยสีขาวขุ่นเกาะกันเป็นกลุ่มก้อน มีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มจำนวนมากบนผิวหน้าอาหารและข้างฟลากส์ (รูปที่ 4.8 ค.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 อาหารมีสีเหลืองเข้ม มีการสร้างเส้นใยสีขาวขุ่นเกาะกันเป็นกลุ่มก้อน และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มบริเวณข้างฟลากส์ (รูปที่ 4.8 ง.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง

ก. *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1)

ข. *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3)

ค. *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5

ง. *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4

4.3.1.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าเป็นเวลา 7 วัน

(1) ในอาหารเหลว MEB

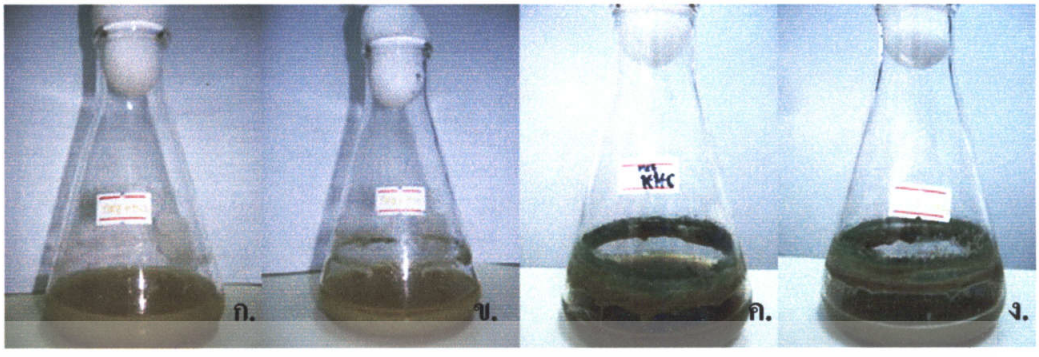
- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) อาหารมีสีเหลืองขุ่น เส้นใยเกิดการแตกหักออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ กระจายอยู่ในอาหาร (รูปที่ 4.9 ก.)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) อาหารมีสีเหลืองเข้ม มีการสร้างเส้นใยสีขาวขุ่นเกาะกันเป็นเม็ดเล็กๆ (pellet) จำนวนมาก กระจายอยู่ในอาหาร (รูปที่ 4.9 ข.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 อาหารมีสีน้ำตาลเข้มและขุ่น มีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มบริเวณข้างฟลาสก์ (รูปที่ 4.9 ค.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 อาหารมีสีน้ำตาลเข้มและขุ่น มีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มบริเวณข้างฟลากส์ (รูปที่ 4.9 ง.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า

ก. *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1)

ข. *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3)

ค. *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5

ง. *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4

(2) ในอาหารเหลว PDB

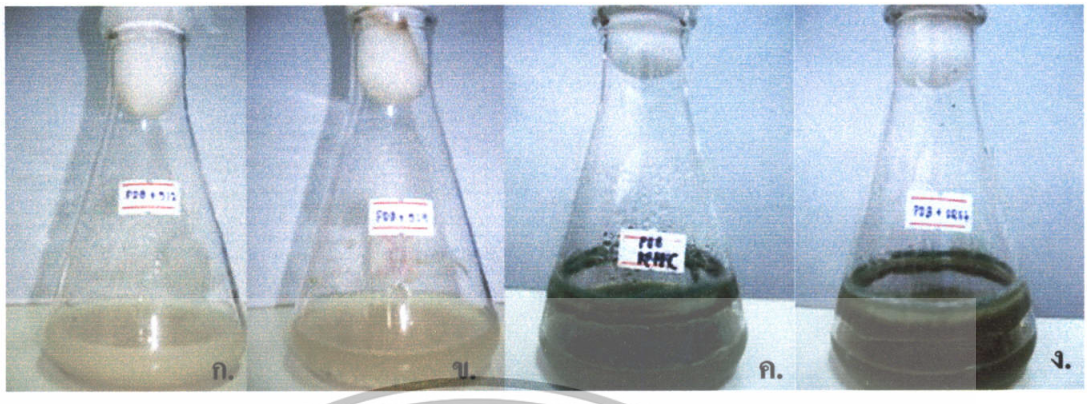
- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) อาหารมีสีเหลืองอ่อนและขุ่น เส้นใยเกิดการแตกหักออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ กระจายอยู่ในอาหาร (รูปที่ 4.10 ค.)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) อาหารมีสีเหลืองอ่อน มีการสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นเม็ดเล็กๆ (pellet) เล็กน้อย (รูปที่ 4.10 ข.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 อาหารมีสีเขียวเข้มและขุ่น มีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มบริเวณข้างฟลาสก์ (รูปที่ 4.10 ค.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 อาหารมีสีน้ำตาลเข้มและขุ่น มีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มบริเวณข้างฟลาสก์ (รูปที่ 4.10 ง.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า

ก. *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1)

ข. *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3)

ค. *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5

ง. *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4

(3) ในอาหารเหลว YES

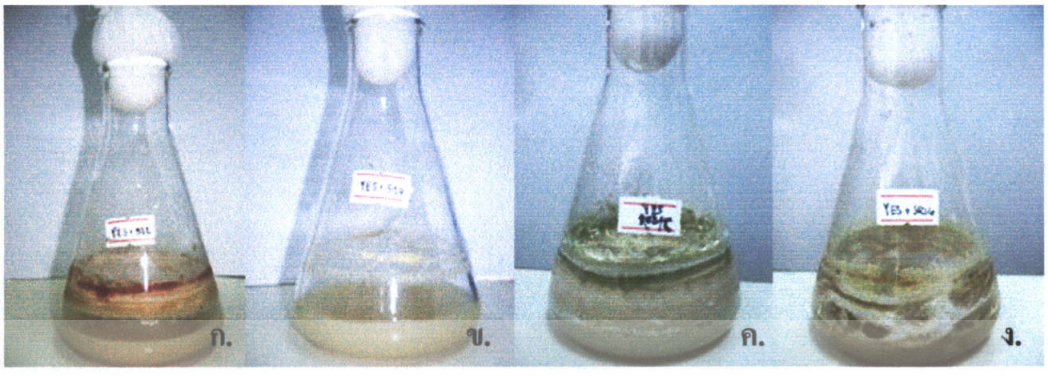
- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) อาหารมีสีเหลืองขุ่น มีการสร้างเส้นใยเล็กน้อยที่ข้างฟลาสก์ นอกจากนี้ยังมีการสร้างสีแดง บริเวณเส้นใยด้วย (รูปที่ 4.11 ก.)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) อาหารมีสีเหลืองอ่อนและขุ่น มีการสร้างเส้นใย (รูปที่ 4.11 ข.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 อาหารมีขาวขุ่นและข้น มีการสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นเม็ดเล็กๆ จำนวนมากกระจายอยู่ในอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้ม จำนวนเล็กน้อยข้างฟลาสก์ (รูปที่ 4.10 ค.)

- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 อาหารมีสีขาวขุ่นและข้น มีการสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นเม็ดเล็กๆ จำนวนมากกระจายอยู่ในอาหาร และมีการสร้างสปอร์จำนวนเล็กน้อยบริเวณข้างฟลาสก์ (รูปที่ 4.11 ง.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า

ก. *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1)

ข. *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3)

ค. *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5

ง. *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4

4.3.2 ผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*

จากการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา และสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยทำการทดลองแบบแฟกทอเรียลขนาด 2x4x3 ในแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (2x4x3 Factorial Experiment in Randomized Complete Block Design) และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน ได้ผลดังตารางที่ 4.3

จากตารางที่ 4.3 พบว่า ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา และสายพันธุ์ของเชื้อรามีอิทธิพลร่วมกันในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเห็นได้จากค่า P - value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัย (ชนิดของอาหาร สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง และสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์การแปรปรวนการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma*

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P - value
ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (Block)	2	24.957	12.479	4.631	0.015
สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา (A)	1	1447.292	1447.292	537.131	0.000
สายพันธุ์ของเชื้อรา (B)	3	974.360	324.787	120.538	0.000
ชนิดของอาหาร (C)	2	306.506	153.253	56.877	0.000
อิทธิพลรวมระหว่าง A*B	3	542.965	180.988	67.170	0.000
อิทธิพลรวมระหว่าง B*C	6	287.845	143.923	53.414	0.000
อิทธิพลรวมระหว่าง A*C	2	361.628	60.271	22.368	0.000
อิทธิพลรวมระหว่าง A*B*C	6	979.025	163.171	60.557	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	46	123.946	2.694		
รวม	71	5048.526			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดย *Penicillium* และ *Trichoderma*

ทรีทเมนต์			ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone โดยเฉลี่ย (มม.) **
สายพันธุ์ของเชื้อรา	ชนิดของอาหาร	สภาวะ *	
Penicillium 480519 I06 (3)	YES	นิ่ง	33.750 [a] ± 7.172
Trichoderma KMC 5	PDB	นิ่ง	16.031 [b] ± 2.471
Trichoderma KMC 5	YES	นิ่ง	15.079 [bc] ± 0.686
Penicillium 480512 I08 (1)	YES	เขย่า	13.099 [cd] ± 2.147
Penicillium 480519 I06 (3)	MEB	เขย่า	12.945 [cd] ± 1.958
Penicillium 480512 I08(1)	PDB	นิ่ง	12.637 [d] ± 1.169
Trichoderma KMC 5	MEB	นิ่ง	12.239 [d] ± 0.871
Penicillium 480519 I06 (3)	PDB	นิ่ง	12.101 [d] ± 0.814
Penicillium 480512 I08(1)	PDB	เขย่า	11.784 [d] ± 4.192
Penicillium 480512 I08(1)	YES	นิ่ง	11.133 [d] ± 0.710
Trichoderma SRS 4	YES	นิ่ง	11.113 [d] ± 0.597
Penicillium 480512 I08 (1)	MEB	นิ่ง	10.862 [d] ± 0.785
Penicillium 480519 I06 (3)	MEB	นิ่ง	10.491 [d] ± 0.919
Trichoderma KMC 5	MEB	เขย่า	0.000 [e]
Trichoderma KMC 5	PDB	เขย่า	
Trichoderma KMC 5	YES	เขย่า	
Trichoderma SRS 4	MEB	เขย่า	
Trichoderma SRS 4	PDB	เขย่า	
Trichoderma SRS 4	YES	เขย่า	
Trichoderma SRS 4	MEB	นิ่ง	
Trichoderma SRS 4	PDB	นิ่ง	
Penicillium 480519 I06 (3)	PDB	เขย่า	
Penicillium 480519 I06 (3)	YES	เขย่า	
Penicillium 480512 I08 (1)	MEB	เขย่า	

หมายเหตุ

* สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรามี 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่งเป็นเวลา 14 วัน และสภาวะเขย่าเป็นเวลา 7 วัน

** ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone รอบๆ cylinder cup ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.4 พบว่า สามารถแบ่งชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ตามความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดีที่สุด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 33.750 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.12)

กลุ่มที่ 2 คือ เชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง (รูปที่ 4.13) และเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง (รูปที่ 4.14) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้รองลงมาจากกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 16.031 และ 15.079 มิลลิเมตรตามลำดับ โดยอาหารทั้งสองชนิดให้ผลไม่แตกต่างกัน

กลุ่มที่ 3 คือ *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า (รูปที่ 4.15) และ *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า (รูปที่ 4.16) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 13.099 และ 12.945 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยอาหารทั้งสองชนิดให้ผลไม่แตกต่างกัน

กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มของ *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้รองลงมาจากกลุ่มที่ 3 ได้แก่

- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 12.637 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.17)

- *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 12.239 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.18)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 12.101 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.19)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 11.784 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.20)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 11.133 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.21)

- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 11.113 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 10.862 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.23)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 10.491 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.24)

กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มของ *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่ไม่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ ได้แก่

- *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว MEB, PDB และ YES ที่สภาวะเขย่า (รูปที่ 4.25 - 4.27)

- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว MEB, PDB และ YES ที่สภาวะเขย่า (รูปที่ 4.28 - 4.30)

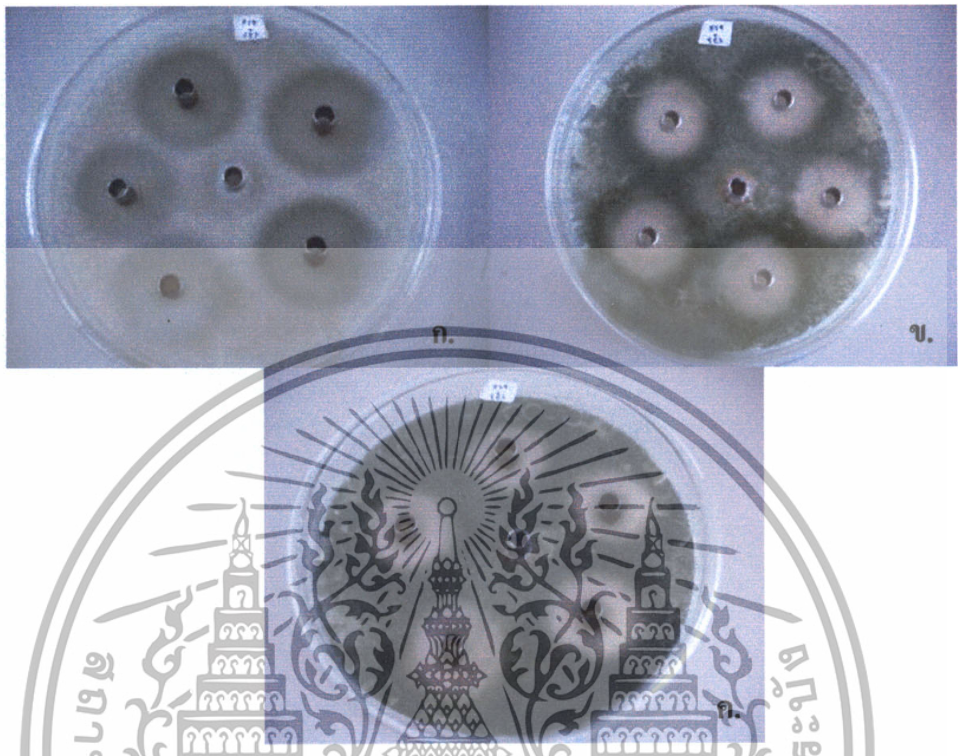
- *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว MEB และ PDB ที่สภาวะนิ่ง (รูปที่ 4.31 และ 4.32)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว PDB และ YES ที่สภาวะเขย่า (รูปที่ 4.33 และ 4.34)

- *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า (รูปที่ 4.35)

จากผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดย *Penicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว MEB, PDB และ YES ที่สภาวะนิ่งและเขย่า พบว่า เชื้อราแต่ละไอโซเลทสามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งในอาหารแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราก็ส่งผลต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งด้วยเช่นกัน เห็นได้จากเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดีที่สุด เนื่องจาก YES มีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) และที่สภาวะนิ่งเชื้อราสามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีกว่าที่สภาวะเขย่า ซึ่งเส้นใยของเชื้อราเกิดการแตกหัก จึงทำให้เชื้อรานำสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเหลวนั้นไปใช้ในการเจริญมากกว่าการนำไปสร้างสารยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



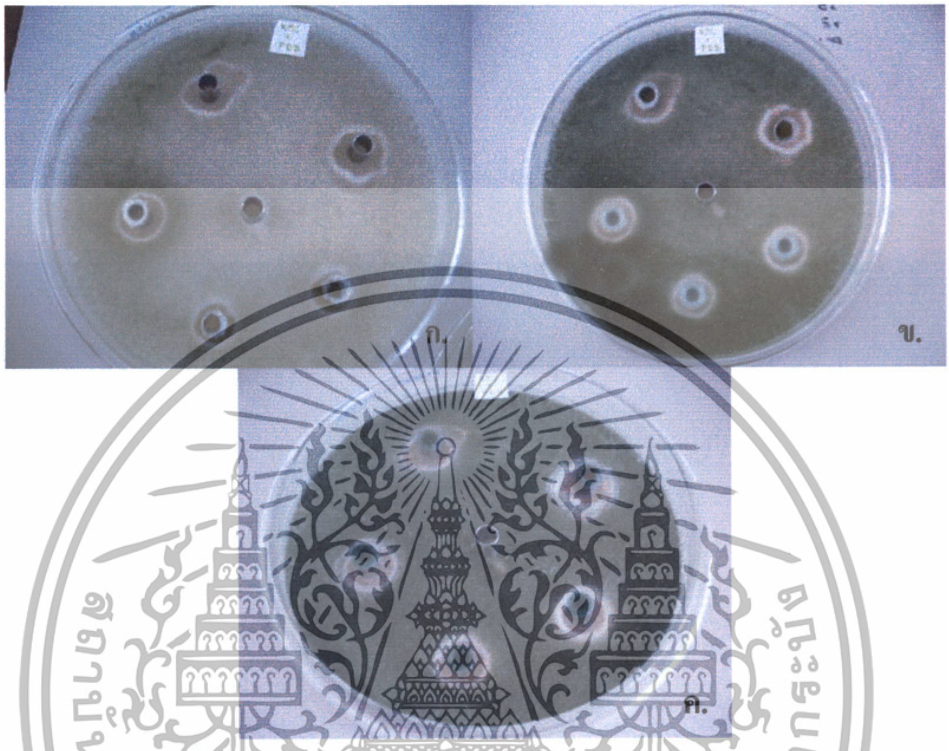
รูปที่ 4.12 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



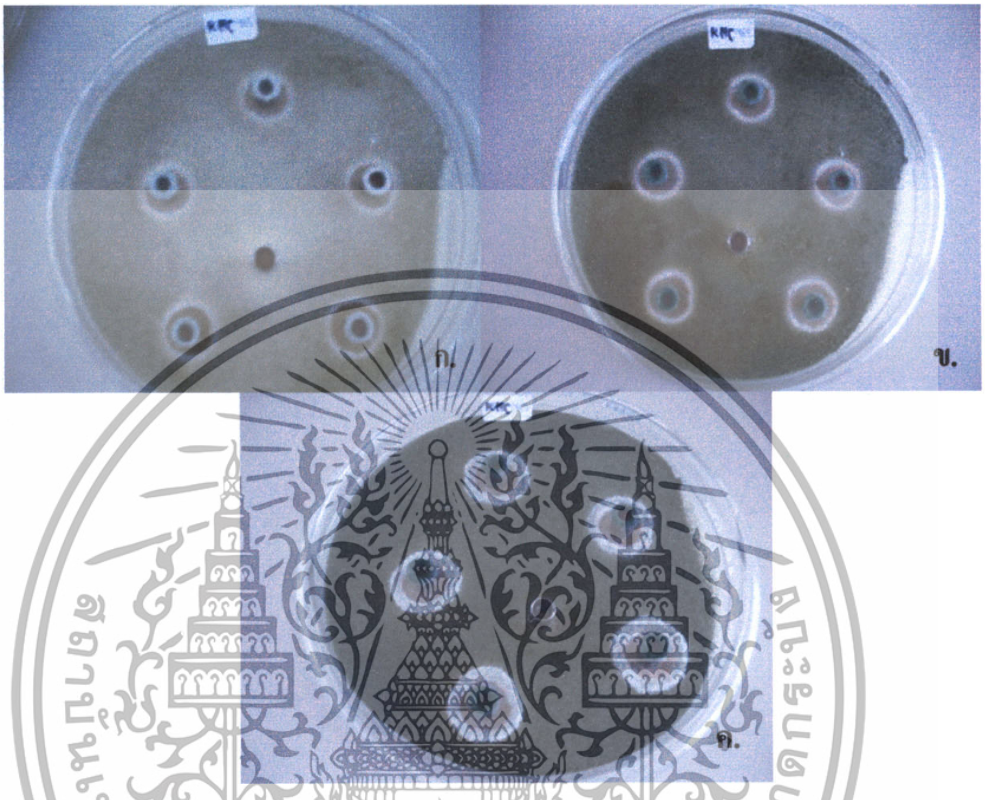
รูปที่ 4.13 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.15 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

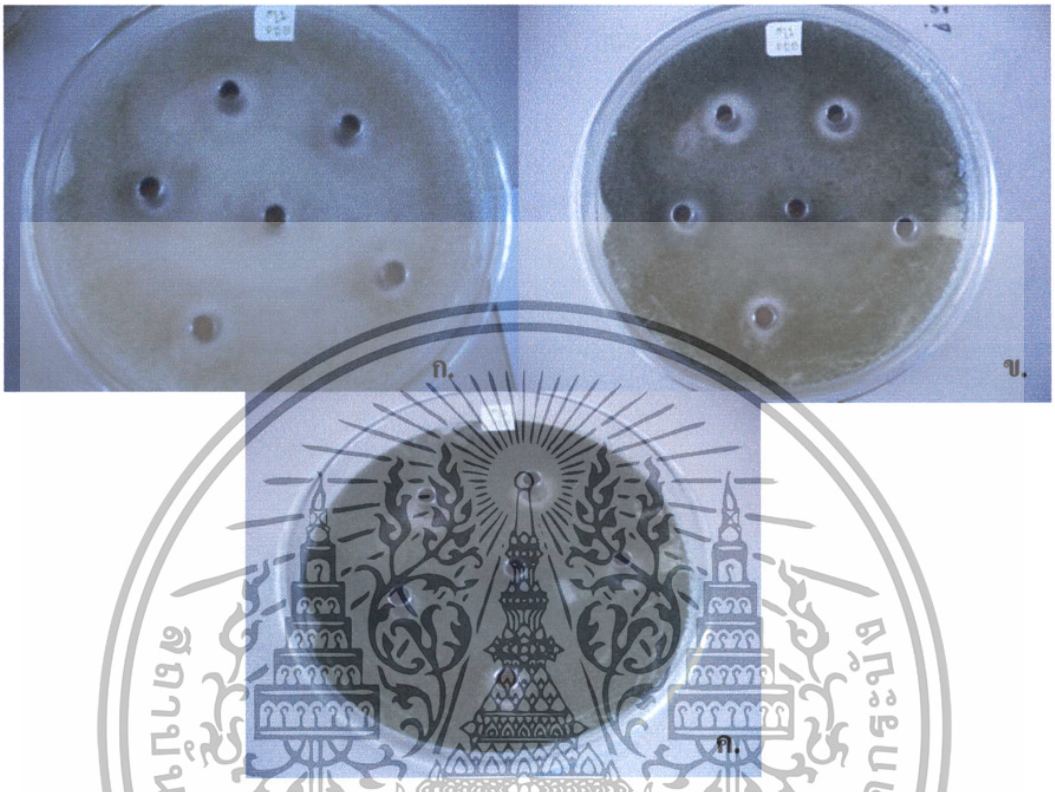
รูปที่ 4.16 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) เลี้ยงในอาหาร MEB ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



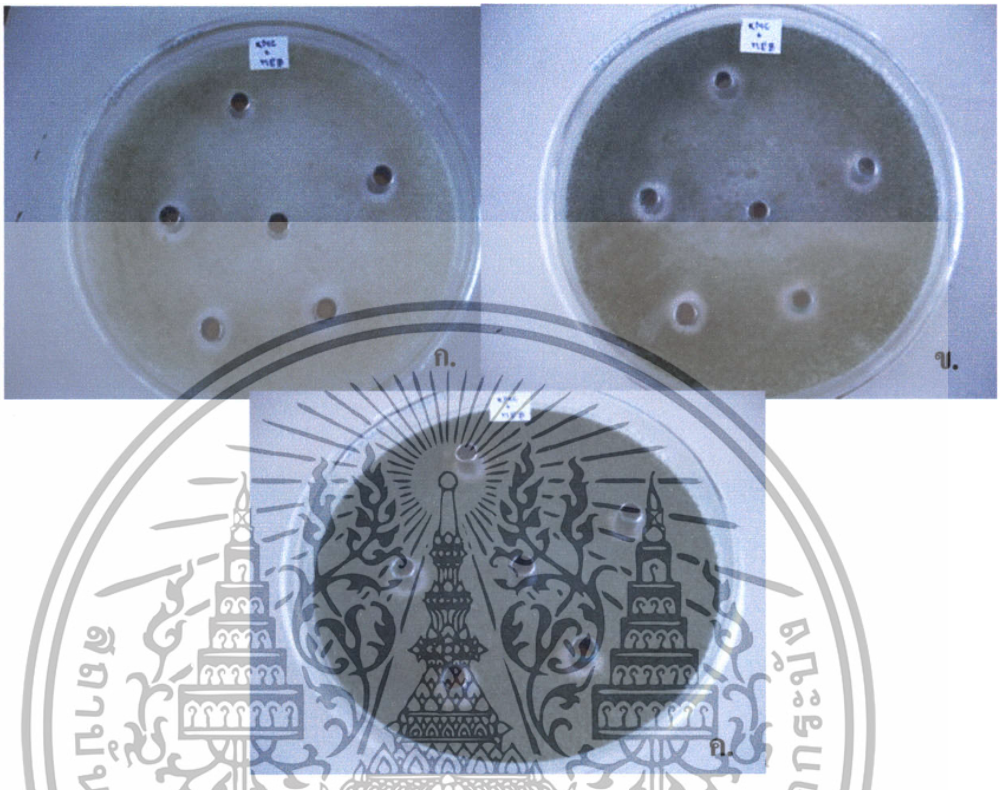
รูปที่ 4.17 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



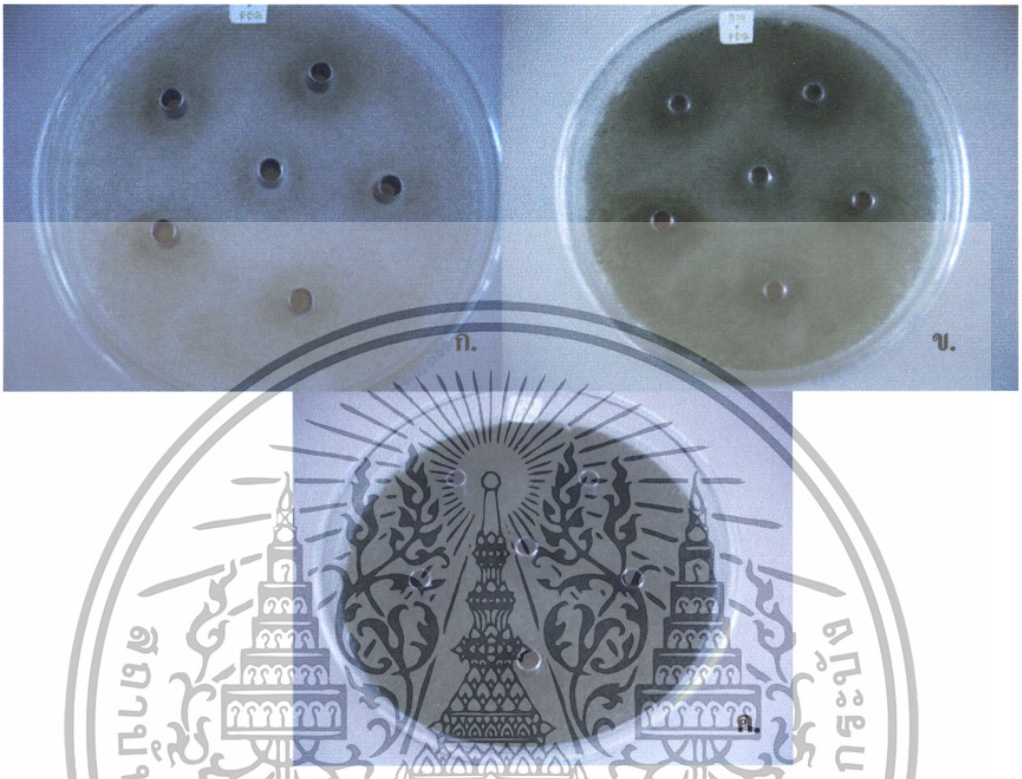
รูปที่ 4.18 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



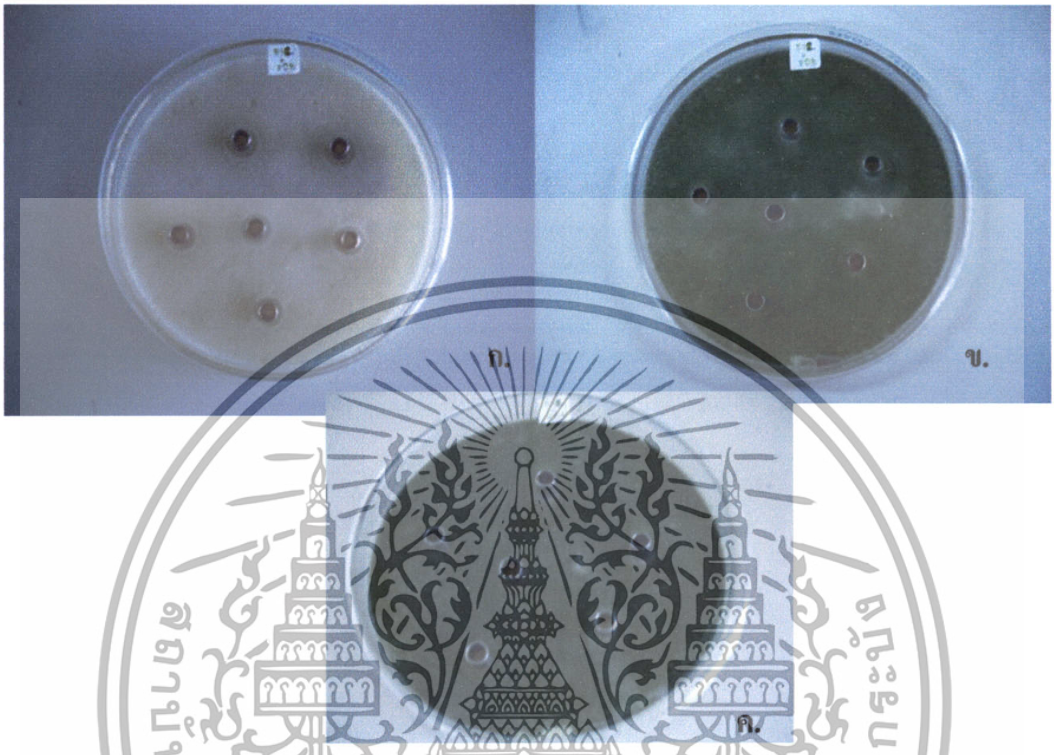
รูปที่ 4.19 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



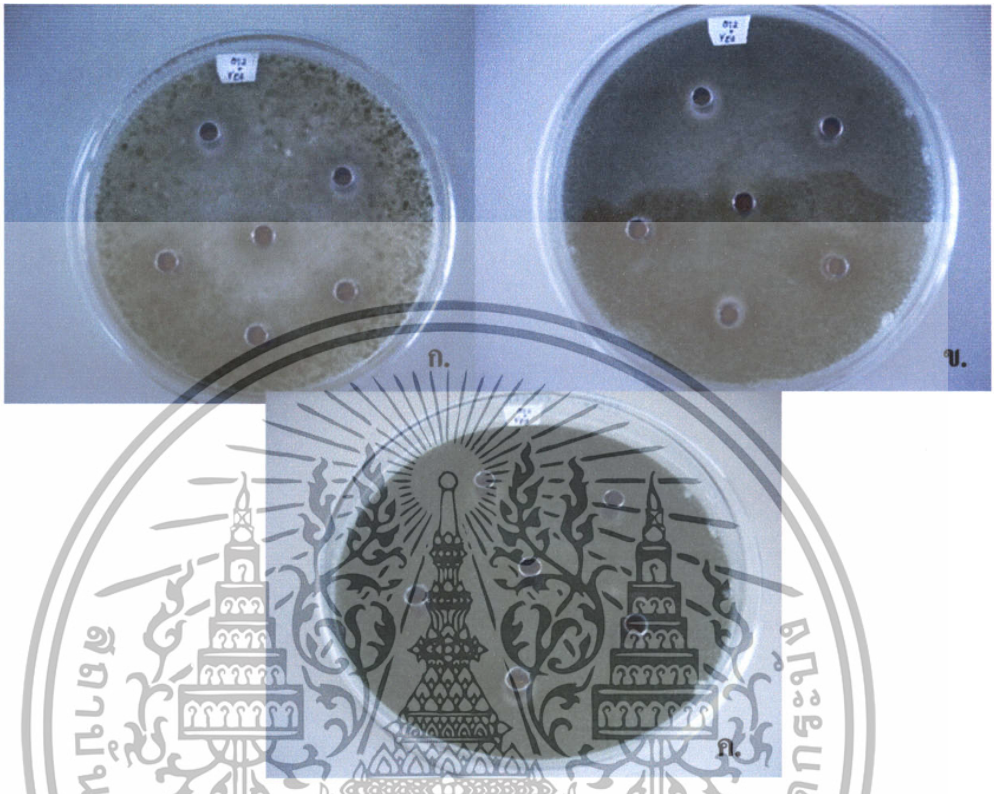
รูปที่ 4.20 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512108 (1) ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



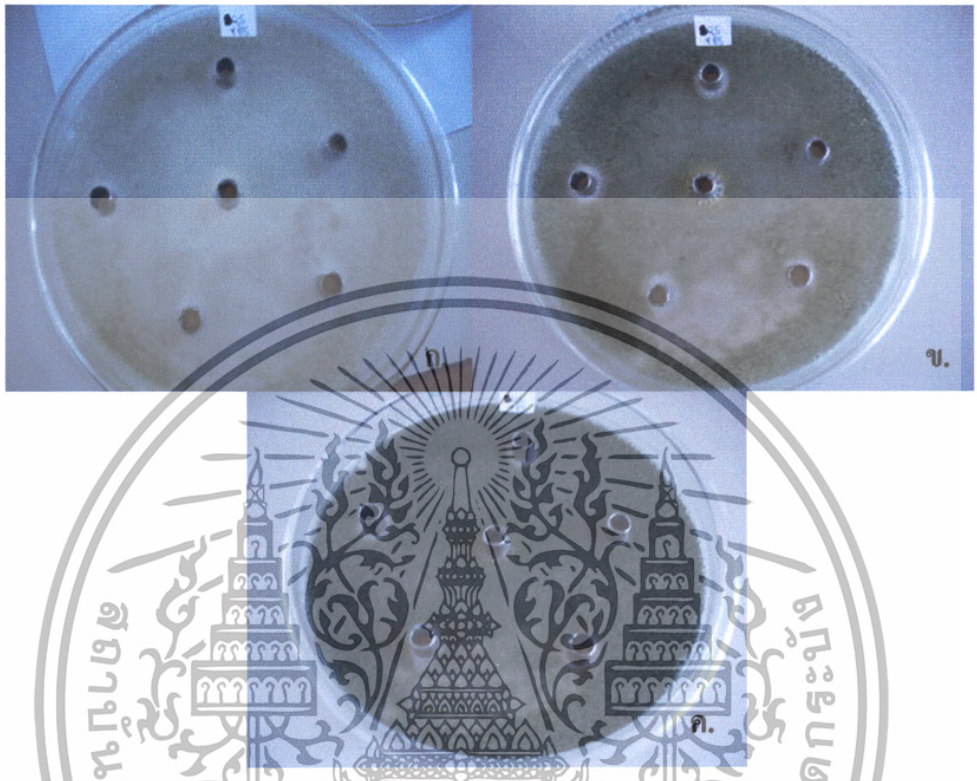
รูปที่ 4.21 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.23 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

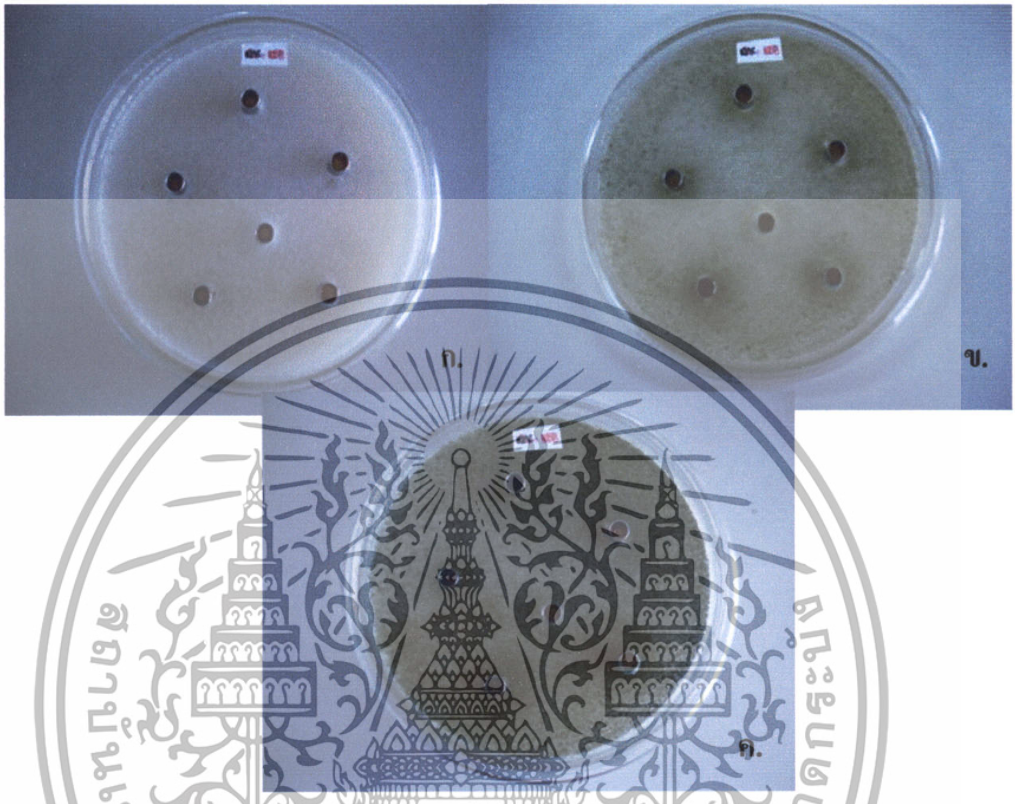
รูปที่ 4.24 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06(3) ในอาหาร MEB ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

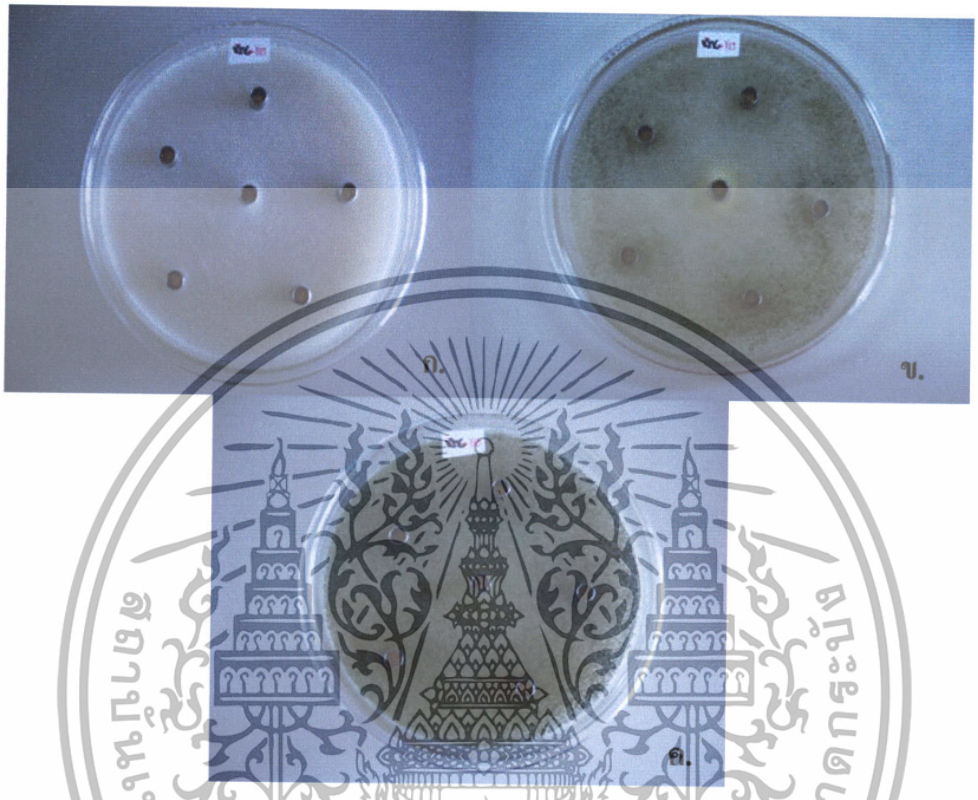
รูปที่ 4.26 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.28 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.29 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

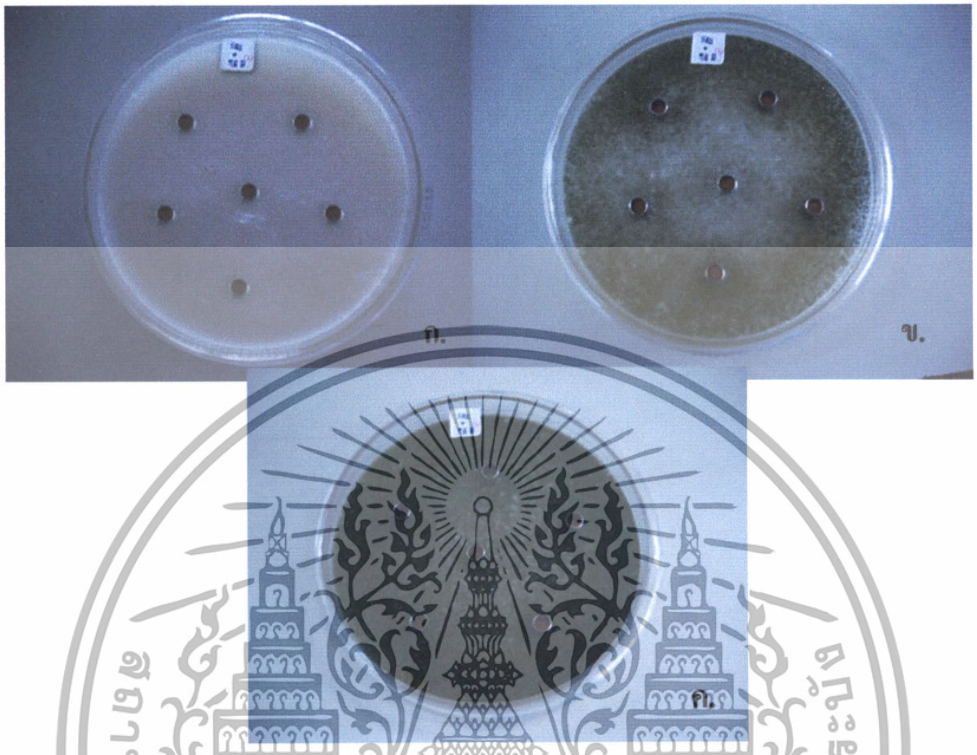
รูปที่ 4.30 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.31 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว MEB ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

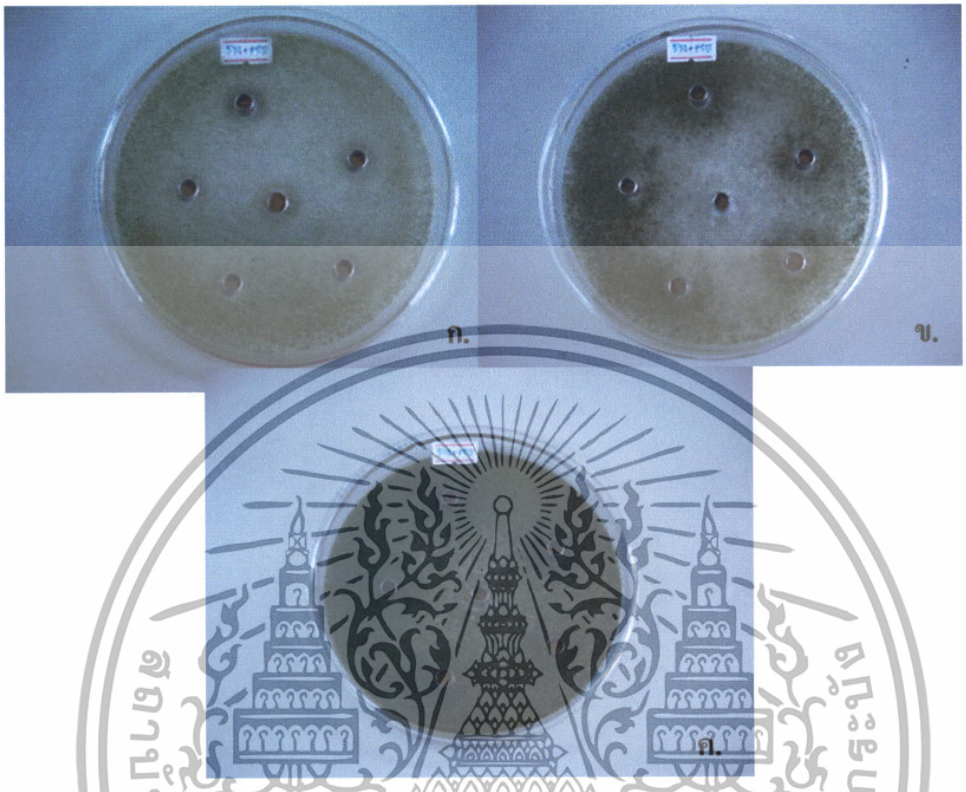
รูปที่ 4.32 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท SRS 4 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.33 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) เลี้ยงในอาหาร PDB ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.34 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.35 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) ในอาหาร MEB ที่สภาวะเขย่า

ก. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 2 วัน

ข. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 3 วัน

ค. เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

จากผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* พบว่า *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดีที่สุด โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้สูงถึง 70.32 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 และ SRS 4 ที่สามารถยับยั้งได้ 35.38 และ 29.35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน *Penicillium* ไอโซเลท 480512 I08 (1) สามารถยับยั้งการเจริญได้น้อยที่สุด คิดเป็น 8.00 เปอร์เซ็นต์

Calistru และคณะ (1997a) ศึกษาการควบคุมการเจริญของ *A. flavus* โดยชีววิธี โดย *Trichoderma* 2 สายพันธุ์ คือ *Trichoderma harzianum* และ *Trichoderma viride* ด้วยวิธี dual culture พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้

Laxma และ Reddy (1994) พบว่า *T. viride* จะสร้างสาร trichodermin ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ นอกจากนี้ *T. viride* ยังยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินโดย *A. flavus* เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *T. viride* เป็นเวลา 5 วัน ก่อนการเพาะเลี้ยง *A. flavus* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน จะสามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในหลอดรูปตัวยู

Hussein และคณะ (2007) พบว่า *Trichoderma viride* สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินโดย *A. parasiticus* RCMB 002001 ได้ถึง 67.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Penicillium italicum* และ *P. griseofulvum* ที่ยับยั้งได้ 53.9 และ 52.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Thanaboripat และคณะ (1997) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus lactis* ร่วมกับ *A. parasiticus* เป็นเวลา 3 วัน จะทำให้การสร้างสารอะฟลาทอกซินลดลงจาก 108.33 เป็น 94.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. lactis* ก่อน *A. parasiticus* เป็นเวลา 3 วัน พบว่า *A. parasiticus* สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซินได้เพียง 58.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่านั้น

National Center for Radiation Research and Technology (1991) รายงานว่า เมื่อนำเชื้อรา *A. flavus* มาเพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวโพดร่วมกับ *T. viride* หรือ *A. niger* จะทำให้การเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ลดลง 51 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *T. viride* หรือ *A. niger* บนเมล็ดข้าวโพดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนทำการลงเชื้อ *A. flavus* พบว่า จะไม่มีการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 พบว่า ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี 1 จะลดลงจาก 700 พีพีบี เป็น 160 และ 140 ในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้นึ่งฆ่าเชื้อ และผ่านการฆ่าเชื้อตามลำดับ

5.2 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา และสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

จากผลการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา และสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* พบว่า เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลท 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดีที่สุด (ขนาด inhibition zone เท่ากับ 33.750 มม.) รองลงมาคือ เชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว PDB ที่สภาวะนิ่ง และเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท KMC 5 ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง (ขนาด inhibition zone เท่ากับ 16.031 และ 15.079 มม.ตามลำดับ) โดยทั้งสองให้ผลไม่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าทั้ง 3 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อรา 3 ชนิดคือ MEB, PDB และ YES สายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* 4 ไอโซเลท และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา คือ สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่แตกต่างกันด้วย

ศิรินทิพย์ และคณะ (2548) รายงานว่า สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ และการสร้างเส้นใยของเชื้อรา *P. asparagi* ได้ และสารกรองไม่สูญเสียประสิทธิภาพ เมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อรา *T. harzianum*(CB-Pin-01) สามารถเป็นปรสิตต่อเชื้อรา *Phomopsis asparagi* โดยพันรัดและแทงผ่านเข้าไปเจริญภายในเส้นใยของเชื้อรา *P. asparagi*

Bruce และ Highley (1991) ได้ทำการแยกเชื้อ *Trichoderma* และ *Penicillium* เพื่อนำมาต้านการเจริญของ *Trametes versicolor* และ *Neolentinus lepideus* โดยวิธี dual culture บนอาหาร malt extract agar (MEA) และทดสอบความเป็นพิษของน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร malt extract broth (MEB) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Trichoderma* และ *Penicillium* มากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วจึงนำไปเทผสมกับอาหาร MEA จากนั้นจึงเลี้ยงเชื้อ *T. versicolor* และ *N. lepideus* และวัดการเจริญ จากการทดลองพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* และ *Penicillium* หลายไอโซเลทสามา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รถยับยั้งการเจริญของ *T. versicolor* และ *N. lepideus* ในการทดลองแบบ dual culture แม้ว่ามีเพียงน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อราบางไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *T. versicolor* และ *N. lepideus* ได้ นอกจากนี้ ยังได้มีการนำน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อราไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *T. versicolor* และ *N. lepideus* ได้ดีที่สุด มายับยั้งการเจริญของ Basidiomycetes ซึ่งให้ผลดีเช่นเดียวกัน

Gary และคณะ (1973) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ในอาหาร glucose-salt broth และอาหารที่ใช้น้ำองุ่นเป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะเกิดการสร้างอะฟลาทอกซิน แต่เมื่อนำ *A. parasiticus* มาเลี้ยงร่วมกับ *Penicillium italicum* จะทำให้การสร้างอะฟลาทอกซินลดลง และให้ผลเช่นเดียวกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ในน้ำองุ่น

Calistru และคณะ (1997b) พบว่า culture filtrate ของ *T. harzianum* และ *T. viride* สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้ โดยความสามารถในการยับยั้งขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงในอาหาร

Choudhary (1992) พบว่า *T. harzianum* 2 ไอโซเลท และ *T. viride* 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อของ *Trichoderma* ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้ และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ร่วมกับ *T. viride* พบว่า *T. viride* สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้ถึง 73.5 เปอร์เซ็นต์ และ อะฟลาทอกซินจี 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

Shantha (2000) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ร่วมกับ *T. hazianum* หรือ *Trichoderma* sp. 639 ในอาหาร Czapek-Dox-Casamino acid medium สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

Zdenka และ Stjepan (2007) รายงานว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *A. flavus* NRRL 3251 ร่วมกับ *A. flavus* ไอโซเลทที่ไม่สร้างอะฟลาทอกซิน บี 1 ในอาหาร YES broth ทำให้ลดการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาโดยวิธี dual culture ระหว่างเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* พบว่า *A. niger* สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 โดย *A. flavus* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. สารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่สร้างโดยเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* อาจเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *A. parasiticus* ทำให้ยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* ได้ หรืออาจเป็นสารปฏิชีวนะที่เชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* สร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม เพื่อให้ทราบว่าสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) หรือเอนไซม์

2. ในการทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ควรศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยทำการเก็บตัวอย่าง culture filtrate ที่ระยะการบ่มเชื้อต่างๆกัน นอกจากนี้ ควรทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในอาหารแข็งชนิดอื่นๆ ด้วย

3. ควรทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินอื่นๆ เช่น *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* สายพันธุ์ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ป้องประทุม. 2540. การควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* 102566 ในเมล็ดข้าวโพดโดยสารเคมีบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กานต์ วงศาริยะ, สุเมธ กุณฑลวรรณ และสุวัฒน์ สังวรวรรณา. 2548. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน. โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กัญญา ปรีชาศุทธิ์, ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว และ บงกชวรรณ สุตะพาหะ. 2547. *เชื้อราที่สำคัญทางการแพทย์*. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2550. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ณัฐลดา พลแสน, ศุภมาศ สุขโสม และศุภางค์ ระรื่นรมย์. 2548. การผลิตกรดโคจิกจากแป้งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BRI. โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. *จุลชีววิทยาทั่วไป*. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เยาวพา สุวัตถิ, 2550. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช [Online].Available : http:// www. gpo .or.th/rdi/html/microbe.html

ศิรประภา อนันตชัย, สิริมนต์ คำเหล็ก และอติศักดิ์ ปัญญา. 2545. การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* บางสายพันธุ์ของลูกแป้งเหล้า. โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ศิรินทิพย์ แดงติ๊บ, จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินทนูและ ปราโมทย์ สฤษดิ์นิรันดร์. 2548. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis asparagi* Bubak ในสภาพแปลงปลูก. โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. *ราวิทยาเบื้องต้น*. กรุงเทพมหานคร : จามจุรีปีดักท์.

วิเชียร ยงมานิตชัย, วราภา มหากาญจนกุล, สุวรรณา กลัดพันธุ์, อมรา ชินภูติ และมาลัย บุญรัตนกร-กิจ. 2548. *การจัดการเพื่อลดการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในพริกแห้งและพริกป่น*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพมหานคร

สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์. 2546. การวางแผนการทดลอง. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. *สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน*. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อภิษฐา ช่างสุพรรณ, 2548. อะฟลาทอกซิน (AFLATOXIN) ในผลิตผลทางการเกษตร [Online]. Available: www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/bsp_1_2548_aflatoxin.

Bruce, A. and Highley, L. T. 1991. Control of growth of wood decay Basidiomycetes by *Trichoderma* spp. and other potentially antagonistic fungi. *Forest product journal*. 41, (2) : 63-67.

Calistru, C., Mclean, M. and Berjak, P. 1997 a. In vitro studies of the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. 1 Macroscopical and microscopic observations of fungal interactions. *Mycopathol*, 139 : 115-121.

Calistru, C., Mclean, M. and Berjak, P. 1997 b. In vitro studies of the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. 2 A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathol*, 139 : 115-124.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C. and Gooday, G. W. 2001. *The Fungi*. San Diego : Academic Press.

Choudhary, A. K. 1992. Influence of microbial co-inhibitants on aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* on maize kernels. *Letter in Applied Microbiology*. 14 : 143-147.

Dhingra, D. and Sinclair, J. B. 1995. Plant deseases/ Research/ Technique. France. CRC Press : 250.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gary , G. A., Chukwudi, O. E. and Elmer, H. M. 1973. Aflatoxin and rubratoxin produced by *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium rubrum* when grown independently, associatively, or with *Penicillium italicum* or *Lactobacillus plantarum*. *Zeitchrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*. 153 : 305-311.

Hussein, H. E., Hesham, M.M. and Mahoud, M. E. 2007. Bioredimediation od aflatoxins by some reference fungal strain. *Polish Jounal*. 56, (3) : 215-223.

Kurtzman, C. P., Horn, B. W. and Hesseltine, C. W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 3 (53). 1572-9699.

Laxma, R. G. and Reddy, S. M. 1994. Influence of some toxigenic fungi on production of trichodermin by *Trichoderma viride*. *Journal of the Indian Botanical Society*. 73 : 209-211.

Lorian, V. 1986 Antibiotics in Laboratory Medicine. Lippincott Williams & Wilins, Philadelphia.

Moore-Landecker, E. 1996. *Fundamentals of the Fungi*. New Jersey : Prentice Hall International.

National Center for Radiation Research and Technology. 1991. Aflatoxin control in preharvest maize : effects of chitosan and two microbial agents. *Journal of Food Safety*. 117 (2) : 165-169.

Royce, D. J. and Ries, S. M. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*. 68 : 603-607

Shantha, T. 2000. Fungal degradation of aflatoxin B1. *Food Microbiology*. 7, (5) : 175-178.

Simon, A., Dunlop, R. W., Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil Biology and Biochemistry*. 20, (2). 263-264.

Smith, J. E. and Moss, M. O. 1985. *Formation, analysis and significance*. Chichester : John Wiley & Sons.

Spillman, A. 2002. Researchers Find Reproductive States of Two Beneficial Fungi [Online]. Available: http://arsserv0.tamu.edu/is/pr/2002/021231.trichoderma.jpg

Thanaboripat, D., Kraipeerapum, K. Pattanaphongsak, C. Srisanan, S. and Nanasombat, S. 1997. Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt. *Kasetsart Journal*. (Nat. Sci.) 31 : 117-123.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wilson, D. M. and Payne, G. A. 1994. *Factors affecting Aspergillus flavus group infection and aflatoxin contamination of crops*. Sandiego : Academic Press.

Zdenka, C. and Stjepan, P. 2007. Interaction between certain molds and aflatoxin B1 producer *Aspergillus flavus* NRRL 3251. *Arh Hig Rada Tokiskol*, 58 : 429-434

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

MEB : Malt Extract Broth

Malt extract	30 g
Mycological peptone	5 g
Distilled water	1000 ml

PDB : Potato Dextrose Broth

Potato Dextrose Broth	24 g
Distilled water	1000 ml

PDA : Potato Dextrose Agar

Potato Dextrose Agar	39 g
Distilled water	1000 ml

YES : Yeast Extract Sucrose Broth

Yeast extract	20 g
Sucrose	150 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Distilled water	885 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การใส่เชื้อโดยวิธี Point incoculation (กนกรัตน์, 2540)

เตรียมสารละลายวุ้น 0.2 % ผสมกับ 99.5 % ของน้ำกลั่นที่มี Tween 80 0.05 % ให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดฝาเกลียว แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายวุ้นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

สีย้อม Lactophenol (Dhingra and Sinclair, 1995)

เตรียมสีย้อม lactophenol โดยมีส่วนผสมดังนี้

Glycerine	40 g
Lactic acid	20 g
Phenol	20 g
Distilled water	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางผนวก ค. 1 ข้อมูลดิบการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Penicilium* และ *Trichoderma*

สายพันธุ์ของเชื้อรา	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของ *A. parasiticus* (มิลลิเมตร)					
	I	II	III	IV	V	เฉลี่ย
Penicillium ไอโซเลท 480512 I08 (1)	26.23	26.55	25.68	25.83	25.65	25.99
Penicillium ไอโซเลท 480519 I06 (3)	7.51	9.11	9.66	9.87	5.71	8.37
Trichoderma ไอโซเลท KMC 5	16.11	17.87	20.08	20.08	17.11	18.25
Trichoderma ไอโซเลท SRS 4	24.56	18.96	19.63	18.01	18.63	19.96
ชุดควบคุม (Control)				28.25		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค. 2 ข้อมูลดิบการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

A. parasiticus

สายพันธุ์ของเชื้อรา	ชนิดของอาหาร	สภาวะ	วันที่	ซ้ำ				
				I	II	III	IV	V
Penicillium ไอโซเลท 480512 I08 (1)	MEB	นิ่ง	2	11.74	10.95	10.56	11.35	12.26
			3	11.66	10.63	10.47	11.30	11.20
			4	11.56	10.09	9.41	10.06	10.09
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	PDB	นิ่ง	2	14.87	14.11	12.78	12.38	12.48
			3	13.67	13.93	11.96	11.86	12.09
			4	12.52	13.28	11.88	11.40	10.35
		เขย่า	2	14.03	11.73	10.99	12.22	22.73
			3	13.78	11.30	10.68	11.62	21.34
			4	13.35	10.42	10.60	11.37	20.60
	YES	นิ่ง	2	12.71	11.76	11.48	10.41	10.87
			3	12.00	11.56	11.22	10.32	10.65
			4	11.51	10.82	10.92	10.29	10.39
		เขย่า	2	15.77	16.83	15.30	16.11	15.18
			3	12.14	11.64	13.40	12.02	11.61
			4	11.23	10.77	12.43	11.67	10.39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค. 2 (ต่อ) ข้อมูลดิบการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

สายพันธุ์ของเชื้อรา	ชนิดของอาหาร	สภาวะ	วันที่	ซ้ำ				
				I	II	III	IV	V
Penicillium ไอโซเลท 480519 I06 (3)	MEB	นิ่ง	2	11.42	11.78	11.77	11.29	11.14
			3	9.66	9.22	10.87	10.85	10.41
			4	9.63	9.16	10.55	9.28	10.33
		เขย่า	2	14.12	14.63	13.86	14.01	19.12
			3	12.55	13.96	13.35	12.68	11.98
			4	11.43	13.53	12.67	10.69	11.66
	PDB	นิ่ง	2	13.36	13.11	12.91	13.26	12.39
			3	12.20	11.43	11.68	11.83	12.18
			4	12.15	10.99	11.47	10.61	11.94
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	YES	นิ่ง	2	48.84	42.14	40.74	40.09	40.57
			3	34.49	32.35	32.25	30.72	29.90
			4	23.19	27.56	26.98	28.04	28.32
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค. 2 (ต่อ) ข้อมูลดิบการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

สายพันธุ์ของเชื้อรา	ชนิดของอาหาร	สภาวะ	วันที่	ซ้ำ				
				I	II	III	IV	V
Trichoderma ไอโซเลท KMC 5	MEB	นิ่ง	2	11.98	13.75	12.72	12.79	12.15
			3	11.54	13.62	12.33	11.93	11.74
			4	11.06	13.35	12.25	11.45	10.92
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	PDB	นิ่ง	2	20.79	16.34	14.37	13.73	18.74
			3	19.07	15.70	13.41	13.50	17.79
			4	17.80	15.18	13.32	13.18	17.55
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	YES	นิ่ง	2	16.83	14.91	16.10	15.30	15.76
			3	14.98	14.66	15.06	15.07	14.67
			4	14.77	14.57	14.50	14.83	14.17
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค. 2 (ต่อ) ข้อมูลดิบการศึกษาหาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราและสายพันธุ์ของเชื้อรา *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

สายพันธุ์ของเชื้อรา	ชนิดของอาหาร	สภาวะ	วันที่	ซ้ำ				
				I	II	III	IV	V
Trichoderma ไอโซเลท SRS 4	MEB	นิ่ง	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	PDB	นิ่ง	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	YES	นิ่ง	2	11.84	11.36	11.80	12.21	10.84
			3	10.99	11.12	11.46	11.17	10.23
			4	10.97	11.08	10.72	11.03	9.87
		เขย่า	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้